

ELISA ve fekal bakteriyoskopi ile sığırlarda Paratüberküloz prevalansının belirlenmesi

A.Ebru BORUM¹, Sertan ÇATIK², Zafer MECİTOĞLU², Gülşah DEMİR², Mihriban ÜLGEN³, Sezgin ŞENTÜRK²

¹ Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir

² Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa

³ Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa

Geliş Tarihi / Received: 05.02.2014, Kabul Tarihi / Accepted: 15.03.2014

Özet: Bu çalışmada Afyon ve civarındaki çiftliklerden 4-8 yaş arasındaki 305 Holstein Fresian sütçü sığırlar kullanılmıştır. Bu sığırların iki tanesinde kronik diare şikayeti mevcuttu ve yapılan tedaviye cevap vermemiştir. Sürüdeki diğer sığırlarda klinik inceleme yapılmış, hematolojik parametrelere bakılmış, teşhis amaçlı dışkı ve kan serumu örnekleri alınmıştır. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) serum örneklerinde ELISA yöntemi kullanılarak tespit edildi. Süt sığırlarında paratüberküloz'un prevalansı, dışkı örneklerinde; Ziehl-Neelsen boyama ile %4.59, ELISA testi ile ise %31.80 oranında pozitif tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: ELISA, Paratüberküloz, Ziehl Neelsen Boyama.

Detection of bovine Partuberculosis with ELISA and fecal examination

Summary: In this study, 305 between 4-8 years on a farm in Holstein Fresian dairy cows in Afyon were used. In two of these animals with chronic diarrhea were present and cows did not respond to treatment. Clinical studies, hematological parameters were determined, and blood serum and fecal samples were taken in other cattle in the herd. *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (MAP) in serum samples was determined using ELISA. The prevalence of paratuberculosis in dairy cows, Ziehl-Neelsen staining with 4.59% in fecal samples, 31.80% positive by the ELISA test were determined.

Key words: ELISA, Paratuberculosis, Ziehl Neelsen Staining.

Giriş

Paratüberküloz ya da Johne's Hastalığı *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (MAP) sebep olduğu kronik, granülomatöz enteritis ile seyreden oldukça bulaşıcı bir enfeksiyondur. Hastalık kronik diare, zayıflama, ileri kaşeksi, süt verimi ve döl veriminde düşme ve ölümlere sebep olan teşhis, tedavi, koruma ve kontrol programlarındaki giderler nedeniyle önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Özellikle sütçü sığırlar başta olmak üzere birçok evcil ve yabancı ruminantlar ile geyik, tavşan gibi diğer hayvanları da etkilemektedir [1,7,13,15,23].

Klinik olarak hasta ve asemptomatik hayvanlar hastalığın primer kaynağıdır [13]. Hastalık fekal-oral yol ile bulaşır. İnfekte hayvanlardan süt ve kolostrum, dışkı ile kirlenmiş sular ve yemler, placent, semen ve intrauterin yol ile vertikal bulaşma

görülebilir. Hayvanların kalabalık olması ve hijyen koşullarının yetersiz olması hastalığın yayılmasında etkilidir. MAP'ın çevre koşullarına dirençli olması da hastalığın yayılmasında oldukça önemlidir [13,14,28,31]. Hastalığın inkubasyon süresi oldukça uzundur. Hayvan erken dönemde etkeni alsa da dışkı ile saçılımı ve klinik bulguların ortaya çıkması 2-4 yaşında görülür. Hayvan uzun bir subklinik dönem geçirir ve yavaş yayılır. Bu dönem etkenin etrafa saçılması açısından önemlidir. Hastalık üç dönem şeklinde görülür. Birinci dönem asemptomatik dönemdir. Bu dönemde dışkıda patojen görülmez, Takip eden 2. Dönemde dışkıda patojen bulunur, ancak hastalık asemptomatiktir. Üçüncü dönemde ise hem dışkıda etken görülür hem de semptomlar görülmeye başlar [2,9,13,18]. MAP insanlardaki Crohn's hastalığının olası sebeplerinden

bir olması nedeniyle zoonotik önem taşımaktadır [6, 9,11,17,29].

