

**SİĞİRLARDA PARATÜBERKÜLOZUN SEROLOJİK, ALLERJİK VE
BAKTERİYOLOJİK MUAYENE YÖNTEMLERİ İLE MUKAYESELİ OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

A comparative study on serological, allergic and bacteriological
examination of
paratuberculosis in cattle.

Bülent VURAL (*) Nuray ATALA (**) Dr. Mustafa ÇELEBİ (***)

ÖZET

Paratüberküloz son zamanlarda önem kazanan bir yetiştirme hastalığı olarak ruminantlarda görülmektedir. Bu hastalıktan ileri gelen ekonomik kayıplar önemlidir.

Dünyada yaygın olan bu hastalığa ülkemizde de rastlanmaktadır. Çalışmamızda paratüberkülozun çeşitli teşhis yöntemleri ile araştırılması beş ayrı işletmede serolojik, allerjik ve gaita örneklerinin bakteriyolojik yoklaması ile yapıldı ve aşağıdaki sonuçlar alındı.

İşletmelerden temin edilen 5118 kan serumu komplement fikzasyon testi ile işlenip 85 pozitif 30 şüpheli reaksiyon alındı. Allerjik teşhiste PPD avian ve PPD johnin kullanılarak 4923 sığırdan yapılan tüberkülin testinde 73 pozitif 19 şüpheli reaksiyon tesbit edildi. Serolojik ve allerjik testlere reaksiyon alınan 145 sığıra PPD johnin uygulandı ve 52 pozitif ve 6 şüpheli reaksiyon alındı. Bu sığırlardan temin edilen gaita kültürlerinden 15 adedinde M.paratuberculosis izole edilmiştir; ayrıca rektal mukoza kazıntı örneklerinin mikroskopik yoklamalarında 4 pozitif olgu değerlendirilmiştir.

(*) Veteriner Kontrol ve Araştırma Ens. Lab. Şefi Uzm. Vet. Hek.

(**) Veteriner Kontrol ve Araştırma Ens. Uzm. Vet. Hek.

(***) Tarım İşletmeleri Genel Md. Vet. Hek.

SUMMARY

Paratüberculosis has recently become an important breeding disease in ruminants in many countries since it has caused great economic losses. Being worldwide, paratuberculosis also occurs in our country.

In this study, the use of different diagnostic methods in paratuberculosis was investigated in 5 different farms by serological and allergical tests as well as bacteriological examination of feces samples. The results obtained are as follows:

5118 blood sera from 5 herds were tested with the antigen prepared with M.paratuberculosis 3 and 5 path strains by complement fixation test and 85 positive and 30 suspected sera were found.

The sera that responded to paratuberculosis were tested with avian antigen by the complement fixation test and 76 positive and 18 suspected sera were found. Tuberculin (PPD bovine, PPD avian) administration in 4923 cattle resulted in 73 positives and 19 suspected to PPD avian and no positives to PPD bovine.

According to serological and suspected cattle were kept separately. Two months afterwards, PPD Johnin was administered on them. PPD Johnin tuberculin administered on 145 cattle resulted in 52 positives and 6 suspected.

15 M. paratuberculosis isolations were made from rectal mucosa and feces samples from 145 cattle that responded to allergical and serological test in bacteriological examinations (Herold egg, yolk medium with and without mycobactin) Furthermore, 9 M. pheli isolations were made, causing transient sensibilisation.

In one management, 21 cattle that reacted to PPD avian were negative for PPD Johnin and serological tests. Bacteriological examinations of feces samples from these animals gave negative results. These examinations were carried out three times with 6 month intervals.

In bacteriological carried out on starlings that are widely present in winter. Runyon group AAR mycobacteria were isolated. This mycobacterium induce no lesions in laboratory animals. Tuberculin (PPD bovine, PPD avian and PPD Johnin) were inoculated into guinea pigs in equal doses and positive reaction occurred to PPD avian only.

After tuberculin administration two months later on cattle, positive reaction

to PPD avian was observed to have disappeared.

In a herd, cattle vaccinated against paratuberculosis responded to PPD avian and Johnin, however, serological tests and PPD bovine results were negative.

In a herd of 2200 cattle that had problems in the past with paratuberculosis allergical tests were carried out (PPD avian and PPD Johnin were administered with 6 month interval). In 1990, periodical hygienic applications were made in this management and 34 cattle positive for paratuberculosis in 1990 and 16 positive cattle in the first six months of 1991 and 11 positive cattle in the second six months of 1991 were slaughtered. Allergical and serological tests carried out in 1992 and 1993 in complete herd resulted in negative reactions. It was concluded that this result was a consequent of the change from range system to feedlot system.

In the farms on which our study was carried out no animals with prominent symptoms of paratuberculosis were observed with an exception that the animals positive after feces cultures exhibited repeated diarrhea and there was cachexia in some animals.

In the positive animals, infection could be defined as subclinical or latent infection of 15 cattle whose feces cultures were positive, 11 were positive, that is diagnostic efficiency of cultures was 73,2 % i however this was 92,3 % in PPD Johnin.

GİRİŞ

Paratüberküloz, M.paratuberculosis adı verilen asido-rezistans bir mikroorganizmanın lenfatik glandlarda yerleşerek barsak mukozasında çoğalıp, bulaşıcı enteritise sebep olduğu zayıflama ile karakterize kronik bir hastalıktır (29).

Johne's Disease daha çok subklinik bir enfeksiyondur. Enfekte hayvanların çoğunluğu hiç belirti göstermezken, bilinmeyen faktörler enfekte hayvanların yaklaşık %5'inin klinik hastalık belirtileri göstermelerine neden olurlar. (26)

Düşük insidansına rağmen paratüberkülozun süt sığırlarında, koyun ve keçilerde belirgin ekonomik kayıplara neden olduğu bilinmektedir. Sığırlarda hastalık, infertilite, uzun buzağılama fasılası, zayıflamaya; yine bu hastalığın

düşük süt verimine ve etkilenen sığırların kısa ömürlü olmasına yol açtığı bildirilmiştir (34)

Birleşmiş Milletler FAO örgütüncü yürütülen bir çalışmada paratüberkülozun sığırcılık endüstrisini, özellikle entansif süt yetiştiriciliğini en ciddi etkileyen bir hastalık olduğu sonucuna varılmıştır (63). Paratüberkülozun neden olduğu ekonomik kayıplarla ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında, süt inekleri üzerinde yapılan bir çalışmada paratüberkülozun klinik belirtileri bulunan hayvanlar seçilerek, iki yıl öncesinin laktasyonu ile karşılaştırıldığında süt veriminde %19.5'lük bir düşüş olduğu belirlenmiş, klinik bir belirti göstermeyen paratüberkülozlu hayvanlarda bu düşüş %16 olmuştur.

Hollanda'da paratüberküloz konusunda yapılan bir çalışmada ekonomik kayıpların bölgelere ve çiftlik ünitelerine göre değişiklik gösterdiği, paratüberkülozlu sürülerde kayıpların karlı bir yetiştiriciliğin devamını imkansız hale getirecek kadar yüksek olabileceği belirlenmiş ve bu yüzden Hollanda'da gönüllü bir eradikasyon programı organize edilmiş, eradikasyon teşebbüslerindeki olumsuz sonuçlardan dolayı araştırmalar üç konu üzerinde yoğunlaştırılmıştır. Bunlar, diagnostik çalışmalar (intravenöz johnin uygulaması ve lenf nodülü biyopsisi); paratüberkülozun daha fazla yayılmasını önlemek amacıyla alınacak yetiştirme tedbirleri ve üçüncüsünde ekonomik kayıpların hangi ölçülerde olduğunun hesaplanmasıydı. Bu hesaplama sonucunda paratüberkülozlu, klinik belirti gösteren bir ineğin işletme için kaybı 650 pound, klinik belirti göstermeyen için 510 pound olarak belirlenmiştir (15).

Araştırmalarda, yüksek verimli ineklerin paratüberkülozla ilgili klinik belirtileri daha çok gösterdiği belirtilmektedir (11, 13).

Amerika'nın kuzey doğusunda yapılan bir çalışmada subklinik paratüberkülozun sebep olabileceği sonuçlar belirlenmiş, subklinik paratüberkülozlu süt sığırlarında bir inek için bir günlük süt verimi azalması 1.333 pound ve normal süt verimine göre de %7.8'lik bir azalmayı gösteriyordu (6).

Bazı sürü çalışmalarında kronik enfekte sürülerdeki erişkin hayvanların %38'inin paratüberkülozlu olduğu tesbit edilmiş, bu erişkin hayvanların %3 ile %10'unun hastalığı klinik olarak taşıdığı görülmüştür. Enfekte sürülerdeki ergin hayvanların sadece %3'ü klinik olarak hastalık semptomlarını göstermiştir (9,23).

