



Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*'in Süt ve Süt Ürünlerinde Tespit Yöntemleri*

Nihat TELLİ¹, Ahmet GÜNER²

1. Konya Teknik Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Gıda Teknolojisi Programı, Konya, TÜRKİYE.
2. Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Konya, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
10.07.2017	18.12.2017	25.12.2018

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Telli N, Güner A: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*'in Süt ve Süt Ürünlerinde Tespit Yöntemleri. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 380-388, 2018. DOI:10.17094/ataunivbd.327611

Öz: *Mycobacterium avium* kompleksi üyelerinden olan *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) çok çeşitli hayvan türlerinde Johne hastalığının (paratüberkülozis) etiyolojik etkenidir. Paratüberkülozun klinik belirtilerini gösteren ve asemptomatik taşıyıcı hayvanlar etkeni süt, dışkı ve spermeleriyle yaymaktadırlar. Süt direkt olarak etkeni taşıyabildiği gibi özellikle dışkı kaynaklı indirekt bulaşmalar da gerçekleşebilmektedir. Sütün yanı sıra peynir, yoğurt, krema, tereyağı, dondurma vb. süt ürünleri de etkeni taşıyabilmektedir. Süt sığırlarındaki Johne hastalığı ile insanlarda görülen Crohn hastalığı insidenslerinde dünya genelinde artış görülmektedir. Yüksek klinik ve patolojik benzerlikler bulunan bu hastalıklar arasındaki olası ilişkide gıdaların rolünün yorumlanmasında ve güvenilir sonuçlar alınmasında MAP'ın süt ve süt ürünlerinde tespit yöntemleri önem arz etmektedir. Bu amaçla süt ve süt ürünlerinde Ziehl-Neelsen boyama, floresan mikroskop, katı faz sitometri ve biyoluminesans gibi direkt tanı ve kültür yöntemleri ile MAP etkenleri araştırılabilmektedir. Bu yöntemlerin yanı sıra radyoimmün testler (RIA), enzim bağlı immün testler (ELISA), agar jel immünodifüzyon testi (AGID) ve komplement fiksasyon testi (CF test) gibi serolojik teknikler ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), nükleik asit hibridizasyonu, immunomagnetic separation PCR, Nested PCR, Real-Time PCR gibi moleküler teknikler veya bu tekniklerin kombinasyonlarıyla hızlı tanı yöntemleri geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Crohn hastalığı, Johne hastalığı, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Detection Methods of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Milk and Milk Products

Abstract: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) is a member of the *Mycobacterium avium* complex, and is the etiologic agent of Johne's disease (paratuberculosis) in a wide variety of animal species. Animals with clinical signs of paratuberculosis and asymptomatic carriers spread the agent by their milk, feces and sperm. While milk may carry the microorganism, indirect contamination may also be caused by feces. As well as milk, cheese, yoghurt, cream, butter, ice cream and other dairy products can also carry the pathogen. The increase in the incidence of Crohn's disease in humans and Johne's disease in dairy cattle is observed worldwide. The detection methods of MAP in milk and dairy products are important to obtain reliable results in interpreting the role of food and possible relationships between these diseases with their high clinical and pathological similarities. For this purpose, MAP agents can be investigated by classical cultural and direct diagnosis methods such as Ziehl-Neelsen staining, fluorescence microscopy, solid-phase cytometry and bioluminescence in milk and dairy products. In addition to these methods, serological techniques such as radioimmunoassays-RIA, enzyme-linked immunoassays-ELISA, agar gel immunodiffusion assay-AGID and complement fixation-CF test and molecular techniques such as polymerase chain reaction-PCR, nucleic acid hybridization, immunomagnetic separation PCR, Nested PCR, Real-Time PCR or the rapid methods which are the combination of these techniques have also been developed.

Keywords: Crohn's disease, Johne's disease, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

✉ Nihat TELLİ

Konya Teknik Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Gıda Teknolojisi Programı, Konya, TÜRKİYE.
e-posta: nteilli@ktun.edu.tr

*Bu derlemenin özeti "3rd International Vetİstanbul Group Congress 2016" Kongresi (17-20 Mayıs 2016, Saraybosna, Bosna Hersek)'nde poster olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Mycobacteria, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'de aerobik, spor oluşturmeyen, yavaş gelişen, hareketsiz, çomak şekilli, Gram pozitif ve aside dirençli bakterileri içeren grup olarak tanımlanmaktadır (1). Bu grupta yer alan bakteriler kompleks lipitlerden oluşan hücre duvarı yapılarına sahiptir. Ekzo ve endo toksin üretmezler ancak mikobakteriyel proteinlere karşı gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonlarına neden olurlar. *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* ve *Mycobacterium leprae* patojenik türler olmakla birlikte *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium ulcerans* ve *Mycobacterium smegmatis*'de fırsatçı patojen olarak tanımlanmaktadır (2).