Klinik dönemde semptomlar, anamnez ve nekropsi bulguları ile teşhis koyulabilir. Hastalığın özellikle subklinik dönemde teşhisi etken saçılımı nedeniyle oldukça önemlidir. Etkenin teşhis edilmesinde birçok test yöntemi mevcuttur. Ancak bu testlerin spesifikliğı ve sensitivitesi, hayvanın yaşı ve hastalık dönemlerindeki farklılıklardan dolayı farklılıklar gösterir. Bu durum etkenin teşhisinde önemli problemlere sebep olmaktadır. Hastalığın teşhisinde “gold standart” olarak bildirilen yöntem dışkıdan kültür yapılıp mikroorganizmanın üretilmesidir. Ancak hastalığın erken dönemlerinde dışkıyla saçılım olmaması ya da saçılımın aralıklı olması gibi nedenlerden dolayı diğer testler ile desteklenmelidir. MAP’ın teşhisinde Ziehl Neelsen Boyama, fekal kültür, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), ELISA, barsaklardaki anatomohistopatolojik incelemeler, komplement fizyasyon (CF), Agar Jel Immunodifüzyon (AGID), Flow Sitometri, İntradermal Deri testi, In situ Hibridizasyon testleri kullanılabilir [9,11,13,16,18,27].

Bu çalışma sığırlarda subklinik paratüberküloz infeksiyonlarının ELISA ve fekal bakteriyoskopi ile prevalansını belirlemek ve iki testin duyarlılığını karşılaştırmak amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada Afyon ve çevresindeki Holstein Friesian farklı sütçü sığır çiftliklerinden 4-8 yaş arasında 305 hayvan kullanıldı. Bu hayvanların bulunduğu çiftliklerden birinde önceki aylarda iki tanesinin kronik diyare ve tedaviye cevap vermeme sonucu kesime gönderilmiş olduğu bilgisi alındı.

Hayvanlara klinik muayene yapıldı. Kan ve dışkı örnekleri alındı. Plastik eldiven ile rektumdan taze dışkı örnekleri alınarak plastik kaplara konuldu. Her inekten bir dışkı örneğı alındı. +4°C’de hemen laboratuvara ulaştırıldı. Taze dışkıdan steril distile su kullanılarak direkt smear hazırlandı. Havada kurutuldu ve Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile boyanarak 100’lük objektifte incelendi [8,21,24].

Sonuçlar aside dirençli bakteri skor (AFB scorin) kriterine göre değerlendirildi. En az 100 mikroskop sahası tarandı ve skorlandı (Tablo 1) [10].

Tablo 1. Acid Fast Bacili Skorlama Kriteri (AFB Scorin)

Değerlendirme	Sonuç
Mikroskop sahasında asidorezistans bakteri yok	Negatif
Sahada 1-9 adet asidorezistans bakteri	Şüpheli
Sahada 10-99 adet asidorezistans bakteri	Pozitif

305 hayvandan ELISA testi için antikoagulan-sız 10 ml.’lik tüplere (Hema&Tube®, Turkey) örnekler alındı. Kan örnekleri 3000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi, serumları hemen ayrılarak test edilene kadar -20 °C’de saklandı. Hemolizli serumlar test dışı bırakıldı [2,11,24]. ELISA testi ELISA kiti (Para-TB-Ab, Svanovir®, Svanova Biotech AB Inc., Sweden) üretici protokolüne uygun olarak yapıldı. Sonuçlar, bireysel örnek yorumlanması; Sample/Positive (S/P), Percent Positive (PP) değerine göre değerlendirildi. PP≤31, negatif, PP 32-52 şüpheli, test tekrarı, PP≥53 pozitif olarak değerlendirildi. Ayrıca pozitif ve negatif kontrol serumları da çalışıldı. Tüm serumlar çift çalışıldı. Optik dansimetre 450 nm.’lik mikroplate photometresiyle ölçüldü.

Bulgular

Yaşları 4-7 arasında değişen 305 süt sığıridan alınan dışkı örneklerinde, Acid Fast Scorin kriterlerine göre 14 hayvan pozitif, 118 hayvan şüpheli, 173 hayvan ise negatif bulunmuştur. Serum örneklerinde yapılan paratüberküloz incelemesinde ise ELISA ile 97 örnek pozitif, 119 örnek şüpheli, 89 örnek ise negatif bulunmuştur. ELISA ve dışkıdan bakteriyoskopi sonuçları arasında farklılıklar ortaya çıkmıştır. Sonuçlar Tablo 2’de gösterilmektedir.