Sığır endüstrisi 601.220 süt sığırından oluşan ve %18'inin enfekte olduğu

düşünülen bir bölgede paratüberkülozdan meydana gelen toplam kayıp 8.8 milyon dolar olarak hesaplanmıştır. Kesimden sonra geri dönen miktar 2.2 milyon dolardır. Buna göre 6.6 milyon dolarlık miktar bu hastalıktan ileri gelen kaybın önemini yansıtmaktadır (48).

Sığırlarda paratüberküloz meydana getirmiş olduğu büyük ekonomik kayıplar nedeniyle bir çok ülkede yoğun çalışmalara konu olmakta ve bu hastalık üzerinde teşhis, kontrol ve eradikasyon konusunda çalışma ve araştırmalar yapılmaktadır.

M. paratuberculosis Johne hastalığının etkeni olup, kısa, ince, çomak şeklinde 1.2 mikron uzunluğunda, 0.5 mikron genişliğinde genellikle düz, hareketsiz, intrasellüler AAR gram pozitif bir mikroorganizmadır (52).

Hastalığın ilk olarak kronik ishal gösteren bir sığırdan izolasyonundan sonra (18) M. paratuberculosis müteakiben bir çok evcil ve vahşi hayvanlardan izole edilmiştir (7).

Paratüberküloz ruminantlarda önemli bir hastalık olmasına rağmen, araştırmacılar tek mideli hayvanlarda da varlığını bildirmişlerdir.

M. paratuberculosis'in insanlarda ishalle seyreden kronik tabiatlı Crohn hastalığı ile ilgisi olabileceği düşünülmüş ve M. paratuberculosis'le ve Crohn hastalıklı insanlardan izole edilen Mycobacteri'nin antijenik yönden benzer oldukları gösterilmiştir (56).

Ülkemizde bu hastalığın bulunduğunu bildiren ilk yayın Sezginer tarafından (1928) yapılmıştır (49).

Demirer ve Yücel Türkiye'de M. paratuberculosis'i ilk defa izole edip üretmişlerdir (10).

Paratüberküloza duyarlılık yaşla bağlantılıdır. Çok genç hayvanların deneysel enfeksiyonu, bir yaşındaki hayvanları enfekte etmeye yeterli mikroorganizma miktarından çok daha az miktardaki mikroorganizmalarla gerçekleştirilebilir (7).

Erişkin hayvanlar nadiren enfekte olurlar. Bu yüzden sığırlarda doğal enfeksiyonun muhtemelen hayatın ilk bir kaç ayı içinde meydana geldiği düşünülmektedir.

En çok olası enfeksiyon yolu süt emen buzağuların dışkı ile kontamine memeleri emmesidir. Organizmalar ağız yoluyla alındıktan sonra intestinal mukozaya geçerler ve burada makrofajlar tarafından fagosite edilirler.

Başlangıçtaki basiller ileocaecal valvülün submukozasında ve bölgesel lenf düğümlerinde lokalize olmaya meyillidir. Mikroorganizma, hücreleri tahrip ederek

ya da toksin oluşturarak değil, konakçıda granümatöz bir immün yanıtı uyatarak hastalığa neden olurlar (7,19,40). Granümatöz bir lezyon önce ileocaeal valvül bağlantısında ya da yakınında meydana gelir. Ve bu lezyon daha sonra ince ve kalın barsaklara yayılır. Bunun sonunda barsaklarda makroskopik kalınlaşmalar görülebilir. Lezyonların zamanla intestinal duvarda yayılması ile malabsorbsiyon ve osmotik diyare meydana gelir. Yoğun lenfatik yıkımdan dolayı protein kaybı olur (41,42)

Paratüberkülozun enfeksiyon tarzı ile ilgili yapılan çalışmalarda; doğal koşullarda enfeksiyon, mikroorganizmaların yem ve su ile ağız yoluyla alınması sonucu şekillendiği, mera kontaminasyonu, organizmanın hayvanların çevresinde kalıcı olmasına neden olur. Zira M.paratuberculosis birikinti sularda yaklaşık 270 gün kadar, sığır dışkısında en az 246 gün ve sığır altlıklarında 252 gün canlılığını sürdürmektedir (21,36)

Genç hayvanlarda hastalığın yüksek prevalansı üzerinde yapılan bir çalışmada enfeksiyonun vertikal yayılması ileri sürülmüştür. Kongenital enfeksiyonun da oluşabileceği, Johne's disease hastalığı gösteren sığırlarda uterin ve fetal enfeksiyonlar bildirilmiştir (25,28).

Hastalığın çok yavaş ilerlemesinden dolayı genellikle enfeksiyonu almasından sonra iki yıl geçene kadar klinik belirti görülmemektedir. Tipik olarak klinik belirtilerin başlaması iki ile beş yaş arası meydana gelmekte, paratüberküloz vakalarında sığırlarda kronik sulu bir ishal dikkati çeker. Bununla beraber hastalığın erken döneminde ishal hafif ve aralıklı olarak görülebilir (21, 45). Hastalığın hafiflediği dönemde ağırlık kaybı ile birlikte normalden şiddetliye varan bir iştah durumu belirlenir. Artan su tüketimi dikkati çekebilir. Hastalık ilerledikçe hayvan zayıflar, tüyler matlaşır, genaralize kaşektik bir durum ortaya çıkar. Hastalığın ileri dönemlerinde klinikopatolojik anormalliklerin meydana gelmesine rağmen bunun teşhise fazla bir katkısı olmaz. Başlıca bozukluklar hipoproteinemi ve anemidir. Hipoproteinemi malabsorbsiyon ve enterik protein kaybından ileri gelir. Bazı hayvanlar iyileşmeye doğru gitseler dahi bunların hepsi sonradan yine hastalanırlar (7,17).

İlk klinik belirtiler doğum ya da işletmedeki değişiklik gibi stresler sayesinde ortaya çıkar (45). M.paratuberculosis'in yayılmasını başlıca fekal-oral yolla olduğu tahmin edilmekte olup; basilin boğaların semeninden ve genital organlarından izole edilmiş olmasına rağmen enfekte semenle yayılma olduğuna

dair bir kayıt yoktur (12, 27). *M. paratuberculosis*'ün ayrıca enfekte ineklerin sütlerinden de direkt olarak kültürü yapılmıştır. Bununla birlikte memelerin gaita kontaminasyonunun sebep olduğu bulaşmadan daha az önem taşıdığı kabul edilmektedir (55).

Paratüberkülozun kesin teşhisinin konduğu diagnostik değeri yüksek olan tek yol, doku ve dışkılarından yapılan kültürlerdir. Kültür yapmadaki en büyük dezavantaj organizmanın üremesi için gereken zamandır. Vasat formülasyonundaki son gelişmelerle birlikte sekiz hafta içinde pozitif sonuçların hemen hemen %90'ının elde edilmesi mümkün hale gelmiştir. Bununla birlikte izolatların %10 kadarı 12 haftadan daha uzun süre gerektirmektedir (33).

İndividual olarak hayvanlarda gaita kültürü eğer o hayvanın her gram gaitasında 100 adetten fazla organizma bulunuyorsa duyarlıdır. Buna karşılık pozitif kültürlerle kesin olarak enfeksiyonun varlığı kabul edilmekle birlikte negatif kültürler için kesin olarak enfeksiyonun olmadığı sonucuna varılmaz. Hayvanlarda kültür yapımının diğer bir sınırlayıcı faktörü ise bazı hayvanların organizmayı aralıklarla taşıması ve yaymasıdır. Yine de sürünün enfeksiyon durumunun tesbitinde tavsiye edilen metod kültür metodudur (8).

Tekniklerdeki bazı değişiklikler fekal kültürlerdeki diagnostik kabiliyetin artmasına neden olmuştur. İlk değişiklik ilk izolasyonda besi yerine Mycobactin -P yerine (*M. phlei*), homolog Mycobactin -J kullanımına geçilmesi (*M. paratuberculosis*'ün laboratuvara adapte suşu olmuştur (35, 57). Bu değişiklik gerekli inkubasyon periyodunun azalmasını ve kolonilerin gözlemlenmesi için gerekli süreyi 3 hafta kadar kısaltmıştır. Daha önemlisi Mycobactin-J içeren vasatlarda koloni sayısı %10-50 daha fazla meydana gelmektedir. Enfekte hayvanlarda izole edilen bazı suşların tesbiti Mycobactin-J varlığına dayanıyordu bu suşlar yalnız Mycobactin-P içeren vasatlarda üremiyordu (37).

