

Süt İneklerinde Paratüberküloz Prevalansının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Saptanması*

Burhan ÇETİNKAYA, Adile MUZ, H. Basri ERTAŞ, Hasan ÖNGÖR, İ. Yavuz SEZEN, H. Basri GÜLCÜ
Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 23119, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 29.04.1999

Özet: Bu çalışma, Elazığ ve çevresindeki süt ineklerinde paratüberkülozun prevalansını tespit etmek amacıyla yapıldı. Basit rasgele örnekleme metodu ile toplam 500 inekten toplanan süt numunelerinde hastalık etkeninin DNA'sını saptamak amacıyla *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*'e spesifik bir sekans olan IS900 ile kombine edilmiş bir Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kullanıldı. Metodun sensitivitesi, negatif olduğu bilinen süt örneklerine referans *M. avium subsp. paratuberculosis* kültürünün bir seri sulandırılmalarının (1x10⁹-10 bakteri/ml) karıştırılması ile saptandı. Bu örneklerden ekstrakte edilen DNA'ların PZR'de amplifikasyonu ve agaroz jel elektroforezde analizinde 1 ml sütte yaklaşık 50 bakteri tespit edilebildi. Toplam 500 süt numunesinin incelenmesinde ise, 25 (%5) numune PZR'de pozitif olarak bulundu. PZR pozitif süt numunelerinden hazırlanan pelet süspansiyonlarından mycobactin (4ml/litre) ilaveli Middlebrook 7H11+OADC vasıtasına yapılan ekim neticesinde 25 örneğin 17'sinde (%68) üreme tespit edildi. Hastalığın prevalansının, kültür bulguları dikkate alınarak hesaplandığında %3.4 (17/500) olduğu, ancak bu oran ile PZR'de elde edilen %5 arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlendi (p>0.05).

Sonuç olarak bu çalışma, PZR tekniğinin subklinik paratüberkülozun canlı hayvanlarda teşhisinde kültüre alternatif olarak kullanılabilceğini ortaya koymuştur. Ayrıca bu çalışmada *M. avium subsp. paratuberculosis*'in sütle önemli oranda atıldığına belirlenmesi, etkenin insanlardaki Crohn hastalığı ile ilişkisi olduğu ve yapılan birkaç çalışmada pastörizasyona dayanıklı olduğu ileri sürüldüğünden, paratüberkülozun halk sağlığı yönünden de dikkate alınması gerektiğini ortaya çıkarmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Sığır, Süt, Prevalans, Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Kültür, Paratüberküloz.

Determination of Prevalence of Paratuberculosis in Dairy Cattle by Polymerase Chain Reaction (PCR)

Abstract: The aim of this study was to determine the prevalence of paratuberculosis in dairy cattle in Elazığ and the surrounding villages. A polymerase chain reaction (PCR) based on IS900, an insertion sequence specific to *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, was used to detect mycobacterial DNA in milk samples of 500 dairy cows. The detection limit of the PCR was assessed by spiking a known negative milk sample with a dilution series (1x10⁹ to 10 bacteria/ml) of reference *M. avium subsp. paratuberculosis* culture). In the agarose gel examination of the PCR amplified products, approximately 50 bacteria/ml were detected. In the examination of 500 milk samples, 25 (5.0%) were found to be positive by PCR. Pellet suspensions from PCR positive milk samples were inoculated onto Middlebrook 7H11+OADC medium containing mycobactin (4 ml/litre), and 17 out of 25 (68%) PCR positive samples were determined to be positive by culture. When the prevalence of the disease was estimated with culture results taken into consideration, it was determined to be 3.4% (17/500), but the difference between this and 5% of the PCR was not statistically significant (p>0.05).

In conclusion, it was shown that PCR may successfully be used as an alternative to culture in the diagnosis of subclinical paratuberculosis in live animals. In addition, the finding that *M. avium subsp. paratuberculosis* was being shed in the milk of animals in a significant proportion, suggests that paratuberculosis should also be considered seriously in terms of public health, because of the link between *M. avium subsp. paratuberculosis* and Crohn disease in man, and because the agent may survive pasteurisation.

Key Words: Cattle, Milk, Prevalence, Polymerase Chain Reaction, Culture, Paratuberculosis.

Giriş

Paratüberküloz (Johne hastalığı), ruminantların kronik ishal ve kilo kaybı ile seyreden bulaşıcı bir hastalığı olup etkeni *Mycobacterium paratuberculosis*'tir. Ancak son yıllarda yapılan fenotipik ve genotipik çalışmalar neticesinde bu etkenin *Mycobacterium avium*'a çok yakın olduğu ortaya konduğundan ayrı bir tür olarak değil *M.*

avium'un bir alt türü olarak kabul edilmesi ve *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* olarak yeniden adlandırılması gerektiği ileri sürülmüştür (1-4).

Paratüberküloz ile ilgili en önemli problemlerden birisi, subklinik infeksiyonu teşhis edecek güvenilir ve hızlı bir metodun mevcut olmayışıdır. Kültür, halihazırda mevcut en güvenilir metottur. Ancak, uzun süre

*Bu çalışma TÜBİTAK (VHAG-1292) tarafından desteklenmiştir.

gerektirmesi, selektif vasat gereksinimi, kontaminasyon problemi, zorluğu ve pahalı olması gibi dezavantajlara sahiptir. Bunun yanı sıra hastalığın teşhisinde diğer testler (immünojenik testler) de yoğun olarak kullanılmaktadır. Ancak, genel olarak ele alındıklarında ucuz ve çabuk olmalarına rağmen subklinik ya da asemptomatik taşıyıcıları saptamada yetersiz olduklarından ve ayrıca hastalığın anerji basamağında yanlış sonuçlar verdiklerinden paratüberkülozun teşhisinde pek kullanışlı değildirler.