Mycobacterium avium kompleksi (MAC) üyelerinden olan *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (3), başta evcil ve yabani ruminantlar olmak üzere çok çeşitli hayvan türlerinde (örn., köpek, domuz, at, tavuk, primatlar) gastrointestinal sistemini etkileyen Johne hastalığının (paratüberkülozis) etiyolojik etkenidir (4,5).

1. Çiftlik Hayvanlarında *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

MAP etkenleri çiftlik hayvanlarında ilk kez 1895 yılında tanımlanmıştır. Almanya'da Dresden Veteriner Patoloji Enstitüsü'nde Prof. Dr. Johne ve Dr. Frothingham tarafından kronik bağırsak yangılı bir inekte identifikasyonu yapılmıştır (3,6). Etkenin neden olduğu Johne hastalığında, özellikle süt sığırlarında kondisyon kaybı, süt veriminde azalma, kaşeksiye varabilen kilo kaybı ve ishal en tipik klinik belirtilerdir (6). İshal belirtilerinin sığırlara nazaran daha güç tespit edildiği koyun ve keçi gibi küçükbaş hayvanlarda da geniş bir dağılım görülmekte ve bu hayvanlarda enfeksiyon çoğunlukla ölümle sonuçlanmaktadır (5,6). Hastalık; yüksek prevalansı yanında kaşeksi, süt veriminde azalma ve tedavi-kontrol uygulamalarıyla da önemli ekonomik

kayıplara yol açması bakımından önem arz etmektedir (4).

Asemptomatik hayvanların 18 aylık döneme kadar etkeni dışkı ve sütleriyle yaydıkları bilinmektedir. Bu durum sürü sağlığının korunması, hastalığın hayvanlarda teşhisi, kontrol ve eradikasyon problemlerine neden olmaktadır (7). Hastalığın çiftliklerde kontrolü, sürü ve halk sağlığının korunmasında en önemli faktördür (8). Bu amaçla birçok ülkede ulusal programlar geliştirilmiştir. Avustralya Ulusal Sığır Johne Hastalığı Stratejik Planı (NBJDSP), Kanada Johne Hastalığı Birliği (CJDI), Danimarka Paratüberküloz Operasyon Programı (OP), Hollanda Yoğunlaştırılmış Paratüberküloz Programı (IPP), İngiltere Sığır Sağlığı Sertifikasyon Standartları (CHECS) ve Amerika Birleşik Devletleri Gönüllü Sığır Johne Hastalığı Kontrol Programı bunlara örnek olarak verilebilir (9).

2. Crohn Hastalığı ve *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Crohn hastalığı insanların gastrointestinal sisteminin özellikle terminal ileum ve kolon bölgeleri başta olmak üzere ağızdan anüse kadar bütün kısımlarında kronik granümatöz yangılara sebep olmaktadır (6). Kronik ishal, iştahsızlık ve kilo kaybı, ateş ve fibrotik inflamasyonlar genel klinik bulgular olup tanısı zor bir hastalıktır. Hastalığın akut evrelerinde kusma, iştahsızlık ve apandisit bulgularını andıran ishal, kronik olgularda spesifik karakterde olmayan karın ağrıları görülmektedir (10).

Etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte çoklu genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimlerinin hastalığa neden olduğu düşünülmektedir (10). Bu konudaki düşünceler; kronik karakterdeki bir enfeksiyona karşı gelişen bir reaksiyon, bağırsak mukozal bariyerinde meydana gelen hasarların bir sonucu ve konakçı bağışıklık sistemi düzensizliğinden kaynaklandığı üzerine yoğunlaşmaktadır (7). Hastalığın etiyolojisinde farklı türde mikroorganizmalar (Tablo 1) olabileceği çeşitli kaynaklarda bildirilmiştir (10,11,12).

Tablo 1. Crohn Hastalığı Etiyolojisinde Yer Alan Muhtemel Mikroorganizmalar (10,11,12).**Table 1.** Possible Microorganisms in the Etiology of Crohn's Disease (10,11,12).

Mikroorganizma Grubu	Etkenler
Bakteriyel	<i>Shigella</i> spp, <i>Salmonella</i> spp, <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Escherichia coli</i> EHEC/EAEC, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Yersinia</i> spp, <i>Actinomyces</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , atipik <i>Mycobacteria</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Tropheryma whipplei</i>
Viral	Cytomegalovirus, Herpes Simplex, Human Immunodeficiency Virus, Caliciviridae, Astro-, Adeno- ve Rotavirus
Mikotik	<i>Candida</i> spp, <i>Aspergillus</i> spp
Paraziter	<i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Giardia lamblia</i> , <i>Strongyloides stercoralis</i> , <i>Isospora belli</i> , <i>Cryptospora</i> spp, <i>Trichuris trichiura</i>