Paratüberkülozun bakteriyolojik testi için olduğu kadar, kültür prosedüründeki belirgin ve önemli bir gelişmede şüpheli doku örneklerinin 20-30 dakika %0.05 tripsin ile sindirilmiş ve 18-24 saat süreyle benzalkonium klorür ile dekontamine edilip, daha sonra sedimentten 0.1 ml. Herrold'un modifiye yumurta sarılı vasatına inokule edilmesidir. Bu besi yerinin üç adedi %0.02 Mycobactin içermektedir. Dışkı numuneleri sindirim işlemi hariç benzer şekilde işleme tabi tutulmakta 1 gr. dışkı numunesi 40 ml. steril su içinde çalkalanıp 5 ml. supernatant alınıp, dekontaminasyon işlemine tabi tutulmaktadır. Bu kültür yöntemi bir çok

labaratuvarlarda tercih edilen bir yöntem olarak kullanılır ve primer izalasyonlarda organizmanın gözle görülebilir kolonilerin gelişmesi 9-12 hafta bir süre almaktadır (30,46). Gaitanın bakteriyolojik kültürlerinin diagnostik değerini artıran ikinci değişiklik, önceden kullanılan dekontaminanantın (benzalkoniumklorid) yerine HPC (hekzadecylpridinium)nin kullanılması olmuş, dekontaminasyonu müteakip HPC ile muamele edilen kültürlerde koloni sayısı ve incelenen gaita numunesinin benzalkonium klorid ile muamele edilen aynı kültürlerle oranla daha fazla bulunmuştur. Bunun yanında 10-20 kat daha fazla hacimde gaita kullanılması mümkün hale gelmekte, böylece bir log. ya da çok log. ile belirlenen organizma sayısı arttırılabilmektedir (12,61).

Günümüzde labaratuvarlarda çokça kullanılan kültürel etken tayininde diğer bakteriler ve mantarlardan arındırmak için dekontaminasyon işlemlerinde, gaita örneği 10 kısım % 0.75'lik HPC ile 30 dakika çalkalanır sonra ağır partüküllerin çökmesi için bir kaç dakika beklenir, ve berrak supernatant süspansiyon başka bir tüpe alınır. Bir kaç saat ya da bir gece bekletildikten sonra meydana gelen sediment inokule edilir (3, 20). Bazı araştırmacılar ekime hazır olan numuneye mikotik üremeye engel olmak için 1 ml.'sinde 1000 mg. Amphotericin B içeren sıvı katmaktadırlar (32).

M.paratuberculosis'in hemen hemen bütün suşlarının % 0.4 Sodyum piruvat içeren besi yerinde daha fazla ürediği, yalnızca bir kaç suşun bu madde tarafından inhibe edildiği ve bu yüzden dekontamine bütün suşların hem piruvatlı hem de piruvatsız vasat bulunan tüplere inokule edilmesi, yapılan çalışmalarda göz önünde bulundurulması gereğini vurgulamaktadır (3).

Bu hastalıkta mikroskopik teşhis yöntemleri, biyopsi materyalinin histolojik muayenesi (Iliac lenf düğümlerinin biyopsisi) ve rektal mukoza kazıntılarının (R.M.K.) Ziehl-Neelsen metoduyla muayenesini içerir. Ağır şekildeki enfekte hayvanlarda rektal kazıntı muayenesinin diagnostik kıymeti olabilmekte, fakat orta dereceli taşıyıcılarında (latent enfeksiyon kaynaklarında) en iyi şekilde kültür ile identifiye ve teyit edilmesi gerekir. Diğer yandan rektal mukoza kazıntılarında diğer atipik AAR bakteriler, özellikle M.phlei'nin yanılgılara neden olabileceği belirtilmektedir (5,31)

Gaita örneklerinin bakteriyolojik yoklaması subklinik paratüberkülozun teşhisinde güvenilir bir yöntemdir. Ancak bu metod çok zaman gereksinim duyulan, mikroorganizmanın üremesi için uzun bir inkubasyon süresine ihtiyaç

olması ve bölgesel bir hayvan populasyonunda yapılacak çalışmada bu testin kullanılabilirliği sınırlıdır. Bu nedenle M.paratuberculosis ile enfekte sığırları belirlemede serolojik testlerin geliştirilmesi gerekir (58).

Paratüberkülozda humoral immünite ile ilgili serolojik testler; CF testi, agar gel immunodiffusion, precipitin testi, cross-immunoelectrophoretic blotting, radio immunoassay (RIA), immuno peroxidase test ve ELISA testleridir (1). Bu hastalığın teşhisinde rutin olarak kullanılan testler içinde en yaygın olanı CF testidir. Klinik belirti gösteren hayvanlarda AGID testi son zamanlarda CF testinden üstün tutulmaktadır. Bu test yüksek oranda spesifik çalışmasına rağmen, subklinik ve preklinik taşıyıcıların tesbitinde yeterli derecede duyarlı olmadığı belirtilmektedir (51). AGID testinin spesifitesi M.phlei ile preabsorbsiyon sayesinde küçümsenmeyecek ölçüde geliştirilmiş, fakat yine de ELISA kadar duyarlı olmamıştır (50).

Son zamanlarda paratüberkülozun teşhisinde ELISA yöntemi üzerinde çalışmalar yapılmakta ve bu yöntemde yüksek oranda gelişmeler bildirilmektedir. Paratüberkülozlu sığırların serumunda M.paratuberculosis'in antijeni olarak kullanılan ELISA testi ile gaita kültür testi arasında iyi bir korelasyon olduğu ve ELISA'nın immunodiffusiondan daha hassas olduğu söylenebilmektedir. Yine de diğer mikrobakterilere maruz kalmış hayvanların serumlarında güçlü çapraz reaksiyonlara (non spesifik reaksiyon) rastlanılmaktadır (64). Test edilen serumların M.phlei ile preabsorbsiyonu yanlış pozitif reaksiyonları önemli ölçüde ortadan kaldırmış, ELISA yöntemindeki non spesifik reaksiyonları elimine etmek için araştırmalar sürdürülmektedir (65).

Paratüberkülozun teşhisi için ilk kullanılan testlerden biri M.paratuberculosis'in ekstraktı olan Johnin testidir. İntradermal olarak enjekte edilen purifiye protein türevleri (PPD Johnin, PPD Avian) kullanılır. Duyarlı bir hale gelmiş bir hayvanda lokal bir hücresel yanıt oluşturur. (Gecikmiş tipte aşırı duyarlılık) Test sonuçları 72 saat sonra okunur ve değerlendirilir. Sistemik testlerde intravenöz Johnin de kullanılmaktadır. Bu test iki şekilde değerlendirilmektedir. Bunlardan birincisi enjeksiyondan 6 saat sonra meydana gelen ısı artışı, diğeri lökosit yanıtında nötrofillerin lenfositlere oranının enjeksiyon öncesine göre iki kat veya daha fazla olması şeklinde değerlendirilmektedir (57).

Hasta hayvanlar hastalığın bazı devrelerinde ve avian tüberküline karşı allerji doğururlar. Bir çok araştırmacı, paratüberkülozun teşhisi için johnin ve avian

tüberkülinlerle allerjik testleri kullanmışlardır. Bu iki biyolojik maddenin üretimleri arasında tek fark Johnin tüberkülinin hazırlanmasında kullanılan suşun M.paratuberculosis orijinli olması ve avian'a göre daha spesifik çalışması (yanıt vermesi) dir ki bu iki tip arasında antijenik yakınlık mevcuttur (14).

Paratüberkülozlu hayvanlarda hastalığın başlangıcında avian tüberküline karşı kuvvetli reaksiyon alınırken, klinik devreye yaklaşan hayvanlarda ise reaksiyonun azaldığı veya kaybolduğunu, paratüberkülozlu bir sığırın bir seneden fazla bir zaman avian tüberküline karşı kuvvetli reaksiyon gösterdiğini ve bu reaksiyonun kaybolması ile klinik belirtilerin çıktığı gözlenmiştir (53).

Bu gün, paratüberkülozun teşhisinde kesin bir diagnostik yöntem ortaya konamamıştır. Bu konuda yapılan araştırmalarda bir kısım araştırmacılar serolojik yöntemleri ön planda tutarken, diğerleri tüberkülin (PPD Avian ve Johnin) uygulayarak enfekte hayvanların ayırt edilebileceğini belirtmektedir. Gaitanın bakteriyolojik kültür ile muayene yönteminin bir çok araştırmacı tarafından güvenilir bir yöntem olduğu söylenmekle beraber, uzun süre alması ve negatif olgularda 6 aylık aralıklarla en az 2-3 kez gaita kültürünün yapılması gerekliliği vurgulanmaktadır. (54)

MATERYAL VE METOD

MATERYAL: Çalışmamızda Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü'ne (TİGEM) ait Bala, Ceylanpınar, Çukurova, Karacabey ve Kumkale Tarım İşletmelerinden temin edilen 5118 adet kan serumu, 4923 sığıra uygulanan ve değerlendirilen allerjik test sonuçları ile, 145 hayvandan alınan gaita örnekleri ve R.M.K.'ları araştırma materyalimizi oluşturmuştur.