Son yıllarda moleküler biyolojide yapılan ilerlemeler daha çabuk ve güvenilir teşhis metodlarının geliştirilmesi yönünde umut verici olmuştur. Bu konuda kullanılan çeşitli DNA problemleri (16S rRNA'dan türetilen) teşhis amacıyla kullanılmış, fakat *M. avium subsp. paratuberculosis*'i genetik olarak %90'ın üzerinde yakınlığı bulunan *M. avium*'dan ayırt etmede yetersiz kalmışlardır (5, 6). Ancak son yıllarda geliştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve etkenin genomunda bulunan ve sadece *M. avium subsp. paratuberculosis*'e spesifik olduğu bildirilen insertion sekans 900 (IS 900)'ün saptanması hastalığın teşhisinde yeni bir sayfa açmıştır (7, 8). Bu metod, saf kültürden elde edilen genetik materyale tatbik edildiğinde çok spesifik olmasına rağmen klinik materyaller ile çalışıldığında çeşitli inhibitör faktörler ve ekstraksiyon metodlarının yetersiz olması nedeniyle problemler oluşturmaktadır (9-11).

Paratüberküloz hastalığının son yıllarda büyük ilgi görmesinin en önemli nedenlerinden birisi hastalık etkeni olan *M. avium subsp. paratuberculosis*'in insanlarda paratüberküloza benzer bir tablo sergileyen Crohn hastalığının etiyolojisinde önemli rolü olduğuna dair kayda değer delillerin ortaya atılması olmuştur (12-15). Crohn hastalığı, sindirim sistemini özellikle ince bağırsakları etkileyen kronik bir hastalık olup histopatolojik tablosu ruminantlardaki paratüberküloza büyük benzerlik göstermektedir.

Etkenin gaitanın yanı sıra sütle de atıldığı ve infekte sütü tüketen yavruların infeksiyona kolayca yakalandıkları bilinmektedir (16, 17). *M. avium subsp. paratuberculosis*'in zoonoz olabileceğine dair önemli ipuçlarının ortaya konması ve son yıllarda yapılan çalışmalarda etkenin pastörizasyon normunu aştığının bildirilmesi, hastalığı insan sağlığı açısından da önemli bir konuma getirmiştir (18, 19).

Paratüberküloz hastalığı dünyanın her tarafında özellikle ılıman iklime sahip olan İngiltere, Danimarka, Fransa, Almanya ve Hollanda gibi Avrupa ülkeleri ile Amerika, Avustralya ve Kanada'da görülmektedir.

Paratüberküloz ihbarı mecburi bir hastalık olmadığı için ve gerçek prevalansı ortaya koyacak bir teşhis metodu mevcut olmadığından, hastalığın prevalansı ile ilgili tahminler çoğunlukla kesimhanelerde toplanan materyallerin incelenmesi neticesinde elde edilmiştir. Amerika'nın değişik eyaletlerinde yapılan çalışmalar, sığırlarda hastalığın prevalansının %1.6 ile %18 arasında değiştiğini ortaya koymuştur (20, 21). Hastalığın prevalansının Güney Avustralya'da %0.43, Danimarka'da %2.3 ve İngiltere'de ise %3.5 olduğu bildirilmiştir (22-24). İngiltere'de yapılan ulusal bir anket çalışmasında ise 1985-1994 yılları arasında süt sığırları çiftçilerinin %4.9'u, 1993'de %1.5'i ve 1994'de ise %1.3'ü sürülerinde paratüberkülozun varlığını bildirmişlerdir (25).

Ülkemizdeki ruminant popülasyonunda paratüberkülozun varlığı bilinmemektedir, ancak bu hastalık ile ilgili son yıllarda kayda değer bir çalışma mevcut değildir. Paratüberkülozun seroprevalansını saptamak amacıyla Orta Anadolu'da yapılan bir çalışmada, sığır serumlarının CFT ile incelenmesi neticesinde %2.7 oranında pozitiflik elde edilmiştir (26). CFT halen uluslararası hayvan ithallerinde kabul gören bir metod olmakla birlikte birçok etkenle kros reaksiyon vermektedir ve aynı zamanda subklinik infeksiyonu tespit etmede yetersiz olduğu için spesifitesi de düşüktür. Bu çalışmanın dışında hastalık keçilerde de birkaç patolojik çalışma neticesinde ortaya konmuştur (27, 28).

Bu çalışmada, özellikle erişkin sığırlarda dünya ekonomisine verdiği zararlar sebebiyle ilk sıralarda yer tutan paratüberkülozun Elazığ yöresindeki süt ineği popülasyonundaki prevalansının PZR ile saptanması amaçlandı. Ayrıca PZR'de pozitif sonuç veren numunelerin kültürü yapılarak PZR tekniğinin bu hastalığın teşhisinde en güvenilir kabul edilen fakat hastalık etkeninin in vitro olarak üretilebilmesi için uzun zaman (3-4 ay) gerektiren kültür metoduna bir alternatif olup olmayacağına saptanması da hedeflendi.