MAP etkenlerinin insanlarda da benzer klinik belirtiler gösteren bir hastalığın etiolojisinde rol oynayabileceği iddiası ilk kez 1913 yılında ortaya atılmıştır (3). Bu iddianın temelinde insanlarda da bağırsağın kronik iltihabına neden olan sistemik bir hastalıkla Johne hastalığı arasındaki yüksek klinik ve patolojik bulgu benzerliği yatmaktadır (4,6). Crohn hastalığının patogenezinde MAP'ın potansiyel bir rolü olduğuyla ilgili kanıtlar, genellikle hastalardan etken izolasyonunun yapılabilmesiyle elde edilmektedir (13). Ancak Crohn hastalarından MAP etkenlerinin izolasyonlarındaki güçlükler, sağlıklı ve güvenilir sonuçlar alınması ile ilgili problemler yaratmaktadır. Günümüze kadar bu ilişkilerin açıklanabilmesi amacıyla yapılan kapsamlı genom çalışmalarıyla da net sonuçlar elde edilememiştir (13). MAP'ın insanlarda Crohn hastalığının bazı vakalarından sorumlu olduğu ile ilgili giderek artan sayıda bilimsel veriler olmasına rağmen bu konu halen tartışmalıdır (14).

3. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*'in Süt ve Ürünlerindeki Varlığı

Paratüberkülozun klinik belirtilerini gösteren ve asemptomatik taşıyıcı hayvanlar etkeni süt, dışkı ve spermeleriyle yaymaktadır. Etkenler bu dokularda uzun süre canlılıklarını sürdürebilmektedir (15,16). Süt direkt olarak etkeni taşıyabildiği gibi özellikle dışkı kaynaklı indirekt bulaşmalar da gerçekleşebilmektedir (7,17). Pastörizasyon sıcaklık-zaman düzeneklerinde sütlerde MAP etkenlerinin canlılıklarını koruyabildiği (15,18,19), pastörize süt ve süt ürünlerinden izolasyonun yapıldığı (15), D-değerinin diğer patojenlerden yüksek olduğu ortaya konmuştur (14).

Peynir, yoğurt, krema, tereyağı, dondurma gibi süt ürünlerinin yanı sıra içeriklerinde süt ve bileşenlerini ihtiva eden gıdalar da önem arz etmektedir. MAP etkenleriyle kontamine çiğ sütte pastörizasyon sonrası canlı kalabilen etkenler süt ürünleri için potansiyel risk oluşturmaktadırlar (7). Dolayısıyla MAP etkenleriyle kontamine süt ve süt ürünleri tüketiminin insanlarda Crohn hastalığının etiolojisinde rol oynayabileceği düşüncesi güçlenmektedir (15). Bunun yanı sıra dünya genelinde özellikle süt sığırlarında Johne hastalığı ile insanların Crohn hastalığı insidensindeki artışların paralellik arz etmesi, bu hastalıklar arasındaki olası ilişkinin yorumlanmasında dolaylı da olsa bilgiler sunmaktadır (13).

4. Süt ve Süt Ürünlerinde Tespit Yöntemleri

Süt ve süt ürünlerinde kültür ve direkt tanı yöntemleri ile MAP etkenleri araştırılabilmektedir. Bu yöntemlerin yanı sıra serolojik ve moleküler teknikler veya bu tekniklerin kombinasyonlarıyla hızlı tanı yöntemleri geliştirilmiştir (14,15).

4.1. Kültürel Metotlar

Kültürel metotlarla canlı MAP etkenlerinin izolasyonu "gold standart" olarak kabul edilmektedir (15,20). Buna karşın özellikle süt kaynaklı diğer mikroorganizmalara oranla uzun süren inkübasyon periyodu (18 ile 52 hafta arası) (7,21), uygun selektif besiyeri seçiminin güçlüğü, spesifik besin öğelerine ihtiyaç göstermesi, enfekte hayvanların sütlerinde düşük sayıda etken bulunması vb. faktörler bu

metotların kullanılabilirliğini olumsuz etkilemektedir (7,11).

Kültür öncesinde uygulanan dekontaminasyon işlemleri de subklinik enfekte hayvanların sütlerinde yer alan az sayıdaki mikroorganizmanın inaktivasyonuna neden olabilmektedir (21). Ancak süt ve süt ürünlerinden etkin bir kültürel izolasyon için dekontaminasyon uygulamaları tercih edilmektedir (7). Bu amaçla örneklerden besiyerlerine ekim yapılmadan önce rekabetçi mikroflora etkenlerinin gelişmesini engellemek için hekzadesilpiridinyum klorür, sodyum hidroksit, oksalik asit, benzalkonyum klorür gibi kimyasallardan yararlanılmaktadır (20,22).