METOD

a) Serolojik Teşhis: Serolojik teşhis için kan örnekleri, allerjik yoklamadan önce alınmıştır. Elde edilen serum örnekleri paratüberküloz yönünden önce tüp CF testi ile ve M.paratuberculosis'in 3/5 path. suşu kullanılarak hazırlanan antijen ile işlendi. Bu testte pozitif ve şüpheli bulunan serumlar, deepfreeze de saklanıp

daha sonra M. avium'un D₄ER suşu ile hazırlanan antijenle CF metoduyla işlenip (Bu suşlar Weybridge Central Veterinary Labaratuvarlarından temin edilip, labaratuvarımızda saklanan suşlardır) değerlendirildi. Serum örnekleri 1/5 oranında fenollü tuzlu su ile sulandırılarak kullanıldı (16,31,44,62).

b) Allerjik Testler: Allerjik teste labaratuvarımızda üretilen PPD avian ve PPD johnin tuberkülin intradermic olarak 0.1 ml. uygulandı. Testte önce PPD avian tuberkülin uygulanmış avian ve serolojik teste reaktör hayvanlara daha sonra PPD johnin uygulanmıştır. Sonuçlar 72 saat sonra deri kalınlığındaki artışlar ölçülerek 0-3 mm.lik artış negatif, 3-4 mm. arası şüpheli, 4 mm. ve üzeri müsbet olarak değerlendirildi. Kullanılan her iki tuberkülinin son konsantrasyonundaki aktif tuberküloprotein miktarı 0.5 mg/ml ve 25.000 I.U.'dır.

c) Gaita kültürü ve rektal mukoza kazıntısının bakteriyolojik muayenesi: Serolojik allerjik testlere pozitif ve şüpheli reaksiyon veren hayvanlardan rektal mukoza kazıntıları ve gaita örnekleri alınarak bakteriyolojik muayene yapılmıştır.

Gaita örnekleri kapalı ve steril tüplere alınarak labaratuvara getirildi. 2-3 gr. gaita 40 ml. steril distile su ile karıştırılıp partiküllerin çökmesi için 1 saat beklenmiş, süre bitiminde üstte kalan süpernatant süspansiyon 5 ml. ölçüsünde başka bir tüpe alındı. Bu süspansiyona 20 ml. %0.3'lük benzalkonium klorid konarak karıştırıldı ve bir gece oda derecesinde tutulup bu süre sonunda sedimentten 0.2 ml. 3 adet mycobactinli 1 adet mycobactinsiz Herrold egg besi yerine ekildi, besi yerleri bir hafta yatık olarak tutuldu.

Ekim yapılan besi yerleri 37 derecede 12 hafta saklanıp her gün kontrolleri yapıldı.

Gaita örnekleri alınan hayvanlardan ayrıca R.M.K. örnekleri alınıp lam üzerinde ezme preparat yapıldı. Ziehl-Neelsen boyama metoduyla boyanarak değerlendirildi (22,38).

BULGULAR

Paratuberkülozun çeşitli diagnostik yöntemlerle teşhisi amacı ile TIGEM'e bağlı 5 ayrı işletmede yapmış olduğumuz çalışmalar ve elde etmiş olduğumuz sonuçlar genel ve işletme bazında aşağıda verilmiştir.

GENEL DEĞERLENDİRME

Araştırmanın yapıldığı Tarım İşletmelerinden temin edilen 5118 adet kan serum örnekleri M.paratuberculosis ve M.avium'un standart suşları ile hazırlanan antijenlerle CF testi ile işlenerek değerlendirilmiş ve aşağıdaki sonuçları alınmıştır.

	<u>Ptb.Antijen</u>	<u>Avian Antijen</u>
Serum adedi: 5118	5118	115
Serum dilüsyonu:	1/5	1/5
Müsbet reaksiyon:	85	76
Şüpheli reaksiyon:	30	18

(Allerjik test sonuçlarına göre) 4923 sığıra tüberkülin tatbik edilip;

-PPD avian'a 73 pozitif ve 19 şüpheli reaksiyon alındı.

-Allerjik ve serolojik teste sonuçlarına göre pozitif ve şüpheli hayvanlar sürüden ayrı bir yerde izole edildi. Bu sığırlara 2 ay sonra PPD johnin tüberkülin uygulandı. 145 sığıra uygulanan PPD Johnin tüberkülin test sonuçlarında 52 pozitif 6 şüpheli reaksiyon alındı.

-Ayrıca allerjik ve serolojik reaksiyon alınan bu 145 sığırdan temin edilen gaita ve rektal mukoza kazıntısı (R.M.K.) örneklerinin bakteriyolojik muayenesinde 15 adet M.paratuberculosis izole edildi.

-Yine bu gaita numunelerinden 9 adet M.phlei izole edilmiş, R.M.K. kazıntı örneklerinin mikroskopik yoklamalarında 4 pozitif sonuç elde edilmiştir.

İŞLETME BAZINDA YAPILAN ÇALIŞMALAR

Karacabey Tarım İşletmesi: İşletmeden temin edilen 1879 sığır kan serumunun yapılan serolojik muayenesinde 28 pozitif 9 şüpheli reaksiyon alınmıştır.

-Allerjik test sonuçlarına göre, sürüye uygulanan (1978 sığır) tüberkülin tatbikatında PPD avian'a karşı 15 pozitif 6 şüpheli reaksiyon gözlenmiştir.

Sürüye uygulanan allerjik teşhiste reaksiyon gösteren 2 pozitif ve 3 şüpheli sığır, serolojik testte negatiftir. Avian tüberküline reaksiyon veren diğer sığırlar serolojik test sonuçlarında reaktör olarak tesbit edilmiştir.

-Allerjik ve serolojik reaksiyon veren (42 adet sığır) hayvanlar işletmede ayrı bir yerde izole edilerek bunlardan R.M.K. ve gaita örnekleri alınmış ve 2 ay sonra PPD johnin uygulanıp, 12 pozitif 2 şüpheli yanıt alınmıştır.

Gaita kültürleri sonucu 9 gaita numunesinden M.paratuberculosis izole edilmiştir.

-7 adet gaita numunesinden de karanlık ve ışıpta turuncu renkte pigment oluşturan ve besi yerinde çabuk üreyen (5. günde) M.phlei izole edilmiştir.

-R.M.K. örneklerinden 3 adet müsbet sonuç alınmıştır.

Gaita kültürleri pozitif olarak bulunan 9 sığırın yavrularında allerjik test sonuçları incelendiğinde bu yavrulardan dördünde PPD avian'a karşı reaksiyon gözlenmiş, gözlem altında tutulup tekrar PPD avian ve PPD johnin tüberkülin uygulanmış, aynı zamanda kan serumları ve gaita örnekleri alınmıştır. Alınan sonuçlarda 3 yavru da allerjik, serolojik ve gaita örnekleri negatif, sadece birinde PPD avian'a ve PPD johnin'e müsbet yanıt saptanmış, gaita kültürü negatif sonuç vermiştir.

Allerjik

	Serolojik	PPD Avian	PPD Johnin	R.M.K.	Gaita Kültürü
1	-	+	+	-	+
2	+	+	+	+	+
3	-	+	+	-	+
4		?	+	-	+
5	*?	?	+	+	+
6	*+	-	+	+	+
7	-	?	+	-	+
8	-	+	+	-	+
9	+	?	-	-	+

** 5 ve 6 no'lu hayvanlar kesime tabi tutulmuş mikroskopik ve bakterioskopik pozitif olarak bulunmuştur.

-Bu işletmede allerjik test kullanılarak bir çalışma yapıldı. Aynı zamanda sığırcılık ünitesi içinde ahır, ahır çevresinde periyodik temizlik ve dezenfeksiyon uygulandı. Allerjik test 6 ay ara ile uygulanıp reaksiyon gösterenler kesime tabi

tutuldu, bu süre sonunda yıllık rutin tüberkülin uygulamasına geçildi.

1992 yılında uygulanan tüberkülin testinde PPD aviana 2 PPD johnine 1 müsbet reaksiyon alınmış, 1993 yılında tüm sürüye uygulanan tüberkülin testinde hiç bir reaksiyon gözlenmemiştir. Laboratuvarımıza random usulüyle seçilerek gönderilen 780 adet kan serumunun muayenesinde bir adet şüpheli reaksiyon alınmıştır.