Materyal ve Metod

Numunelerin Toplanması: Temmuz 1997-Ocak 1998 tarihleri arasında Elazığ merkeze bağlı toplam 34 köyden 200 adet, ilçelerden Karakoçan'a bağlı 10 köyden 79, Palu'ya bağlı 8 köyden 51, Kovancılar'a bağlı 7 köyden 65, Sivrice'ye bağlı 6 köyden 39, Baskil'e bağlı 8 köyden 40 ve Keban ilçesine bağlı 5 köyden 26 adet olmak üzere toplam 78 farklı birimden 500 adet süt numunesi toplandı. Bu numuneler rasgele olarak tamamen sağlıklı görüşte 1.5-2 yaşın üstündeki ineklerden toplandı. Numunelerin toplanması esnasında kros-kontaminasyon riskini asgariye indirmek için eldiven

giyilmesi ve meme uçlarının alkolle temizlenmesi gibi hijyenik tedbirlere riayet edildi. Numuneler steril tüplere alındıktan sonra derhal laboratuara taşınarak işleninceye kadar -20°C'de muhafaza edildi. Süt numunelerine ilaveten, örnek popülasyonunu oluşturan hayvanlar ile ilgili birtakım veriler toplamak amacıyla bir mini-anket formu hazırlandı. Bu anket formuna süt örneklerinin alındığı hayvanların yaşı, ırkı, doğum sayısı, beslenme şekli, birimdeki toplam sığır sayısı, birimdeki sığırlarda paratüberkülozun tipik belirtileri olan kronik ishal ya da kilo kaybının görülüp görülmediği, döllenme tarzı (tabii ya da suni tohumlama) ve gerekli durumlarda bazı açıklamaları içeren bilgiler kaydedildi.

DNA İzolasyonu: Süt numunelerinden 10 ml miktarında alınarak 20.000 rpm'de bir saat süreyle santrifüj edildi. Elde edilen peletler 1 ml distile suda süspansiyon edilerek 500 µl'lik volümler halinde iki ayrı steril eppendorfa aktarıldı. Bunlardan birisi DNA izolasyonu için aşağıdaki işlemlere maruz bırakılırken diğeri yeniden -20°C'ye konarak PZR'de pozitif sonuç vermesi durumunda kültür için saklandı.

DNA izolasyonu için ayrılan süspansiyon, 13.000 rpm'de 10 dak. santrifüj edildikten sonra elde edilen pelet 300 µl distile su ile yeniden süspansiyon edilerek 56°C'de 30-45 dak. inaktivasyonu müteakip 2 saat süreyle kaynatma işlemine tabi tutuldu. Kaynatma işleminden sonra süspansiyona aynı volümde (300 µl) Tris-HCl ile satüre edilmiş fenol (Sigma) ilave edildi, süspansiyon elle 4-5 dak. süreyle iyice çalkalandı ve yüksek devirde (13.000 rpm) 10 dak. süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra eppendorfun üst kısmındaki solüsyon fenol karışımından ibaret olan ve gözle görülebilen bir çizgiyle ayrılmış olan alt kısma dokunmadan bir mikropipet vasıtasıyla başka bir eppendorfa aktarıldı. Daha sonra DNA'nın presipitasyonu işlemine geçildi.

Süspansiyona 0.1 volüm 3 M sodyum asetat ve 2.5 volüm saf ethanol ilave edildi. Süspansiyon iyice karıştırıldıktan sonra -20°C'de bir saat bekletildi. Daha sonra süspansiyon 13.000 rpm'de 10 dak. santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet, önce 300 µl miktarındaki %90'lık ve daha sonra da %70'lik ethanol ile muamele edildi. Bu basamaklar arasında süspansiyon 13.000 rpm'de 5 dak. süreyle santrifüj edildi ve son olarak elde edilen pelet bir saat süreyle kurumaya bırakıldı. Pelet kurulduktan sonra 50 µl'lik distile su ya da Tris-EDTA ile yeniden süspansiyon edildi ve PZR için bu süspansiyondan 5 µl kullanıldı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): Toplam 50 µl'lik volümde hazırlanan PZR karışımına; 5 µl 10xPCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂

%1 Triton X-100), deoksinükleotitlerin herbirinden 250 µM, 2 U Taq DNA polymerase enzimi (Promega), *M. avium subsp. paratuberculosis*'e spesifik 1451 bp'lik bir sekans olan IS 900'den elde edilen Primer 90 (5'TTCGGGGCCGTCGCTTAGG-3') ve Primer 91 (5'-GAGGTCGATCGCCCACGTGA-3') (29)'den 20 pmol oranlarında ilave edildi. Bu karışım steril distile su ile 45 µl'ye tamamlandı ve 5 µl hedef DNA adı verilen ve sütlerden izole edilmiş DNA solüsyonlarından ilave edildi ve son olarak da tüpler arası kontaminasyonu ve yüksek ısıdan dolayı buharlaşmayı önlemek amacıyla karışımın üzeri 100 µl'lik mineral yağ ile kaplandı.

Bu karışımlar 0.5 ml'lik eppendorflarda hazırlandı ve touchdown thermocycler (Hybaid, İngiltere) adı verilen ve PZR reaksiyonlarının gerçekleştiği makinaya yerleştirildi. PZR amplifikasyonu için 94°C'de 1 dak. denatürasyon, 55°C'de 1 dak. hibridizasyon ve 72°C'de 2 dak. sentez basamakları 30 siklus halinde gerçekleştirildi.