Genel olarak sütün mikrobiyolojik analizlerinde santrifüj, zenginleştirme ve immunomanyetik separasyon (IMS) vb. bir ön işlem sonrası besiyerine geçiş yapılması tercih edilmektedir (20). Sütlerde bulunan mikroorganizma sayısı dışarıya oranla daha az olduğundan etkenlerin izolasyonunu sağlayabilmek amacıyla sütlere santrifüj uygulaması tercih edilmektedir. Santrifüj işlemiyle süt üç fraksiyona (su, pelet, krema) ayrılmaktadır. MAP etkenlerinin özellikle pelet ve krema kısımlarında yer aldığı bilinmekte ve inokülasyon için bu kısımlar kullanılmaktadır (22). Zenginleştirme işlemi karışık mikroflorada hedeflenen mikroorganizmanın gelişmesini sağlamak ve olası hücrel hasarların giderilmesi amacıyla yapılmaktadır. Sığır albümini, dekstroz, katalaz ve oleik asit içeren Middlebrook OADC Growth Supplement kullanımı buna örnek olarak gösterilebilir (20). IMS yöntemi; paramanyetik özellikteki boncuklar üzerine spesifik antikorların kaplanması ve bu antikorların süt örneklerinde bulunabilecek MAP antijenleri ile bağlanması yoluyla selektif ayırım yapılması esasına dayanmaktadır (7).

En yaygın kullanılan katı besiyerleri, Herrold's egg yolk medium (HEYM), Lowenstein-Jensen medium (LJ) ve Middlebrook 7H10/7H11 medium'dur. Bunlara alternatif olarak Middlebrook 7H9, BACTEC 12B, MGIT 960, ESP II Culture System, MB/BacT System gibi sıvı besiyerleri de sıklıkla kullanılabilir (7,20,22). Tespit limitlerinin 1-10 kob/ml ile 1-10 kob/100ml arasında değiştiği bildirilmektedir. Süt ve süt ürünlerinden MAP etkenlerinin izolasyon oranını artırmak için katı ve sıvı

besiyerlerinin birlikte kullanımları tercih edilmektedir (7).

Bu besiyerleri, örneklerde bulunabilecek rekabetçi mikroflorayı baskılamak amacıyla uygun antibiyotik karışımı içermekte ve ayrıca üreme faktörü olarak siderofor özellikli mycobactin J supplementi ilave edilmektedir (20,22). MAP etkenleri diğer *Mycobacteria* üyelerinden farklı olarak kendi mikobaktinini sentezleyememektedir. Bakterinin in vitro gelişimi için ekzojen mikobaktine olan bu gereksinimi diğer bakterilerden ayırıcı kriter olarak değerlendirilmektedir. Demirle şelat oluşturarak bakterinin çoğalmasında respiratör aktiviteyi sağlayan supplementlerin ortamda bulunmaması durumunda gelişim ancak demir sağlayan hücreler vasıtasıyla gerçekleştirilebilmektedir (11,22).

4.2. Direkt Tanı Yöntemleri

Süt ve süt ürünlerinden MAP etkenlerinin direkt tanı yöntemleriyle tespiti yaygın olarak kullanılmamakla birlikte doğrulayıcı tanı amaçlı bilgiler sunmaktadır. Bu yöntemler arasında; örneklerin Ziehl-Neelsen boyamayı takiben mikroskopta incelenmesi, floresan mikroskop kullanımı, katı faz sitometri ve biyoluminesans yöntemleri yer almaktadır (15).

4.3. Serolojik Testler

Serolojik testler özellikle sürülerde MAP seroprevalansının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan başlıca serolojik testler; radyoimmün testler (radioimmunoassay-RIA), enzim bağlı immün testler (enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA), agar jel immünodifüzyon testi (agar gel immunodiffusion-AGID) ve komplement fiksasyon (complement fixation-CF) testleridir (14). Ancak çevresel kaynaklı MAP dışındaki etkenler seroprevalans değerlerinin doğru tespitinde sorun yaratmaktadır. Sığırlarda enfeksiyonun ilk dönemlerinde, biyolojik sıvılarda, genellikle MAP etkenlerine karşı üretilen antikorlar bulunmamaktadır (23).

4.3.1. Radyoimmün Testler

Radyoimmün testler (RIA), Rosalyn Yalow ve Solomon Berson tarafından 1959 yılında geliştirilmiştir. Biyolojik sıvılarda aranan bir

maddenin varlığı reaksiyon ve tespit olarak iki aşamada gerçekleşmektedir. RIA, bir antikorun hormon gibi (ya da başka bir moleküle) bir antijene geri dönüşümlü olarak bağlanma yeteneğine dayanmaktadır. Pozitif reaksiyonlar da, antijen-antikor kompleksi oluşarak bir radyoaktivite kazanmaktadır. Radyoizotopik olarak işaretlenmiş moleküller kullanılarak oldukça küçük miktardaki antijen, antikor ya da antijen-antikor kompleksinin ölçümü mümkün hale gelmektedir (24). Meylan ve ark (25), kolostrumda MAP etkenlerinin tespiti amacıyla RIA metodunu kullanmışlardır. Radyoaktif izotoplar kullanılması sebebiyle uygulamasının zor ve pahalı olması daha az tercih edilen bir metot olmasına neden olmaktadır (24).