Bala Tarım İşletmesi: 394 sığırdaki yapılan serolojik teşhiste 17 müsbet (reaktör), 5 şüpheli reaksiyon alınmıştır. 418 sığıra uygulanan tüberkülin tatbikatında PPD aviana 8 pozitif 8 şüpheli reaksiyon alınmıştır.

PPD aviana şüpheli reaksiyon veren 2 reaktör serolojik testte negatif bulunmuş olup, 25 adet sığır izole edilerek bu sığırlardan 2 ay sonra gaita, R.M.K. alınarak PPD johnin uygulanmış ve 4 sığır pozitif olarak bulunmuştur.

-Gaita örneklerinden bir adet M.paratuberculosis izole edilmiştir. Bu hayvanda serolojik ve allerjik test pozitif bulunmuştur.

-Rektal mukoza kazıntı örneklerinden 2 adedi şüpheli olarak değerlendirilmiştir.

-İşletmede ilk uygulama sonuçlarından bir yıl sonra uygulanan tüberkülin tatbikatında 21 sığır PPD aviana karşı reaksiyon vermiş, bu reaktörler ayrı bir yerde izole edilerek 6 ay ara ile 2 kez gaita numunesi R.M.K. örnekleri bakteriyolojik yoklamaya tabi tutulmuş bunlardan menfi sonuç alınmıştır. Ayrıca bu sığırlara uygulanan PPD johnin tüberküline karşı 1 pozitif 1 şüpheli reaksiyon alınmış, bu hayvanlar kesime tabi tutulmuş, yapılan bakteriyolojik yoklamada negatif sonuç alınmıştır.

-Allerjik test sonuçlarındaki farklılık dikkatimizi avian tüberküline karşı reaksiyona neden olabilecek etkenleri araştırmaya çekmiş bu konudaki çalışmamızda özellikle kış aylarında işletmeye yoğun sığırcık kuşlarının geldiği gözlenmiş, temin edilen kuşların laboratuvarımızda barsak ve barsak içeriğinden bakteriyolojik yoklama yapılmış; gliserinli, gliserinsiz ve L.Jensen besi yerinde üreyen atipik AAR basil izole edilmiştir. İzole edilen atipik AAR bakteriler 6 kobaya intraperitoneal verildi. Kobaylara 45 gün sonra eşit konsantrasyonda PPD bovin, PPD avian ve PPD johnin tüberkülin (1/25 sulandırarak) 0.1 ml. intradermik olarak enjekte edildi. 48 saat sonra reaksiyonlar değerlendirildi. Buna göre PPD bovin tüberküline karşı hayvanlarda reaksiyon alınmadı. PPD avian tüberküline karşı hepsinde reaksiyon görüldü. PPD johnin tüberküline karşı 2 kobayda PPD

aviana göre daha düşük bir reaksiyon gözlemlendi.

Kobaylar öldürüldü, post mortem incelemelerde organ ve lenf yumrularında, enjeksiyonun yapıldığı bölge dahil olmak üzere herhangi bir lezyona rastlanmadı.

Çukurova Tarım İşletmesi: Bu işletmeden temin edilen 386 kan serumu örneğinin serolojik muayenesinde 6 pozitif 5 şüpheli reaksiyon alınmıştır.

- 377 sığırdan yapılan tüberkülin sonucunda 25 hayvanda aviana reaksiyon alınmıştır. Aviana karşı reaksiyon alınan bu hayvanlardan serolojik teşhisde sadece 1 pozitif ve 2 şüpheli reaksiyon gözlenmiştir.

- PPD johnin uygulamasında PPD aviana karşı reaksiyon vermiş olan 25 sığırdan 24'ü pozitif olarak bulunmuştur.

Serolojik teşhise müsbet ve şüpheli reaksiyon veren 8 sığır ise PPD johnine negatif sonuç vermiştir. 33 sığırdan temin edilen gaita numunesi negatif bulunmuştur.

- Ülkemizde canlı tüberküloz aşısı ilk ve tek olarak bu işletmede uygulanmış, bu aşının 1988 yılında uygulanmasına son verilmiştir. PPD johnin tüberküline karşı fazla miktarda pozitif sonuç alınmış, bunun nedenlerine inildiğinde bu hayvanlardan 24 adedinin paratüberküloz aşılı oldukları tesbit edilmiştir.

-Allerjik ve serolojik test sonuçlarına göre reaktör sığırlardan 6'şar ay ara ile üç kez gaita ve R.M.K. alınarak muayene edilmiş, yapılan kültür ve mikroskopiden negatif sonuç alınmıştır. Bir adet aşısız iki adet aşılı sığır kesilerek paratüberkülozdan diagnostik özellik taşıyan organlar laboratuvarımıza gönderilmiş, yapılan muayene sonuçları negatif bulunmuştur. Burada almış olduğumuz reaksiyonların aşıya bağlı olduğu kanısına varılmıştır.

Ceylanpınar Tarım İşletmesi: Temin edilen 2130 adet kan serumunun serolojik muayenesi sonucu 27 pozitif 8 şüpheli sonuç alınmıştır.

-Allerjik test sonuçlarına göre; 1840 sığırdan PPD aviana 18 pozitif 5 şüpheli reaksiyon gözlenmiştir.

- Allerjik testlere reaksiyon gösteren 23 sığırdan 14'ü serolojik testte pozitif bulunmuştur.

- Bu işletmeye gidilememiş, izole edilen sığırlar sadece allerjik testlere reaksiyon gösteren hayvanlar olduğundan bunlardan temin edilen (İşletme Veteriner Hekimince elden getirildi) gaita örneklerinden yapılan kültürlerde 4 adet M.paratuberculosis izole edilmiştir. PPD johnin tatbikatında 12 pozitif 4 şüpheli reaksiyon alınmıştır.

Allerjik

No	Serolojik	Avian	Johnin	*R.M.K.	Gaita
1	+	?	+	Yapılmadı	+
2	-	+	+	"	+
3	-	+	?	"	+
4	+	+	+	"	+

*R.M.K. kullanılmadı.

- Ayrıca gaita kültürlerinden 2 adet M.phlei izole edildi.

Kumkale Tarım İşletmesi: İşletmeden temin edilen 329 kan serumunun serolojik muayenesi sonucu 11 pozitif 3 şüpheli sonuç alınmıştır.

- 310 sığıra uygulanan tüberkülin testinde 7 pozitif reaksiyon alınmıştır.

- Allerjik testde reaksiyon veren 7 sığırdan 5'inde serolojik muayene sonuçları pozitif olarak bulunmuştur.

-PPD johnin uygulamasında 1 pozitif tesbit edilmiştir.

- Temin edilen gaita örnekleri besi yerlerinde kontamine olduğundan değerlendirilememiştir (Tekrar temin edilememiştir).

- Serolojik testlere, PPD avian ve PPD johnin'e pozitif yanıt veren 1 sığır kesime tabi tutulmuş, gönderilen numunelerden (barsak. mediastinal lenf bezi) mikroskopik ve kültür sonucu M.paratuberculosis izole edilmiştir. Ayrıca patoloji laboratuvarımızda "Enteritis paratuberculosis" teşhisi konmuştur.

TARTIŞMA

Dünyanın her yerinde görülen paratüberkuloz bu gün sığır yetiştiriciliğinin en ciddi problemi olarak kabul edilmektedir.

Paratüberkulozun kontrolü için çok sayıda diagnostik test denenmiştir. Hastalığın çok yavaş ilerleme göstermesinden dolayı genellikle hayvanın enfeksiyonu almasından sonra iki yıl geçene kadar klinik belirti görülmemektedir. 4 aylık gibi genç ve 15 yıllık gibi yaşlı olan hayvanlarda hastalık teşhis edilmiş olmasına rağmen, tipik olarak klinik belirtilerin başlaması 2-5 yaş arasında olup, teşhis yöntemlerinin hastalığın belirli dönemlerinde önem taşıdığı belirtilmektedir ve mevcut diagnostik testlerin ideal olmamasına rağmen son

yıllarda bu konuda gelişmeler sağlanmıştır (8).

Paratüberkülozun teşhisi için ilk kullanılan testlerden biri PPD johnindir. Intradermal PPD johninin eski (HCSM) PPD johnine nazaran daha spesifik olduğu ve üretimde kullanılan suşların antijenik yakınlığı nedeniyle teşhiste gerek johnin ve gerekse avian tüberkülin kullanılabilceği, reaksiyon sonuçlarında pek fazla rastlanmadığı kanaatine varılmıştır (39,43).