Elektroforez: Amplifiye edilen DNA, agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutuldu. %1.5 oranında agaroz jel hazırlandıktan sonra 7 µl numune, 3 µl loading solüsyonu (blue-orange dye, Sigma) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yerleştirildi. Elektroforez tampon solüsyonu olarak Tris-Borik asit-EDTA (TBE) buffer kullanıldı ve bir mini jel elektroforez tankında (Hybaid, İngiltere) 60 voltta bir saat süreyle elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Elektroforezi müteakip agaroz jel, ethidium bromide (10 mg/ml) ile 30 dak. süreyle boyandı ve ultraviyolede incelenerek sonuçlar gözlemlendi. Bantların moleküler ağırlığını saptamak için DNA ladder (Promega) adı verilen 100 bp'lik bir marker kullanıldı. 400 bp uzunluğundaki bantlar pozitif olarak değerlendirildi.

Metodun Sensitivitesi: Çalışmada kullanılan PZR tekniğinin sensitivitesini tespit etmek amacıyla sağlıklı bir inekten alınan bir miktar süt 10 ml'lik volümlerde santrifüj tüplerine dağıtıldı. Bu tüplere 1x 10⁹'dan yaklaşık 10 bakteriye değişen dilüsyonlarda hazırlanan referans *M. avium subsp. paratuberculosis* (Etlik Veteriner ve Hayvancılık Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir) sulandırılmaları (200 µl'lik volümler halinde) ilave edildi. Bir tüp ise bakteri katılmaksızın kontrol olarak kullanıldı. Dilüsyonlardaki mikroorganizma sayısı spektrofotometrede 550 nm'deki optik dansiteleri ölçülerek bu ölçümlerin McFarland standart tüpleri ile karşılaştırılması neticesinde belirlendi. Metodun sensitivitesinin tayininde PZR'de ölü mikroorganizmaların DNA'larının da çoğaltıldığı bilindiği için, sulandırılmadaki bakteri sayısını belirlemede en uygun metod olarak canlı ve ölü mikroorganizmaları birlikte değerlendiren

Spektrofotometre ve McFarland standart tüpleri kombinasyonu kullanıldı. Daha sonra bakteri katılmış sütlerden yukarıdaki metoda göre DNA izole edilerek PZR'ye tabi tutuldu.

Kontaminasyon: Metodun herhangi bir aşamasında meydana gelebilecek muhtemel bir kontaminasyonu tespit etmek amacıyla gerek DNA ekstraksiyonu basamaklarında ve gerekse PZR'de negatif ve pozitif kontroller kullanıldı. Negatif kontrollerde DNA amplifikasyonunun hiçbir zaman şekillenmemesi tekniğin kontaminasyondan ari olduğunu ortaya koymaktadır.

Süt Numunelerinin Kültürü: PZR'de pozitif sonuç veren süt numunelerinden etken izole etmek amacıyla, selektif vasatlara ekim işlemine geçilmeden önce, *M. avium subsp. paratuberculosis*'in in vitro üretilmesi zaman gerektirdiğinden ve kontaminasyon ihtimali çok yüksek olduğundan numunelerin dekontaminasyonu yapıldı. Bu amaçla daha önce -20°C'de muhafaza edilen pelet süspansiyonları çözdürüldükten sonra 5 ml'ye (santrifüj edilmemiş ve -20°C'de muhafaza edilen orijinal sütlerle) tamamlandı. Daha sonra süspansiyona 45 ml %0.75'lik cetylpyridinium chloride (CPC, Sigma) ilave edilerek oda sıcaklığında 18-24 saat bekletildi. 10 ml miktarında süpernatant alınarak 5000 rpm'de 15 dak. süreyle santrifüj edildikten sonra elde edilen pelet 10 ml steril fizyolojik tuzlu su ile yıkandı ve tekrar aynı devirde santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılarak elde edilen pelet birkaç damla (1 ml) steril fizyolojik tuzlu suda yeniden süspansiyon edildi ve bu süspansiyondan birkaç damla alınarak 20 ml'lik vidalı şişelerde hazırlanan ve mycobactin içeren (4 ml/litre) Middlebrook 7H11 + OADC vasatına (Difco) ekimleri yapıldı. Numuneler vasatlara ekildikten sonra şişeler ağızları hafif kapalı bir şekilde 48 saat süreyle horizontal olarak 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra şişelerin ağızları iyice kapatılarak vertikal pozisyona getirildi ve bu şekilde inkübasyona devam edildi. Belirli periyotlarla kontrol edilen kültürler ekimi müteakip 12-16 hafta sonra değerlendirildi ve bu süre sonunda üreme tespit edilmeyen numuneler negatif olarak kabul edildi. Üreme tespit edilen kültürlerden DNA izolasyonu yapılarak PZR işlemine tabi tutuldu ve böylece üremelerin *M. avium subsp. paratuberculosis* yönünden kontrolü gerçekleştirildi. Ayrıca kültürlerden hazırlanan slaytlar ZN metodu ile boyanarak aside dirençli mikobakterilerin mevcudiyeti mikroskopta incelendi.

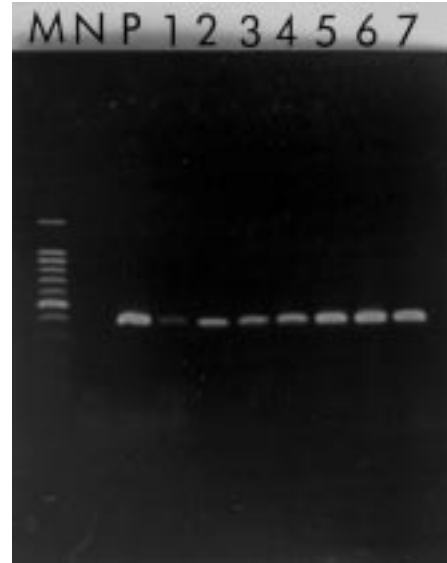
İstatistiksel Analiz: Çalışma populasyonundaki numune sayısı %95 güvenilirlik sınırları içerisinde %50'lik tahmini prevalans ve %5 hata payı esas alınarak hesaplandı. Bu işlem Epi-Info version 6 adı verilen bir programda yapıldı (30). Çalışmada süt numunesi toplanan

hayvanlarla ilgili mini anket formuna kaydedilen veriler dBASE® (Borland International Inc., USA) programına yüklendi ve Epi-Info version 6 programında analiz edildi. Oranlar arasındaki farklılıklar chi squared (χ^2) testi ile değerlendirildi ve 0.05'den düşük bir ihtimal istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