Tablo 2. Çalışmamızda elde edilen ELISA ve Dışkı Bakteriyoskopi Sonuçları

ELISA sonuç	Dışkı bakteriyoskopi sonuç	Numune sayısı
Pozitif	Pozitif	14
Pozitif	Şüpheli	43
Pozitif	Negatif	40
Şüpheli	Şüpheli	78
Şüpheli	Negatif	41
Negatif	Negatif	89
Toplam		305

Dışkı bakışı sonuçlarına göre prevalans %4.59, ELISA sonuçlarına göre ise %31.80 olarak saptanmıştır.

Tartışma ve Sonuç

Paratüberküloz uzun bir inkubasyon süresine ve subklinik döneme sahiptir. Bu dönemde hayvanlar klinik olarak herhangi bir semptom göstermemesine rağmen etkeni dışkı, süt ve kolostrumları ile sürekli çevreye yaymaktadır. Önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hastalığın yayılmasını engellemek özellikle bu dönemde oldukça önemlidir [2,15,20,30].

Dışkıdan direkt bakteriyoskopi hızlı, kolay ve ekonomik olmasına rağmen hastalığın evrelerinde dışkıyla MAP saçımının farklılık göstermesi ya da aralıklı olmaması teşhiste yanılmalara sebep olacaktır. Dışkıdan kültür yapılması "gold standart" kabul edilse de saçımın aralıklı olması, inkubasyon süresinin uzun olması, spesifik besiyeri ihtiyacı ve kontaminasyon riski gibi dezavantajları vardır [13,18].

ELISA testi genellikle uluslararası alanda güvenilir bir test kabul edilmektedir. Biz de çalışmamızda ELISA ve dışkı bakışını birlikte kullandık. Genellikle paratüberkülozis seroprevalans çalışmalarında ELISA testi uygulanmaktadır. Paratüberküloz konusunda Türkiye'de birtakım sınırlı çalışmalar yapılmıştır. Uşak ilinde Yıldırım ve Civelek [30] tarafından yapılan süt ve dışkı örneklerinde yapılan bir çalışmada Ziehl-Neelsen (ZN) boyama, Outer PZR, Nested PZR ve bakteriyolojik kültür yöntemleri uygulanmış ve prevalans dışkı örneklerinde sırasıyla %17, %9.5, %20 ve %4, süt örneklerinde ise sırasıyla %15.5, %5.5, %17.5 ve %2.5 olarak tespit edilmiştir. Makav ve Gökçe [15] tarafından yapılan bir çalışmada Kars yöresinde prevalans ELISA ile %3.5 olarak belirlenmiştir. Burdur'da yapılan bir çalışmada ELISA testi ile prevalans %6.2 bulunmuştur [20]. Yurt dışında da bu konuda birçok çalışma yapılmıştır. Avustralya'da yapılan bir çalışmada sığırlarda ELISA ile en yüksek prevalans 6 yaşlı sığırlarda % 2.84 olarak bulunmuştur [12]. Arjantin'de sütçü sığırlarda yapılan bir çalışmada ise ELISA ile pozitiflik % 41.6 olarak saptanmıştır [21]. Singh ve arkadaşları tarafından bufalo ve sığırlarda yapılan bir çalışmada ELISA çalışmasında seropozitiflik sırasıyla %28.6 ve %29.8

olarak bulunmuştur [26]. Rajukumar ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada dışkı incelemesi ile pozitif saptanan 22 hayvanın 18'i ELISA ile pozitif, pozitif saptanmayan 32 hayvanın ise 3 tanesi pozitif saptanmıştır [22].

Bizim çalışmamızda dışkı da Ziehl Neelsen boyama ile 14 (%4.59) pozitiflik saptanırken, ELISA ile 97 (%31.8) pozitiflik saptanmıştır. Araştırmalardan da anlaşılacağı gibi elde edilen sonuçlar bizim çalışmamız ve elde ettiğimiz oranla paralellik göstermektedir. ELISA ile saptadığımız oranın dışkıdan daha yüksek olması ve dışkıda negatif ya da şüpheli olayların ELISA ile pozitif çıkması, dışkı ile MAP'ın saçılımının dönemler halinde olması ve numune alındığında bu saçılımın olmamasından kaynaklanabilmektedir [3,4,12,13,18,19].

ELISA, kültür ve süt ya da dışkıdan direkt bakteriyoskopi yöntemlerine göre daha ekonomik ve hızlı olmasının yanında çok sayıda numunenin çalışılmasını sağlamaktadır. PZR hızlı sonuç vermesi ve ekonomik olmasına rağmen ELISA yöntemine göre daha zor uygulanmaktadır [13,18,21].