PPD johnin intradermik kullanım yolu dışında intravenöz olarak da kullanılmış fakat intradermik uygulamanın daha pratik ve spesifik olduğu belirtilmiştir (24).

Çalışmamızda bizim de kullanmış olduğumuz allergen, laboratuvarımızda üretilen PPD avian ve PPD johnin olup, kullanım yolu olarak pratik olması nedeniyle bizim de tercih ettiğimiz intradermik uygulamayı kullandık.

4923 sığırdada uygulanan PPD avian ve PPD mammalian tüberkülin sonuçlarında aviana karşı 73 pozitif ve 19 şüpheli reaksiyon alınmış, aviana reaksiyon alınan sığırlara uygulanan PPD johnine karşı 52 pozitif 6 şüpheli reaksiyon gözlenmiştir. Avian ve johnin suşları arasında antijenik yakınlık olsa da alınan reaksiyonlarda yine de bir ölçüde fark görülebilmektedir. Karacabey Tarım İşletmesi'nde PPD aviana 15 pozitif, 6 şüpheli, PPD johnine 12 pozitif, 2 şüpheli reaksiyon alındı. Gaita kültürleri müsbet bulunan 9 sığırın 7'sinde avian ve johnine karşı yanıt alınıp, 1 sığırdada avian şüpheli johnin negatif, diğerinde avian negatif johnin pozitif olarak bulundu. Buna benzer diğer işletmelerde yaptığımız çalışmalarda dikkatimizi çeken diğer bir noktada Bala Tarım İşletmesi'nde ikinci kez uygulanan tüberkülin tatbikatında PPD aviana 21 sığırdada yanıt alınmış, bu sığırlardan 2 adedi (1 pozitif, 1 şüpheli) PPD johnine reaksiyon vermiştir. Bu sığırlardan yapılan gaita kültürleri negatif bulundu. 2 reaktör sığırın kesilmesinden sonra bakteriyolojik ve histopatolojik yoklamalar negatif bulundu. Bu işletmeden izole ettiğimiz. (kuşlardan) atipik AAR bakterinin sığırlarda avian tüberküline karşı reaksiyon oluşturduğu, hatta izole edilen bu bakteri ile kobaylar sensibilize edilerek karşılaştırmalı tüberkülin uygulamasında PPD aviana yüksek derecede reaksiyon gözlendi ve sığırlarda bu etkene bağlı homolog bir yanıt olduğu kanısına varıldı.

Ülkemizde intradermik johnin ile patolojik değişikliklerin uygunluk derecesi konulu bir araştırmada bu oran %56.4 olarak bulunmuştur (2). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada gaita kültür pozitifliğine göre %29 olarak görünüyorsa da, gaita kültürü müsbet olarak bulunan sığırlarda PPD johnin müsbetliği %80

dolaylıdır.

Paratüberküloza karşı aşı uygulaması tüm ülkelerde sınırlı bir şekilde uygulanmış, bu uygulama canlı ve inaktif aşılarla yapılarak aşının taşıyıcı durumundaki hayvan sayısını ve enfekte hayvanlarda yayılan organizm sayısını azalttığı ancak aşılanan sürülerin hastalıktan ari olarak da kabul edilemez olduğu ve aşılı hayvanların tüberkülin testlerinde pozitif reaksiyon doğuracağı, özellikle tüberkülozun eradike edilemediği ülkelerde paratüberküloz aşısının kontrendike olduğu belirtilmektedir (8,60).

Çalışmamızın yapıldığı Çukurova Tarım İşletmesinde, ülkemizde ilk kez canlı (mikroorganizma, parafin likit ve pumik stone içinde süspanse edilerek hazırlanmış) paratüberküloz aşısı uygulanmıştır. Bu uygulama 1988 yılından sonra bırakıldı.

Bu işletmede yapılan çalışmada PPD avian ve PPD johnine karşı pozitif reaksiyonların, gaita kültürlerinin 6'şar ay ara ile 3 kez incelenmesi ve negatif bulunması, aşılamaya bağlı olduğu kanısına varılmıştır. Aşı yapılan işletmede kontrol tedbirleri ve izlenme kolaylığı bulunduğu için aşılama yarar sağlanabilir. Yukarıda belirtildiği gibi aşının taşıyıcı durumundaki hayvanlardan yayılan organizm sayısını azalttığı, ancak bir çok faktörlerin aşılanan sürülerde hastalıktan yoksun olamayacağı nedeniyle büyük çapta aşılamanın faydalı olmayacağı görüşüne katılmaktayız. Bu çalışmada gözlemediğimiz diğer bir noktada PPD mammaliana karşı reaksiyona rastlanılmamasıdır.

Paratüberkülozun rastlandığı büyük sürülerde bu hastalıkla mücadele için değişik teşhis metodları ile mücadele yöntemleri kullanılmıştır. Bir kısım araştırmacılar, serolojik testleri diğerleri allerjik yöntemleri kullanmışlardır (45,47).

Karacabey Tarım İşletmesinde allerjik test, periyodik temizlik, temizlik sonrası dezenfeksiyon ile mücadeleye gidilmiş. 1990 yılında 34 sığır, 1991 yılının ilk 6 ayında 16, ikinci 6 ayında 11 sığırdan reaksiyon alınıp kesime tabi tutuldu. 1992 yılında 2 sığır reaksiyon gösterdi. 1993 yılında tüm sürüde menfi reaksiyon alınmış olup, bu işletmede kontrol ve diğer önlemler sürdürülmektedir. Elde edilen bu sonucu önceden uygulanan mera sisteminden padok sistemine geçilmesinin de rolü olduğu sanılmaktadır.

Mukozal frotilerin veya biyopsilerin muayeneleri ile asit-fast organizmaların görülmesi teşhise yardımcı olur. Kalın barsakların son iki üç feetlik bölümü rektal lezyonlar gösterdiğinden örneklerin buradan alınması uygun olur. Bu yöntemde

bir çok hatalı negatif sonuçlar da elde edilebilir. M.phlei gibi asit-fast organizmalar, Johne organizmaları ile karışabildiğinden hatalı pozitif sonuçlara da varılabilir. M.paratuberculosis, kümeler halinde ya da makrofajlar içinde görülmelidir. (8,54)

Biz de usulüne uygun olarak aldığımız 92 adet R.M.K. örneklerinden 4 pozitif sonuç aldık. Mikroskopik olarak incelediğimiz bazı preparatlarda tek veya bir kaç bir arada şüpheli olgulara rastladık ve bunlar spesifik görülmediğinden negatif olarak değerlendirildi. R.M.K. nın tek başına yeterli olmadığı kanısındayız.

Paratüberküloz için çok sayıda serodiagnostik test denenmiş, şu anda rutin olarak üç serolojik test kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygın olanı CF (komplement fikzasyon) testidir.

Klinik semptom gösteren veya paratüberküloz tesbit edilen hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda CF'nin % 80 ile % 90 arasında müsbet olduğunu, menfi sığırlar üzerinde yapılan çalışmalarda ise % 90 ile % 96 arasında CF testi ile menfi sonuç alınmıştır. Hastalığın başlangıcında allerjik testlerin CF testine oranla daha iyi çalıştığını belirtmiştir. (23)

Araştırmamızın yapıldığı işletmelerde sığırlarda paratüberkülozun klinik belirtilerini açık şekilde gösteren bir hayvana rastlanmamıştır. Sadece müsbet bulunan hayvanların bazılarında aralıklı ishal ve sürü özelliğine göre de zayıflık vardı. Bulunan müsbetlerde enfeksiyonu subklinik veya latent enfeksiyon olarak tanımlayabiliriz. Genel değerlendirmede CF testinde % 2,25 reaktör bulundu. İç Anadolu'da bulunan Tarım İşletmelerinde yaptığımız bir çalışmada ise % 2,7 pozitif sonuç bulup, (59) gaita kültürü pozitif bulunan 15 sığırdan serolojik teşhisde 11 pozitif, yani % 73,2 hastalığı teşhis edici sonuç alınmıştır ki bu oran PPD johninde % 92,3'dür.

Paratüberkülozun serolojik teşhisinde çeşitli antijen ve antijen modifikasyonları kullanılarak karşılaştırmalı çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiş. Yine serum sulandırılmalarında 1/8 ile 1/32 titrede pozitif serumlarla çalışmada yarıyarıya pozitifliğin düştüğü gözlenmiştir.