Bulgular

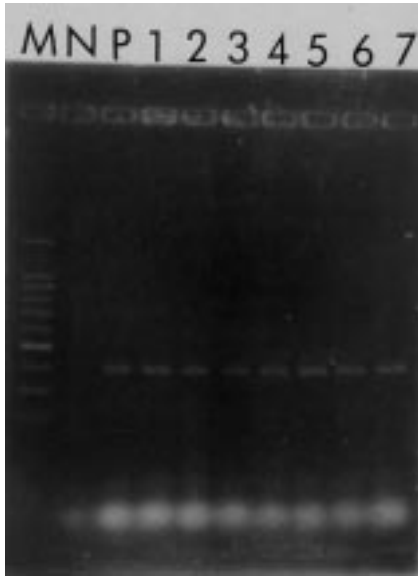
Metodun Sensitivitesi: Sağlıklı bir inekten alınan 10 ml'lik volümler halindeki süt örneklerine 1×10^9 'dan başlayıp yaklaşık 10 bakteriye kadar değişen dilüsyonlarda hazırlanmış bakteri sulandırılmalarının katılmasıyla gerçekleştirilen DNA ekstraksiyonu ve PZR'de amplifikasyon neticesinde, çalışmada kullanılan metodun 1 ml sütte yaklaşık 50 kadar bakteriyi tespit edebildiği saptandı (Şekil 1).

PZR Bulguları: Çalışmada Elazığ ve ilçelerindeki 2 yaş ve üstü toplam 500 inekten toplanan sütlerden ekstrakte edilen DNA'ların PZR'de amplifiye edilmesi ve agaroz jelde elektroforeze tabi tutulması neticesinde 25 (%5) örnekte 400 bp uzunluğunda pozitif bantlar elde edildi (Şekil 2).



Şekil 1.

Çalışmada kullanılan metodun sensitivitesini saptamak amacıyla değişik dilüsyonlarda *M. avium subsp. paratuberculosis*'in negatif süt numunelerine katılması sonucu ekstrakte edilen ve PZR'de amplifiye edilen DNA'ların ethidium bromide ile boyalı agaroz jel elektroforezde görünümü. M, DNA ladder (Moleküler marker, 100bp); N, Negatif kontrol; P, Pozitif kontrol; 1-7, Etken katılmış sütlerden elde edilen PZR ürünleri (1 ml sütte 50 bakteriden 5×10^7 bakteriye kadar).



Şekil 2. İnek sütlerinden elde edilen DNA'ların PZR'de analizi sonucu oluşan 400 bp'lik bantları gösteren ethidium bromide ile boyanmış %1.5'lük bir agaroz jel. M, DNA ladder (100bp); N, Negatif kontrol; P, Pozitif kontrol; 1-7, Pozitif süt örnekleri.

Paratüberkülozun ilçelere göre dağılımı incelendiğinde, hastalığın Keban'dan toplanan örneklerde hiç saptanmadığı, buna karşılık merkez ve Karakoçan ilçesine bağlı köylerde %6 civarında bir prevalansa sahip olduğu görüldü (Tablo 1). Ancak ilçeler arasında hastalığın prevalansı bakımından elde edilen oranlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmadı ($p>0.05$).

Hastalığın ırklara göre dağılımı incelendiğinde, en yüksek prevalansın %6.3 ile melez ırklarda elde edildiği ve en düşük prevalansın ise %3.5 ile kültür ırklarında görüldüğü saptandı (Tablo 2). Ancak ırklar arasındaki

farklılık da istatistiksel olarak önemli bulunmadı ($p>0.05$).

Hastalığın yaşa göre dağılımı göz önüne alındığında en fazla %5.6 ile 5-7 yaş grubundaki ineklerde görüldüğü ve bunu %5.2 ile 2-4 yaş grubu ineklerin takip ettiği saptandı (Tablo 3). Yaş bakımından elde edilen prevalans değerleri arasındaki farklılık da istatistiksel olarak önemli bulunmadı ($p>0.05$).

Paratüberkülozun bulaşmasında infekte boğanın spermalarının önemli rol oynayabileceği bilinmektedir. Bu sebepten dolayı çalışmada, ineklerin döllenme şekli ile ilgili veriler de toplandı. Döllenme tipi göz önüne alındığında, hastalık %5.5 ile daha çok tabii olarak dölenen ineklerde görülürken, suni tohumlama yapılan ineklerde ise %3.3'lük bir prevalans elde edildi (Tablo 4). Ancak hastalık ile döllenme şekli arasında da önemli bir ilişki saptanmadı ($p>0.05$).

Mini ankette süt numunelerinin toplandığı ahırlardaki toplam hayvan sayıları da kaydedildi ve bu ahırlardaki toplam 2298 adet sığırın hiç birisinde kronik ishal ya da kilo kaybının mevcudiyeti bildirilmedi. Dolayısıyla çalışma popülasyonunu teşkil eden hayvanlar ve bu hayvanların bulunduğu ahırlardaki diğer hayvanlar çalışma esnasında klinik olarak paratüberküloz şüphesi taşıyorlardı.