4.3.2. Enzim Bağlı İmmün Testler

ELISA testi, MAP antikorlarına spesifik antijenlerin kullanımıyla sütlerde bulunabilecek MAP etkenlerinin tespit edildiği benimsenmiş bir yöntemdir (15,22). ELISA testinde bu amaç için kullanılan ilk antijen lipoarabinomannan olmuştur (15). ELISA testi, sütlerde MAP etkenlerinin tespiti amacıyla ilk defa 1994 yılında (26) kullanılmış olup sonrasında birçok araştırmacı (27,28,29) tarafından uygulama alanı bulmuştur.

ELISA metodu; 24 saat içerisinde sonuç alınabilmesi, nispeten az maliyetli olması ve kolaylığından dolayı günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (22). Özellikle subklinik enfekte hayvan sütlerinden insanlara olası bulaşmaların engellenmesi ve dolayısıyla halk sağlığının korunması amacıyla MAP etkenlerinin tespitinde ELISA metodunun etkili bir yöntem olduğu kabul edilmektedir (30). Ancak bireysel olarak hayvanlarda antikor tespit duyarlılıkları daha düşük bulunmuştur. Nitekim çiğ süt tanklarında antikor tespit duyarlılığı %97 (23) iken subklinik enfekte hayvanların sütlerinde bu oran %21-61 arasındadır (22). Diğer *Mycobacteria* türleriyle kontamine hayvanların sütlerinde bulunabilecek antikorlardan dolayı yanlış pozitif ve enfekte hayvanların sütlerinde her zaman antikorların bulunmaması nedeniyle yanlış negatif sonuçlar alınabilmesi metodun dezavantajları arasında sayılabilmektedir (15).

4.3.3. Agar Jel İmmünodifüzyon Testi

Agar jel immünodifüzyon (AGID) testi, antikor ve antijenlerin yarı katı jelde açılan delikler arasındaki bölgede kümelenmesi esasına dayanan bir yöntemdir. Uygulanması kolay ve düşük maliyetlidir. Fakat düşük hassasiyet oranı subklinik enfekte sürülerde etkili bir tarama testi olarak kullanılmasına engel olmaktadır. Bu yüzden şüpheli hayvanlardan elde edilen biyolojik materyallerde MAP varlığının araştırılmasında genellikle doğrulayıcı tanıda kullanılmaktadır (14,31).

4.3.4. Komplement Fiksasyon Testi

Komplement fiksasyon (CF) testi, sürülerde MAP seroprevalans tespit çalışmalarında kullanılmıştır. Ancak kullanılan ticari test kitlerinde özellikle hastalığın evresine bağlı olarak değişkenlik gösteren duyarlılık seviyeleri ve diğer bakterilerle çapraz reaksiyonlar oluşturması nedeniyle fazla tercih edilmemektedir (14,23).

4.4. Moleküler Testler

Örneklerde nükleik asit tespitine dayalı moleküler yöntemler, yüksek doğruluk oranı ve 0.01 pg miktarındaki DNA'nın tespitine olanak vermesi nedeniyle mikobakteriyolojik analizlerde güvenilir olarak kullanılmaktadır (23). Moleküler teşhis için polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction-PCR) ve PCR'in modifikasyonu sonucu geliştirilen birçok yöntem (özellikle problarla nükleik asit hibridizasyonu, immunomanyetik separasyon PCR, Nested PCR, Real-Time PCR) kullanılabilmektedir (14,15).

4.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR, in vitro koşullarda hedef nükleik asit zincirlerinin primerlerle çoğaltılarak etken identifikasyonuna olanak sağlayan bir yöntemdir. Saf kültürlerden elde edilen DNA materyallerinden oldukça yüksek spesifitede sonuçlar alınmaktadır. Fakat klinik örneklerde yapılan analizlerde çeşitli inhibitör maddelerin varlığı ve ekstraksiyon tekniklerinin yetersizliği vb. faktörler spesifitenin azalmasına neden olmaktadır (32).

Süt ve diğer materyallerde MAP etkenlerinin varlığının araştırılmasında hızlı ve güvenilir sonuçlar verdiği bilinmektedir. Sütlerde MAP etkenlerinin araştırılması amacıyla farklı sekans bölgelerinin incelendiği PCR protokolleri geliştirilmiştir. Özellikle *IS900* ve *f57* spesifik DNA sekanslarının bulunması etken tespitinde bu alanda ilerlemelere neden olmuştur (15).