Temin ettiğimiz kan serum örneklerinden pozitif olarak ayrılan 115 adet (85 pozitif, 30 şüpheli) serum örnekleri CF testi ile avian antijen kullanarak test edildi. 76 pozitif 18 şüpheli reaksiyon alındı. Her iki test arasında uyarlılık % 82,7, fark ise % 7,3 olarak görüldü. Serum örnekleri de 1/5 lik sulandırma ile değerlendirildi. (31)

Klinik semptom gösteren ve dışkılarında bakteri tesbit edilen hayvanlarda

Agar-gel immunodiffüzyon presipitin testi sonuçları arasında bir paralellik olmasına rağmen, bu testin subklinik veya preklinik taşıyıcıların tesbitinde yeterli derecede duyarlı olmadığı, bunun yanında AGID testlerinin spesifitesi M.phlei ile preabsorbsiyon sayesinde küçümsemeyecek ölçüde geliştirilmiştir. (50)

AGID testinin belirli bir üstünlüğü bir çok araştırmacı tarafından belirtilmekle beraber özellikle subklinik paratüberkuloz olgularında ve bir çok otoriteler tarafından tek başına bu hastalığın teşhisinde yeterli olmayacağı belirtilmektedir. Biz de bu kanıyı taşımaktayız. Özellikle sürü bazında diğer testlerle desteklenmesi gerekir.

Bunun yanında paratüberkulozun ELISA yöntemleri ile teşhisinde yüksek oranda gelişmeler bulunmaktadır. NADC suş 18 ile hazırlanan protoplasmik antijenlerin daha spesifik reaksiyon doğuracağı, spesifiteyi geliştirecek diğer bir gelişmede test serumuna M.phlei suspansiyonunun absorpsiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Yine de bu testde bazı nonspesifik reaksiyonlara rastlanmaktadır. (64)

Paratüberkulozun teşhisinde ELISA konusunda yapılan çalışmaların daha yüksek duyarlılık (spesifik) göstereceği kanısındayız.

Çukurova harasında aşılı hayvanlar üzerinde yapılan çalışmada bovine gamma interferon EIA testini bu hayvanlardan temin edilen plazmada çalıştık. PPD avian ve bovin tüberkulinlerle sensibilize edilen plazmalarda negatif sonuç aldık.

Paratüberkulozun kesin teşhisinin konduğu tek yöntemin dokular ya da gaitadan yapılan kültürler olduğu yapılan çalışmaların ışığında sürü bazında hayvanların en az % 20 enfeksiyon taşıdığı durumda ve en az % 50'sinin teste tabi tutulduğu durumlarda, gaita kültürü % 100 spesifik ve hemen hemen % 100 duyarlıdır. İndividual olarak hayvanlarda fekal kültür eğer o hayvanın her gram gaitasında 100 adetten fazla organizm varsa duyarlı olduğu belirtilmektedir. Kültür yapmada en büyük dezavantaj organizmin üremesi için gereken zamandır. (37)

Hastalıkların teşhisinde en güvenilir metod, hastalığa neden olan etkenin ortaya konmasıdır. Paratüberkulozda hala diğer diagnostik yöntemlerde nonspesifik reaksiyonlara veya pozitif olgularda negatif sonuçlara rastlanmaktadır. Bu nedenle gaita kültürü kesin tanı için uygun bir yöntemdir.

Gaita kültürlerinden elde etmiş olduğumuz 15 adet M.paratuberculosis'in

12'si 7. haftada, 3 suşun ise 8. haftada primer identifikasyonu yapılmıştır.

Teknikteki bazı değişiklikler gaita kültürlerin deki diagnostik kabiliyetin artmasına neden olmuş. Besi yerinde Mycobactin-P Mycobactin-j kullanılmış. Bu, gerekli inkubasyon periyodunun azalmasına koloni sayısında artışa neden olacağı ve besi yerine katılan sodyum piruvat'ın da M.paratüberculosis'in hızlı üremesine neden olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda, gaitanın bakteriyolojik yoklamasında besi yerine üreme faktörü olarak Mycobactin -P'yi kullandık. Her ne kadar Mycobactin-J besi yerinde üreme zamanını kısalttığı belirtilmişse de izole ettiğimiz suşların 7 ile 9 hafta içinde üredikleri ve bu sürenin de M.paratüberculosis'in üremesi için normal bir süre olduğu bilinmektedir. Araştırmamızın metodunda seçtiğimiz besi yerinde (Herrold egg) sodyum piruvat kullanılmamakta; bu besi yerinin modifikasyonlarında besi yerine katılmakta olup, sodyum piruvatın bazı suşları inhibe ettiği de söylenmektedir.(4)

Gaita kültürlerinin diagnostik değerlerini arttıran bir faktörde dekontaminantların kullanılmasıdır. Bu nedenle benzalkonium klorid ve heksadecylpyridinium kullanılmaktadır. Biz dekontaminant olarak benzalkonium kloridi kullandık. Gaita kültürlerinde kontaminasyonlara rastladık. Bu kontaminasyonların gaita örneklerinin laboratuvara transfer süresinin uzaması sonucu oluştuğu kanısındayız.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Paratüberkülozun teşhisinde, özellikle subklinik enfeksiyonların tanısında diagnostik testlerin yeterli olmayışı bu hastalığın eradikasyonunu ve kontrolünü güçleştirmektedir.

Gaita kültür metodlarıyla subklinik olarak enfekte hayvanların yalnızca bir kısmı ortaya çıkabilse de sürünün hastalık taşıyıp taşımadığının anlaşılması ve enfeksiyonun seyrinin takibi yönünden önemlidir.

Bu çalışmada allerjik testlerin diğer testlerle desteklenerek kullanımı, paratüberkülozla mücadelede ve nonspesifik reaksiyonların ortaya çıkarılmasında bir unsur olarak görülmüştür. Bulaşma yolu ve konakçı hassasiyetinin göz önünde tutularak uygulanan hijyen, temizlik ve

dezenfeksiyonun kontrol ve eradikasyonda önemi büyüktür.

Paratüberkülozun sürüde teşhisi için allerjik, serolojik ve gaita kültür muayene yöntemlerinin birlikte kullanılması kontrol ve mücadelede faydalı olacaktır. Özellikle serolojik teşhiste ELISA test yönteminin geliştirilerek kullanımının paratüberkülozun teşhisinde önemli bir rol oynayacağı kanısındayız.

KAYNAKÇALAR

1. Abbas B. Riemann H.P., Linnerdal B. (1983): Isolation of specific peptides from Mycobacterium paratuberculosis protoplasm and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of paratuberculosis in cattle. Am.J.Vet.Res.1983;44:2229-2236.
2. Albaşoğlu, M., Demirer, F., Yücel, N. (1969): Paratüberkülozda allerjik reaksiyonların patolojik bulgularla uygunluk derecesi üzerinde araştırma. Ankara Üniversitesi Vet.Fak.Derg. 16-3: 236-256.
3. Belletti, G.L., Zuvenella, M. (1987) : L'esame colturale delle feci per la diagnosi di paratuberculosis. Selezione Veterinaria, 20-6: 891-896.
4. Berg. J.J. (1982): An improved medium for culture of M.paratuberculosis from bovine faeces. Acta Vet. Scand. 23: 325-335.
5. Buerget, C.D., Delisle, G., and Hall, C.E. (1978): Am.J.Vet.Res. 39: 591-594).
6. Buerget, C.D. and J.R.Duncan (1978): And Milk Production data of cattle culled from a dairy herd with paratuberculosis. J.Amer.Vet.Med.Assoc. 173: 478-480.
7. Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J. and Merkal, R.S. (1984): Ruminant paratuberculosis (Johnie disease): The current status and futur prospects. Cornell Vet. 74: 218-264.
8. Cloude, K.T. and Roussel, A.J. (1987): Paratuberculosis: A review; The Southwestern Veterinarian.38.1: 25-31.
9. De Lisle, G.W., B.S. Samagh and J.R. Dunccan (1980): Bovine paratuberculosis.11.A comparison of fecal culture and theantibody response. Can.J.Comp.Med.44: 183-191.
10. Demirer, F., Yücel, N.(1964): Çifteler Harası ile Alpu'daki Mesut

Zeytinoğluna ait çiftlikteki sığırların gaitasından *M.paratuberculosis* (Johne's) in memleketimizde ilk izolasyonu. Türk Vet.Hek.Derg.34.3-4:170-171.