Yapılan bir çalışmada paratüberkülozisin teşhisi için ELISA'nın , deri testi, dışkı kültürü ile PZR yöntemlerine yakın güvenilir ve duyarlılıkta olduğunu bildirmiştir [25]. Son yıllarda ticari ELISA kitlerinin sensitivitesi %74 ve spesifitesi %99'a kadar yükselmiştir [15,19,20]. ELISA testi ayrıca 2 yaş üzerindeki hayvanlar için daha spesifik ve duyarlıdır [15,20]. Çalışmamızda kullandığımız hayvanlar 4-8 yaş arasında olması nedeniyle prevalansımız yüksek çıkmıştır.

Paratüberkülozun tanısında birçok yöntem bulunmaktadır. Dışkıdan bakteriyel kültür, fekal örneklerden PCR uygulaması, serum ya da süte ELISA uygulaması, biyopsi örneklerinin değerlendirilmesi ve nekropsi tanıda önemli testlerdendir. Çalışmalarda bu testlerin sensitivite ve spesifiteleeri sırasıyla %60-%99, %30-%99, %30-%99, %90-%100 ve %100-%100 olarak bildirilmiştir [5,13,18]. Sonuç olarak Paratüberküloz subklinik infeksiyon döneminin uzun süreli olması ve bu dönemde bulaşma olması nedeniyle teşhisinin zamanında ve erken yapılması oldukça önemlidir. Subklinik infekte hayvanlar diğer hayvanlar ve yavrular için ciddi bir enfeksiyon kaynağıdır. Aynı zamanda zoonoz olma durumu söz konusu olduğu için insan sağlığı için

de teşhis önemlidir. Bu nedenle tek bir teşhis yöntemi ile değil birkaç teşhis yöntemi ile sonuçlar desteklenmelidir. Bizim çalışmamızda ELISA sonuçlarına göre hastalığın prevalansı yüksek çıkmıştır. Türkiye’de paratüberküloz ve teşhisi ekonomik olarak oldukça önemlidir ve bu konuda erken, güvenilir ve hızlı teşhis yapılabilecek yöntemler uygulanarak hastalıkla mücadele, korunma ve kontrol çalışmaları yapılmasına ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