4.4.1.1. *IS900* DNA Sekansı

Tespit edildiği 1989 yılından itibaren *IS900* gen sekansının araştırılması MAP etkenleri için en sık tercih edilen metot olmaktadır (14,15). MAP etkenlerini *Mycobacterium avium* türlerinden ayırmada kullanılmaktadır. *IS900* gen sekansı 399 amino asidi kodlayan 1451 baz çifti uzunluğunda bir bölge olup bu sekans bölgesinden elde edilen primerler (Tablo 2) süt ve süt ürünlerinde MAP etkenlerinin teşhisinde kullanılabilir (14,23).

4.4.1.2. *f57* DNA Sekansı

İlk kez 1993 yılında bir *Mycobacterium paratuberculosis* suşundan izole edilen bu sekans da MAP etkenlerini *Mycobacterium avium* türlerinden ayırmada kullanılmaktadır. G+C içeriği %58.9 olup 620 baz çifti uzunluğunda bir bölgedir. Diğer MAC üyelerinde bulunmayan *f57* DNA sekansından elde edilen primerlerle (Tablo 2) birçok çalışma yürütülmüştür (14,23). Süt ve süt ürünlerinde MAP etkenlerinin tespitinde nispeten daha az duyarlı olduğu kabul edildiğinden *IS900* sekans analizlerini destekleyici nitelikte kullanımı daha yaygındır (23,33).

4.4.1.3. Diğer Sekanslar

MAP etkenlerinin varlığının araştırıldığı PCR temelli çalışmalarda *IS900* ve *f57* sekanslarının yanı sıra farklı DNA segmentleri de kullanılmaktadır. Bunlara; *HspX*, *ISMap2* (15), *ISMAP02*, *LSP^a8*, *Hsp65* (23), locus 251 ve locus 255 (33, 34) örnek verilebilir.

Tablo 2. Süt ve Süt Ürünlerinde MAP Araştırılmasında Kullanılan Bazı *IS900* ve *f57* Sekans Primerleri.

Table 2. Some *IS900* and *f57* Sequence Primers Used in MAP Research in Milk and Milk Products.

Örnek	Sekans Bölgesi	Primer Dizilimi	Araştırmacılar
Süt	<i>IS900</i>	F(5'-CGTCGTTAATAACCATGCAG-3') R(5'-GGCCGTCGCTTAGGCTTCGA-3')	Giese ve Ahrens (35) Djonne ve ark (36)
Süt	<i>IS900</i>	F(5'-CCGCTAATTGAGAGATGCGATTGG-3') R(5'-AATCAACTCCAGCAGCAGCGCGCCTCG-3')	Pillai ve Jayarao (37)
Süt	<i>IS900</i>	F(5'-GATGGCCGAAGGAGATTG-3') R(5'-CACAACCACCTCCGTAACC-3')	Slana ve ark (21)
Süt	<i>IS900</i>	F(5'-ACCCGCTGCGAGAGCAATCGCTGC-3') R(5'-ACGTCGGCGTGGTCGTCGCTGGG-3')	Gilardoni ve ark (38)
Peynir	<i>IS900</i>	F(5'-AATGACGGTTACGGAGGTGGT-3') R(5'-GCAGTAATGGTC GGCCTTACC-3')	Galiero ve ark (39)
Süt bazlı bebek maması	<i>IS900</i>	F(5'-GAAGGGTGTTCGG GGCCGTCGCTTAGG-3') R(5'-GGCGTTGAGGTCGATCGCCACGT GAC-3')	Botsaris ve ark (40)
Süt	<i>f57</i>	F(5'-GCCATTTTCATCGATACCC-3') R(5'-GTACCGAATGTTGTTGTCAC-3')	Slana ve ark (21)
Süt	<i>f57</i>	F(5'-GGTCGCGTCATTCAGAATC-3') R(5'-TCTCAGACAGTGGCAGGTG-3')	Botsaris ve ark (41)
Süt, süt tozu, peynir	<i>f57</i>	F(5'-CCG CGA TCC CAA AAG TTG-3') R(5'-CTC GTA GCT GCC GAT TCA TG-3')	Donaghy ve ark (33)

SONUÇ

Siğirilerin yanı sıra koyun ve keçi gibi çiftlik hayvanlarında sıklıkla görülen MAP'ın, ısıtma işlemi görmüş/görmemiş süt ve ürünlerinde tespit edilmesi, diğer patojenlere göre D değerlerinin oldukça yüksek

olması ve ayrıca Crohn hastalığının etiyolojisinde de yer alabileceği yönündeki bazı bulgular halk sağlığı ve gıda güvenliği açısından bu patojenin önemini arttırmaktadır.

Bu bağlamda MAP'ın bulaşma kaynaklarından erken ve etkin tespiti oldukça önem arz etmektedir.