11. Desmecht, M. (1975): *Annales Medicine Veterinaire*. 119,371.
12. Doyle, T. M. (1945): Isolation of Johne's bacilli from the udders of clinically affected cows. *Br.Vet.J*.110:215-218.
13. Doyle, T.M. (1956): *Veterinary Record*. 68.869.
14. Doyle, T.M. (1959): Johne's Disease in Infectious disease of animals, Disease due to bacteria, by stabforth. A.W. and Galloway, I.A. Butterworths Scientific Publications, London.1:319-345.
15. G. Benedictus, A A. Dijkhuizen, J. Stelwagen. (1987): Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Veterinary Record*. (1987) 121: 142-146.
16. Hole, N.H. (1956): Johne's disease in bovine infection and spread, epidemiology, diagnosis in control of Johne disease in cattle, sheep and goats. *Org. Ec. Coop. Paris Proj*. 207: 83-120.
17. Hutchison, L.J. et all.(1986): Johne's disease what we know. What we need to know. *Animal Health and Nutrition*. 41: 24-28.
18. Johne, H.A. and Frothingam, L. (1895): *L. Dtsch*. 2. Tiermed 21.438. Cited by Hagan, W.A. and Bruner, D.W. the infectious disease of domestic animals. Ithaca. New York, (1961): 416-431.
19. Jorgensen, J.B. (1977): *Nord Veterinariaer Med*. 29:267-270.
20. Jorgensen, J.B. (1982): An improved medium for cultur of *M.paratuberculosis* from bovine faeces. *Acta Vet. Scand*. 23:325-335.
21. Jullian, R.J. (1975): A short review and some observations on Johne disease with recommendations for control. *Can. Vet. J*. 16: 33-43.
22. Laboratory methods in veterinary mycobacteriology. Ames, Iowa: Mycobacteriology Unit, National Veterinary Services Laboratories, APHIS, USDA, 1985.
23. Larsen, A.B.,K.E. Vardaman and R.S. Merkal (1963): An extended study of a herd of cattle naturally infected with Johne disease. *Am. J. Vet. Res*. 24: 948-950.
24. Larsen, A.B. and Kopecky, K.E. (1965): Studies on the intravenous administration of johnin to diagnose Johne's disease. *Am. J. Vet. Res*. 26: 673-675.

25. Larsen, A.B. and Kopecky, K.E. (1970): M.paratuberculosis in reproductivite organs and semen of bulls. Am. J. Vet. Res. 31: 255-257.
26. Larsen, A.B. (1972): Paratuberculosis: Tha status of our knowledge. J. Am. Vet.Med.Assoc. 161: 1539-1541.
27. Larsen, A.B., Stalheim, O.H., Hughes, D.E., et all. (1981): M.paratuberculosis in the semen and the genital organs of a semen donor bull. J. Am. Vet.Med.Assoc. 179: 169-171.
28. Lawrece, W.E. (1956): Congenital infection with M.johne cattle.Vet. Rec. 68: 312-314.
29. Merchant, I.A. and Berner, R.D. (1971): Infectious diease of domestic animals. 3rd. ed. chapter 60. Iova State Univ. Press. Ames.
30. Merkal, R.C., Kopecky, K.E., Larsen, A.B., Thurston, J.R. (1964): Improvments in the tecniques for primary cultivation of M.paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 25: 1290-1294.
31. Merkal, R.S., Larsen, A.B., Kopecky, K.E. and Nees, R.D. (1968): Am. J. Vet. Res. 29: 1533-1538.
32. Merkal, R.S. and W D.Richards (1972): Inhibition of fungal growth in the cultural isolation of Mycobacteria. Appl. Microbiol. 24: 205-207.
33. Merkal, R.S. (1973): Laboratuvary diagnosis of bovine paratuberculosis. J. Amer. Vet. Med. Ass. 163: 1100-1102.
34. Merkal, R.S., Larsen, A.B., and Booth, G.D. (1975): Am.J.Vet.Res. 36: 837-839.
35. Merkal, R.S., Mc. Cullough, W.G. (1982): A new mycbactin J. from M.paratuberculosis. Current Microbiol. 7: 333-335.
36. Merkal, R.S. (1984): Prevalance, diagnosis, prevention and treatment proceeding. A.A.B.P., 64-65.
37. Merkal, R.S. (1984): Paratuberculosis: Advences in cultural, serologic and vaccination methods. J. Amer. Vet. Med. Ass. 184: 939-943.
38. OIE Manual (1990): Paratuberculosis (Johne's disease) (Amendment 1, April 1990): 1-16-16-16.
39. Patersson, A.B. (1959): Tuberculosis bacteriology in infectious disease of animals; Disease due to bacteria by stable forth, A.W. and Golloway, I.A.- Buttherworths scintific publication, London, 2: 671-687..
40. Patterson, D.S.P., W.M. Allen and S. Beretti (1965): Plasma enzmes in

clinical Johne's Vet. Rec. 77: 1287-1289.

41. Patterson, D.S.P., W.M. Allen and M.K. Lloyd (1967): Clinical Johne's disease as a protein losing enteropathy. Vet. Rec. 80: 717-718.

42. Patterson, D.S.P. and S. Beretti. (1968): Malabsorption in Johne's disease of cattle. Vet. Rec. 81: 55-56.

43. Pearson, J.K.L. and Mc. Clelland, T.G. (1962): Studies on Johne's disease in cattle Northern Ireland: In diagnosis of nonclinical infections. Serological and allergic test in Northern Ireland. Brit. Vet. J. 118: 98-106.

44. Rankin, J.D. (1961): The non-specificity of a complement-fixation test used in the diagnosis of Johne's disease in cattle.

45. Riemann, H.P and Abbas, B. (1983): Diagnosis and control of bovine paratuberculosis (Johne's disease) Vet. Science and comparative medicine. 27: 481-506.

46. Ringdal, G. (1963): Culture of *M.johne*. Acta Vet. Scand, 4: 85-91.

47. Ringdal, G. (1965): Studies on Johne's disease in a single herd during a five-year period. Nord. Vet. Med. 1965, 17: 71-96.

48. Rodrick, J. Chiodini and Herbert, J. Van Kruiningen (1986): The prevalence paratuberculosis in culled New England cattle. Cornell Vet. 76: 91-104.

49. Sezginer, F.R. (1928): Ehli hayvanlarda intani hastalıklar. Hilal Matbaası, İstanbul, 252-259.

50. Sherman, D.M., Markham, J.F. and Bates, F. (1984): Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. J.A.V.M.A. 185: 179-182.

51. Sherman, D.M., Bray, B., Gay, J.M., Bates, F. (1989): Evolution of the agar gel immunodiffusion test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. Am. J. Vet. Res. 50, 4: 525-530.

52. Smith, K. (1969): Electromicroscopical observation on *M.johne*. Re. Vet. Sci. 10: 1-3.

53. Smythe, R.H. (1950) Some observations on Johne's disease. Vet. Rec. 62: 429-440.

54. Summers, B.A. (1981): Laboratory diagnosis of Johne's disease: A potential source of error. VET. rec. 108: 166-167.

55. Taylor, T.K., C.R., Mc. Queen, D.S. (1981): Isolation of

M.paratuberculosis from the milk of a cow with Johne's disease. Vet. Rec. 109: 532-533.

56. Thayer, W.R. et all. (1984): Inflammatory bowel disease II. Mycobacterial antibodies in crohn's disease digestive. 29: 1020-1025.

57. Thoen, C.O., C.C. Muscoplat (1979): Recent developments in diagnosis of paratuberculosis (Jone's disease) J. Amer. Med. Ass. 174: 838-840.

58. Thoen, C.O., Baum, K.H. (1988): Current knowledge on paratuberculosis J, Am. Vet. Med. Assoc. 192: 1609-1611,

59. Vural, B., Atala, N. (1988): İçanadolu Bölgesinde sığırlardaki paratüberkülozisin mikro CF. ve tüp CF. testi ile serolojik olarak tetkiki. Etlik Vet. Mikrobiyoloji Dergisi. 3, 6: 87-97.

60. Wenting, J.H., Bongers, J.H., Vas, A.A.P.A, Zeewen (1993): Relationship between negative skin test with johnin after vaccination and postmortem findings. The Vet. Rec. 9: 38-39.

61. Whipple, D.L., Merkal, R.S. (1983): Modification in the techniques for cultivation of M.paratuberculosis. In proceeding of the international collogium on research in paratuberculosis. The National Animal Disease Centre. Ames, Iowa, USA, June, 16-18pp. 82-92.

62. Wilks, C.R., T.K. Taylor and E.G. Russel (1981): Isolation of mycobacteria inducing cross reactions in the CF test for Johne's disease. Res. Vet. Sci. 30: 323-327.

63. Worthington, R. (1963): FAO Agric. Stud. 61: 157-186.

64. Yokomizo, Y. Merkal, R.S. and Lyle P.A.S. (1983): Enzyme-Linked Immunosorbent assay for dedection of bovine immunglobulin G₁ antibody to a protoplasmic antigen of M.paratuberculosis. Am.J. Vet. Res. 44: 2205-2207.

65. Yokomizo, Y., Yugi, H. and Merkal, R.S. (1985): A method for avoiding false positive reactions in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculose. Jpn. Vet. Sci. 47(1): 111-119.