Kültür Bulguları: PZR'de pozitif sonuç veren 25 süt örneğine ilaveten PZR negatif olan numunelerden rasgele seçilmiş 25 adet örnekten Middlebrook 7H11 + OADC selektif vasatına yapılan ekim neticesinde pozitif örneklerin 17'sinde (%68) üreme görülürken negatif örneklerde herhangi bir üreme gözlenmedi. Paratüberkülozun prevalansı kültür bulguları dikkate alınarak hesaplandığında %3.4 (17/500)'lük bir oran elde edildi. Kültür pozitif numunelerden hazırlanan preparatların ZN ile boyanması neticesinde mikroskopta

İlçe	Köy sayısı	PZR pozitif (%)	Toplam Numune Sayısı
Merkez	34	12 (%6)	200
Karakoçan	10	5 (%6.3)	79
Palu	8	2 (%3.9)	51
Kovancılar	7	3 (%4.6)	65
Sivrice	6	1 (%2.6)	39
Baskil	8	2 (%5)	40
Keban	5	0	26
Toplam	78	25 (%5)	500

Tablo 1. PZR bulgularının ilçelere göre dağılımı.

$p=0.84$

Tablo 2. PZR bulgularının ırklara göre dağılımı.

İrk	PZR pozitif (%)	Toplam Hayvan Sayısı
Yerli ırklar	9 (%5.3)	169
Kültür ırkları	6 (%3.5)	172
Melez ırklar	10 (%6.3)	159
Toplam	25	500

p=0.49

Tablo 3. PZR bulgularının yaşa göre dağılımı.

Yaş (yıl)	PZR pozitif (%)	Toplam Hayvan Sayısı
2-4	7 (%5.2)	134
5-7	13 (%5.6)	233
8-10	5 (%4.5)	111
>10	0	22
Toplam	25	500

p=0.98

Tablo 4. PZR bulguları ile döllenme tipi arasındaki ilişki.

Döllenme tipi	PZR pozitif (%)	Toplam Hayvan Sayısı
Tabii tohumlama	20 (%5.5)	363
Suni Tohumlama	4 (%3.3)	121
Tabii+Suni Toh.	1 (%6.3)	16
Toplam	25	500

p=0.6

kümler halinde aside dirençli mikobakteriler görüldü. Üreme tespit edilen kültürlerden alınan kolonilerden DNA ekstrakte edilerek PZR'de incelenmesi neticesinde hepsinin de *M. avium subsp. paratuberculosis*'e ait olduğu saptandı. Kültür ve PZR bulgularına göre hesaplanan prevalans oranları (kültürde %3.4 ve PZR'de %5) arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmadı ($p>0.05$).

Tartışma ve Sonuç

Paratüberküloz, ruminantlarda özellikle sığırcılık endüstrisinde yapmış olduğu önemli ekonomik kayıplar nedeniyle dünya çapında büyük bir önem taşımakla

birlikte ülkemizde bu konuda kayda değer bir çalışma mevcut değildir. Dolayısıyla bu hastalığın gerek bölgemiz, gerekse ülkemizdeki potansiyeli ve ülkemiz hayvancılığı için oluşturduğu riskin ne boyutlarda olduğu bilinmemektedir. Bu çalışma, Elazığ ve ilçelerindeki süt ineği populasyonunda paratüberküloz hastalığının prevalansını, ilçeler arası dağılımını ve yaş, ırk ve döllenme tipi ile hastalık arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla gerçekleştirildi.

Bu çalışmada bölgemizde paratüberkülozun süt ineklerinde %5'lik bir prevalans ile seyrettiği saptandı. Bu oran tamamen sağlıklı görünüşte olan 2 yaş ve üzeri ineklerin sütlerinden DNA izole edilmesi ve PZR'de amplifikasyonu neticesinde elde edildi. Etkenin dış ortama atıldığı başlıca yol sindirim sistemi (gaita ile) olmakla beraber, sütle atılımının da önemli ölçüde gerçekleştiği ve klinik olarak hastalanmış hayvanların %35'inin etkeni bu yolla attıkları bildirilmiştir (16). Ancak paratüberkülozun çoğunlukla subklinik olarak seyretmesi ve subklinik olarak infekte hayvanların sadece %11.6'sının etkeni sütle atması %5'lik prevalansın önemini daha da artırmaktadır (17). Dolayısıyla gaita gibi etkenin daha fazla atıldığı materyallerle çalışıldığı zaman bu oranın daha yüksek olacağı kuvvetle muhtemeldir.

Çalışmada materyal olarak süt kullanılmasının başlıca nedeni, hastalığın insan sağlığı açısından önemini ortaya koymaktır. Ayrıca gaita ile yapılan PZR denemelerinin çeşitli nedenlerle inhibe olması dolayısıyla sütte PZR'nin latent *M. avium subsp. paratuberculosis* infeksiyonlarını teşhis etmede uygun bir test olduğu önerilmiştir (31).