Birçok besin patojenine göre uzun inkübasyon periyodu, uygun selektif besiyeri seçiminin güçlüğü, spesifik besin öğelerine ihtiyaç göstermesi, enfekte hayvanların sütlerinde düşük sayıda etken bulunması v.b dezavantajlarından dolayı besinlerdeki insidensi ve yoğunluğu hakkında gerçek değerlere ulaşmak da oldukça zordur.

MAP'ın tespit edilmesinde kullanılan klasik kültürel yöntemlerin yanı sıra direkt tanı yöntemleri, serolojik ve moleküler testlerin kullanılması ve geliştirilmesi, sürü sağlığı, gıda güvenilirliği ve halk sağlığı açısından önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Holt JG., Krieg NR., Sneath PHA., Staley JT., Williams ST., 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed., 597-604, Williams & Wilkins A Waverly Company, Baltimore, Maryland.
- Behling RG., Eifert J., Erickson MC., Gurtler JB., Kornacki JL., Line E., Radcliff R., Ryser ET., Stawick B., Yan Z., 2010. Selected Pathogens of Concern to Industrial Food Processors: Infectious, Toxigenic, Toxic Infectious, Selected Emerging Pathogenic Bacteria. In "Principles of Microbiological Troubleshooting in the Industrial Food Processing Environment" Ed., JL Kornacki, 1st ed., 5-62, Springer Science Business Media, New York.
- Hermon-Taylor J., Bull TJ., Sheridan JM., Cheng J., Stellakis ML., Sumar N., 2000. Causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Can J Gastroenterol, 14, 521-539.
- Harris NB., Barletta RG., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. Clin Microbiol Rev, 14, 489-512.
- Windsor PA., 2015. Paratuberculosis in sheep and goats. Vet Microbiol, 181, 161-169.
- Hermon-Taylor J., El-Zaatari FAK., 2004. The *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* problem and its relation to the causation of Crohn disease. In "World Health Organization, Pathogenic *Mycobacteria* in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management", Ed., Pedley S, Bartram J, Rees G, Dufour A, Cotruvo J, 1st ed., 74-94, IWA Publishing, London.
- Grant IR., Rowe MT., Dundee L., Hitchings E., 2001. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: its incidence, heat resistance and detection in milk and dairy products. Int J Dairy Technol, 54, 2-13.
- McAloon CG., Whyte P., More SJ., Green MJ., O'Grady L., Garcia A., Doherty ML., 2015. The effect of paratuberculosis on milk yield-A systematic review and meta-analysis. J Dairy Sci, 99, 1449-1460.
- Geraghty T., Grahamb DA., Mullowneyc P., More SJ., 2014. A review of bovine Johne's disease control activities in 6 endemically infected countries. Prev Vet Med, 116, 1-11.
- Ailsa LH., Siew CN., 2015. Crohn's disease. Medicine, 43, 282-290.
- Güner A., 2004. Crohn Hastalığının Etiyolojisinde *Mycobacterium paratuberculosis* (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)'in Rolü ve Besinlerle Bulaşma Riski. E.Ü. Journal of Health Sciences, 13, 48-54.
- Laass MW., Roggenbuck D., Conrad K., 2014. Diagnosis and classification of Crohn's disease. Autoimmun Rev, 13, 467-471.
- Davis WC., Madsen-Bouterse SA., 2012. Crohn's disease and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: The need for a study is long overdue. Vet Immunol Immunopathol, 145, 1-6.
- Patel A., Shah N., 2011. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-Incidences in milk and milk products, their isolation, enumeration, characterization, and role in human health. J Microbiol Immunol Infect, 44, 473-479.
- Slana I., Paolicchi F., Janstova B., Navratilova P., Pavlik I., 2008. Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. Vet Med-Czech, 53, 283-306.
- Botsaris G., Slana I., Liapi M., Dodd C., Economides C., Rees C., Pavlik I., 2010. Rapid detection methods for viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk and cheese. Int J Food Microbiol, 141, 87-90.
- Foddai ACG., Grant IR., 2015. An optimised milk testing protocol to ensure accurate enumeration of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by the PMS-phage assay. Int