1. Abendan N, Sevilla IA, Prieto JM, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M, (2013). *Mycobacterium avium-subspecies paratuberculosis* isolates from sheep and goats show reduced persistence in bovine macrophages than cattle, bison, deer and wild boar strains regardless of genotype. *Vet Microbiol.* 163, 325-334.
2. Antognoli MC, Hirst HL, Garry FB, Salman MD, (2007). *Immune Response to and Faecal Shedding of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in Young Dairy Calves, and the Association Between Test Results in the Calves and the Infection Status of their Dams.* *Zoonoses Public Health.* 54, 152-159.
3. Collins MT, and Sockett DC, (1993a). *Accuracy and economics of USDA-Licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis.* *J Am Vet Med Assoc.* 203, 1456-1463.
4. Collins MT, Sockett DC, Ridge F, (1993b). *Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne’s disease.* *J Clin Microbiol.* 5, 52-55.
5. Collins MT, Gardner IA, Garry FB, Roussel AJ, Wells JS, (2006). *Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States.* *JAVMA-J AM VET MED A 229(12),* 1912-1919.
6. Çetinkaya B, Erdoğan HM, Morgan KL, (1997). *Risk factors for Bovine Paratuberculosis. II. The multiple analysis of risk factors for Bovine Paratuberculosis.* *Turk J Vet Anim Sci.* 21, 303-306.
7. Çetinkaya B, Muz A, Ertaş 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.
8. De Kantor IN, Weyer KE, (2004). *1998-last update, laboratory services in tuberculosis control, part II.*
9. Dieguez FJ, Gonzalez AM, Menendez S, Vilara MJ, Sanjuana ML, Yus E, Arnai I, (2009). *Evaluation of four commercial serum ELISAs for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in dairy cows.* *Vet J.* 180(2), 2231-235.
10. Fujiki A, (2001). *Direct smear examination. In: TB Bacteriology Examination to Stop TB. The Research Institute of Tuberculosis, ed. Fujiki A, Japan International Cooperation Agency JINNOU Co.* 7.
11. Garcia RR, Perez-de-la-Lastra JM, Vicente J, Ruiz-Fons F, Garrido JM, Gortazar C, (2008). *Large-scale ELISA testing of Spanish red deer for paratuberculosis.* *Vet Immunol Immunopathol.* 124, 75-81.
12. Gasteiner J, Wenzli H, Fuchs K, Jark U, Baumgartner W, (1999). *Serological Cross-sectional Study of Paratuberculosis in Cattle in Austria.* *J Vet Med. B* 46, 457-466.
13. Gilardoni LR, Paolichchi FA, Mundo SL. (2012). *Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests.* *Rev Argent Microbiol.* 44, 201-215.
14. Lambeth C, Reddacliff LA, Windsor P, Abbott KA, MacGregor H, Whittington RJ, (2004). *Intrauterin and transmammary transmission of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in sheep.* *Aust Vet J.* 82, 504-508.
15. Makav M, Gökçe E, (2013). *Kars Yöresi Sığırlarında Subklinik Paratüberkülozun Seroprevalansı.* *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 19 (5), 913-916.
16. Mura M, Bull TJ, Evans H, Sidi-Boumedine K, McMinn L, Rhodes G, Pickup R, Hermon-Taylor J, (2006). *Replication and long-term persistence of bovine and human strains of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis within Acanthamoeba polyphaga.* *Applied Environ Microbiol* 72, 854-859.
17. Naser SA, Ghobrial G, Romero C, Valentine JF, (2004). *Culture of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn’s disease.* *Lancet* 364, 1039-1044.
18. Nielsen SS, Toft N, (2008a). *Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon-γ assay and faecal culture techniques.* *Vet Microbiol.* 129, 217-235.
19. Nielsen SS, (2008b). *Transitions in diagnostic tests used for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis.* *Vet Microbiol.* 132, 274-282.
20. Öztürk D, Pehlivanoglu F, Tok AA, Günlü S, Güldali Y, Türütoğlu H, (2010). *Seroprevalence of paratuberculosis in the Burdur province (Turkey), in dairy cattle using the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).* *Israel J Vet Med.* 65, 53-57.
21. Paolichchi A, Zumarraga MJ, Gioffre A., Zamorano P, Morsella C, Verna IA, 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* 50, 20-26.
22. Rajukumar K, Tripathi BN, Kurade NP, Parihar NS, (2001). *An Enzyme-linked Immunosorbent Assay using Immuno affinity-purified Antigen in the Diagnosis of Caprine Paratuberculosis and Its Comparison with Conventional ELISA.* *Vet Res Commun.* 25, 539-553.
23. Senturk S, Metcitoglu Z, Ulgen M, Borum E, Temizel E, Kasap S, (2009). *Evaluation of serum iron and iron binding capacity in cows with paratuberculosis.* *Tierarztl Prax.* 6, 375-378.

24. **Shahmoradi AH, Arefpajohi Reza, Tadayon K, Mosavari N,** (2008). *Paratuberculosis in Holstein-Friesian cattle farms in Central Iran Trop Anim Health Prod* 40, 169-173.
25. **Shin SJ, Cho D, Collins MT,** (2008). *Diagnosis of bovine paratuberculosis by a novel enzyme-linked immunosorbent assay based on early secreted antigens of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis.* Clin Vaccine Immunol, 15, 1277-1281.
26. **Singh SV, Singh AV, Singh R, Sharma S, Shuklab N, Misraa S, Singh PK, Sohala JS, Kumar H, Patil PK, Misrad P, Sandhu KS,** (2008). *Sero-prevalence of Bovine Johne's disease in buffaloes and cattle population of North India using indigenous ELISA kit based on native Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis 'Bison type' genotype of goat origin.* Comp Immunol Microb. 31, 419-433.
27. **Stabel, JR,** (1996). *Production of gamma-interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis.* J Vet Diagn Invest 8, 345-350.
28. **Sweeney RW, Whitlock RH, Rosenberger A,** (1992). *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows.* J Clin Microbiol. 30, 166-71.
29. **Uzoigwe JC, Khaita ML, Gibbs PS,** (2007). *Epidemiological evidence for Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis as a cause of Crohn's disease.* Epidemiol Infect. 135, 1057-1068.
30. **Yıldırım D, Civelek T,** (2013). *Prevalence of subclinical paratuberculosis in dairy cattle in Uşak Region, Kars Yöresi Sığırlarında Subklinik Paratuberkülozun Seroprevalansı* Kafkas Univ Vet Fak Derg. 19 (1), 121-126.
31. **Yoo HS, Shin SJ,** (2012). *Recent research on bovine paratuberculosis in South Korea.* Vet Immunol Immunopathol. 148, 23-28.