Bu çalışma, görünüşte tamamen sağlıklı ineklerden toplanan sütlerde paratüberkülozun PZR ile direkt teşhisine yönelik olarak dünyada yapılan ilk epidemiyolojik çalışma olup subklinik paratüberkülozun canlı hayvanda PZR ile teşhisinin mümkün olduğunu ortaya koymuştur. İngiltere'de buna benzer bir çalışma süpermarketlerde tüketime sunulan pastörize karton sütlerde gerçekleştirilmiş ve numunelerin önemli bir oranında (%7) *M. avium subsp. paratuberculosis* saptanmıştır (31). Ancak böyle bir çalışmada kartonlardaki sütlerin elde edildiği hayvanların infeksiyon durumlarını ortaya koymak söz konusu olmadığı için, ve süt inekten sağılıp marketlerde tüketime hazır hale getirilinceye kadar pek çok aşamadan geçtiği için bu karton sütlerde *M. avium subsp. paratuberculosis*'in saptanması sütle alındığı hayvanın infekte olduğunu kanıtlamaz. Çünkü sütle bu aşamalardan geçerken çevresel bir kontaminasyona maruz kalması ve dolayısıyla infekte bir hayvandan alınmış dahi olsa pozitif sonuç vermesi muhtemeldir. Ancak bizim çalışmamızda süt, direkt olarak hayvandan

sağılarak alındığından ve gerek süt toplanırken, gerekse PZR işlemleri esnasında kontaminasyonun önüne geçmek için gerekli tedbirlerin alınması, pozitif sonuçların infekte hayvandan kaynaklandığını ortaya koymaktadır.

PZR'nin en önemli dezavantajlarından bir tanesi gaita gibi klinik materyaller ile çalışıldığında, testin bazı bilinmeyen faktörlerden dolayı inhibe edilmesi ve yetersiz DNA ekstraksiyon metodlarının kullanılması nedeniyle sensitivitesinin düşük olmasıdır. Bu çalışmada süt numunelerinden DNA izole etmek için kullanılan metodun sensitivitesinin 50 bakteri/ml olduğu tespit edildi. Bu değer, İngiltere'de karton sütlerde yapılan çalışmada elde edilenden (200-300 bakteri/ml süt) daha yüksek olması çalışmada kullandığımız metodun daha duyarlı olduğunu göstermektedir (31).

Bu çalışmada ayrıca PZR pozitif numunelerin ve PZR negatif olan rasgele seçilmiş 25 süt örneğinin pelet süspansiyonlarından selektif vasatlara yapılan ekim neticesinde PZR pozitif örneklerin %68'inde üreme tespit edilirken, PZR negatif örneklerin hiç birisinde üreme görülmedi. İngiltere'de yapılan çalışmada ise PZR pozitif numunelerin %50'sinde üreme görüldüğü ve incelenen 36 PZR negatif örneğin ise %16'sında üreme tespit edildiği bildirildi (31). Çalışmamızda maddi imkansızlıklar nedeniyle bütün örneklerden ekim yapmak mümkün olmadı, ancak PZR pozitif örneklerde, Millar ve ark. (31) tarafından yapılan çalışmadakinden daha yüksek oranda üreme tespit edildi. Kültürde incelenen sekiz PZR pozitif örnekte üreme görülmemesi, PZR'nin kültür metodundan daha duyarlı olması ile açıklanabilir. Ayrıca PZR ölü mikroorganizmaların rezidüel DNA'larını da çoğaltma yeteneğinde olduğu için bu örnekler ölü mikroorganizmaları içerdiği için kültürde negatif sonuç vermiş olabilirler.

Paratüberküloz hastalığı sığırlarda, düşük süt verimi, kısırılık, aşırı kilo kaybı ve mastitis gibi ekonomik olarak büyük önem arz eden hasarlara sebebiyet vermektedir (32). Çalışmada elde edilen %5'lik prevalans, hastalığın, yaptığı bozuklukların ekonomik olarak önemli boyutlarda olması ve insan sağlığını da tehdit edebileceğine dair önemli ipuçlarının bulunması nedeniyle, ülkemiz hayvancılığının ıslahında tedbir alınması gereken hastalıklardan birisi olarak dikkate alınması gerektiğini ortaya çıkarmıştır.

İklim, beslenme ve barınak koşulları, paratüberkülozun görülme sıklığında etkili olan determinantlardan bazılarıdır (33). Elazığ ve ilçelerinde hastalığın sıklığı ile ilgili olarak elde edilen değerler arasında önemli bir farklılığın bulunmaması bu bölgelerdeki sığır populasyonlarının yukarıda belirtilen

determinantlar yönünden benzer özelliklere sahip olmalarından kaynaklanabilir. Ancak paratüberkülozun prevalansı farklı iklim ve bakım koşullarına sahip olan ülkemizin değişik bölgelerinde farklılık gösterebilir. Nitekim, bu çalışmada hastalığın prevalansı (%5) daha önce Orta Anadolu'da gerçekleştirilen çalışmada bildiren değerden (%2.7) daha yüksektir (26). Bu durum, iki bölge arasındaki iklim, barınak ve beslenme koşullarının farklı olmasından kaynaklanabilir. Ancak bu farklılığın başlıca nedeni Vural ve Atala (26) tarafından yapılan çalışmada CFT tekniği kullanılarak serumlarda antikor bakıldığı için, ancak klinik olarak hasta hayvanların tespitinin mümkün olmasından kaynaklanma ihtimali yüksektir. Halbuki hastalık daha önce de belirtildiği gibi daha çok subklinik olarak seyretmekte ve CFT subklinik olarak infekte olan hayvanları saptamada yetersiz kalmaktadır. Dolayısıyla o çalışmada daha düşük bir prevalans elde edilmesi normaldir. İngiltere'de de yapılan benzer iki çalışmada, klinik paratüberkülozun %1.0 oranında görüldüğü, ancak herhangi bir makroskopik lezyon tespit edilemeyen kesimhane materyallerinde yapılan çalışmada ise %3.5 oranında paratüberküloz etkeninin saptandığı bildirilmiştir (24, 34). Bu iki çalışmanın da aynı bölgede yapılmış olması klinik ve subklinik paratüberküloz ilişkisini ortaya koymada ayrıca dikkate değerdir. Subklinik olarak infekte olan hayvanların önemli bir bölümünün yaşamları boyunca hastalık belirtisi göstermediği bilinmekte ve bir sürüdeki infekte hayvanların sadece %5-10'unun klinik belirti gösterdiği ileri sürülmektedir (35).