- Dairy J, 51, 16-23.
18. Lund BM., Gould GW., Rampling AM., 2002. Pasteurization of milk and the heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review of the data. *Int J Food Microbiol*, 77, 135-145.
 19. Donaghy JA., Totton NL., Rowe MT., 2003. Evaluation of culture media for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Cheddar cheese. *Lett Appl Microbiol*, 37, 285-291.
 20. Donaghy JA., Rowe MT., Rademaker JLW., Hammer P., Herman L., De Jonghe V., Blanchard B., Duhem K., Vindel E., 2008. An inter-laboratory ring trial for the detection and isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from raw milk artificially contaminated with naturally infected faeces. *Food Microbiol*, 25, 128-135.
 21. Slana I., Kralik P., Kralova A., Pavlik I., 2008. On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by *IS900* and *F57* competitive real time quantitative PCR and culture examination. *Int J Food Microbiol*, 128, 250-257.
 22. Bradner LK., 2013. Optimization of methods for culturing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine milk and colostrum and application to samples collected from naturally infected dairy cows. Iowa State University, Graduate Theses and Dissertations, USA.
 23. Timms VJ., Gehringer MM., Mitchell HM., Daskalopoulos G., Neilan BA., 2011. How accurately can we detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection? *J Microbiol Methods*, 85, 1-8.
 24. Lacy A., O'Kennedy R., 2005. Immunoassay, Techniques. In "Encyclopedia of Analytical Science", Ed., P Worsfold, A Townshend, C Poole, 2nd ed., 335-344, Elsevier Academic, San Diego.
 25. Meylan M., Rings DM., Shulaw WP., Kowalski JJ., Bech-Nielsen S., Hoffsis GF., 1996. Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* and preservation of immunoglobulin G in bovine colostrum under experimental conditions simulating pasteurization. *Am J Vet Res*, 57, 1580-1585.
 26. Sweeney RW., Whitlock RH., Buckley CL., Spencer P., Rosenberger AE., Hutchinson LJ., 1994. Diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, using enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Am J Vet Res*, 55, 905-909.
 27. Cazer CL., Mitchell RM., Cicconi-Hogan KM., Gamroth M., Richert RM., Ruegg PL., Schukken YH., 2013. Associations between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antibodies in bulk tank milk, season of sampling and protocols for managing infected cows. *BMC Vet Res*, 9, 1-7.
 28. Nielsen SS., Toft N., 2014. Bulk tank milk ELISA for detection of antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Correlation between repeated tests and within-herd antibody-prevalence. *Prev Vet Med*, 113, 96-102.
 29. Beaver A., Cazer CL., Ruegg PL., Gröhn YT., Schukken YH., 2016. Implications of PCR and ELISA results on the routes of bulk-tank contamination with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *J Dairy Sci*, 99, 1391-1405.
 30. Pinedo PJ., Williams JE., Monif GRG., Rae DO., Buergelt CD., 2008. *Mycobacterium paratuberculosis* shedding into milk: Association of ELISA seroactivity with DNA detection in milk. *Intern J Appl Res Vet Med*, 6, 137-144.
 31. Ferreira R., Fonseca LS., Lilenbaum W., 2002. Agar gel immunodiffusion test (AGID) evaluation for detection of bovine paratuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Lett Appl Microbiol*, 35, 173-175.
 32. Çetinkaya B., Muz A., Ertuş HB., Öngör H., Sezen İY., Gülcü HB, 2000. Süt ineklerinde paratüberküloz prevalansının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanması. *Turk J Vet Anim Sci*, 24, 371-379.
 33. Donaghy JA., Johnston J., Rowe MT., 2011. Detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in cheese, milk powder and milk using *IS900* and *f57*-based qPCR assays. *J Appl Microbiol*, 110, 479-489.
 34. Grant IR., Rees CED., 2010. *Mycobacterium*. In "Molecular Detection of Foodborne Pathogen", Ed., Liu D, 1st ed., 229-240, CRC Press, London.
 35. Giese SB., Ahrens P., 2000. Detection of

- Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet Microbiol*, 77, 291-297.
36. Djonne B., Jensen MR., Grant IR., Holstad G., 2003. Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. *Vet Microbiol*, 92, 135-143.
37. Pillai SR., Jayarao BM., 2002. Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* directly from raw milk. *J Dairy Sci*, 85, 1052-1057.
38. Gilardoni LR., Fernandez B., Morsella C., Mendez L., Jar AM., Paolicchi FA., Mundo L., 2016. *Mycobacterium paratuberculosis* detection in cow's milk in Argentina by immunomagnetic separation-PCR. *Braz J Microbiol*, 47, 506-512.
39. Galiero A., Fratini F., Mataragka A., Turchi B., Nuvoloni R., Ikonomopoulos J., Cerri D., 2016. Detection of *mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cheeses from small ruminants in Tuscany. *Int J Food Microbiol*, 217, 195-199.
40. Botsaris G., Swift BMC., Slana I., Liapi M., Christodoulou M., Hatzitofi M., Christodoulou V., Rees CED., 2016. Detection of viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in powdered infant formula by phage-PCR and confirmed by culture. *Int J Food Microbiol*, 216, 91-94.
41. Botsaris G., Liapi M., Kakogiannis C., Dodd CER., Rees CED., 2013. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bulk tank milk by combined phage-PCR assay: Evidence that plaque number is a good predictor of MAP. *Int J Food Microbiol*, 164, 76-80.