Çalışmada paratüberkülozun daha çok tabii olarak tohumlanan ineklerde görülmesi, hastalığın bulaşmasında önemli rol oynayan kaynaklardan birisinin de infekte boğa sperması olduğu fikrini desteklemektedir (36).

İrk, paratüberkülozda önemli bir determinant olup yapılan çalışmalarda Ada ırklarının, özellikle Jersey ırkındaki sığırların diğer ırklara nazaran hastalığa çok daha duyarlı oldukları bildirilmiştir (37-40). Ancak bu duyarlılığın sebebi bilinmemekte olup genetik faktörü üzerinde durulmaktadır. Bu çalışma populasyonundaki sığırların sadece %1 (5/500)'i Jersey ırkında olup hiçbirisinde pozitif sonuç elde edilemedi. Jersey ırkının bölgemizde yaygın olmaması ve çalışma populasyonunun çok az bir oranını oluşturması, bu ırkta pozitif sonuç elde edilememesinin nedeni olabilir.

Sonuç olarak bu çalışma, paratüberkülozun ülkemizdeki ruminant populasyonundaki potansiyelinin ve risk faktörlerinin belirlenmesi ve dolayısıyla ülke ekonomisine yaptığı zararların kantitatif olarak ortaya konmasına yönelik olarak ulusal düzeyde bir

epidemiolojik çalışmanın gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Böyle bir çalışma, hastalığa karşı etkili kontrol stratejilerinin geliştirilmesine de ışık tutacaktır. Etkili kontrol stratejileri geliştirmenin ilk şartı enfeksiyonun erken teşhisi olup bu çalışmada kullanılan metodoloji bu yönde olumlu sinyaller vermiştir. Çalışmada kullanılan PZR tekniğinin referans test olarak kabul edilen, fakat önemli dezavantajları bulunan kültür metodundan daha duyarlı olduğu ortaya konduğundan, subklinik enfeksiyonun erken teşhisinde kültüre alternatif olarak kullanılabilmesi sonucuna varıldı. Ayrıca bu çalışmada *M. avium subsp. paratuberculosis*'in sütle önemli oranda atıldığı belirlenmesi, etkenin insanlardaki Crohn hastalığı ile ilişkisi olduğu ve yapılan birkaç çalışmada

pastörizasyona dayanıklı olduğu (18, 19) ileri sürüldüğünden, paratüberkülozun halk sağlığı yönünden de dikkate alınması gerektiğini ortaya çıkarmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma için gerekli olan süt örneklerinin toplanması esnasında büyük katkılarından dolayı Veteriner Sağlık teknisyeni Muhittin BAZNA ve Arş. Gör. Ali RIŞVANLI'ya ve referans *M. avium subsp. paratuberculosis* kültürünü temin eden Dr. Nuray ATALA'ya teşekkürü bir borç biliriz. Bu çalışma TÜBİTAK (VHAG-1292 nolu proje) tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Hurley, S.S., Splitter, G.A. and Welch, R.A.: Deoxyribonucleic acid relatedness of *Mycobacterium paratuberculosis* to other members of the family Mycobacteriaceae. Int. J. Syst. Bact., 1988; 38: 143-146.
2. Saxegaard, F. and Baess, I.: Relationship between *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium paratuberculosis* and "wood pigeon mycobacteria": determinations by DNA-DNA hybridization. A.M.S., 1988; 96: 37-42.
3. Yoshimura, H.H. and Graham, D.Y.: Nucleic acid hybridization studies of mycobactin-dependent mycobacteria. J. Clin. Microbiol., 1988; 26: 1309-1312.
4. Thorel, M.F., Krichevski, M. and Levy-Frebault, V.V.: Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 1990; 40: 254-260.
5. Murray, A., Moriarty, K.M. and Scott, D.B.: A cloned DNA probe for the detection of *Mycobacterium paratuberculosis*. N.Z. Vet. J., 1989; 37: 47-50.
6. Van der Giessen, J.W.B., Eger, A., Haagsma, J., Haring, R.M., Gastra, W. and Van Der Zeijst, B.A.M.: Amplification of 16S rRNA sequences to detect *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Med. Microbiol., 1992; 36: 255-263.
7. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 1988; 239: 487-491.
8. Green, E.P., Tizard, M.L., Moss, M.T., Thompson, J., Winterbourne, D.J., McFadden, J.J. and Hermon-Taylor, J.: Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. Nucleic Acids Res., 1989; 17: 9063-9073.
9. Van der Giessen, J.W.B., Haring, R.M., Vauclare, E., Eger, A., Haagsma, J. and Van Der Zeijst, B.A.M.: Evaluation of the abilities of three diagnostic tests based on the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle; their application in a control program. J. Clin. Microbiol., 1992; 30: 1216-1219.
10. Collins, D.M., Stephens, D.M. and De Lisle, G.W.: Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. Vet. Microbiol., 1993; 36: 289-299.
11. Challans, J.A., Stevenson, K., Reid, H.W. and Sharp, J.M.: A rapid method for the extraction and detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from clinical specimens. Vet. Rec., 1994; 134: 95-96.
12. Burnham, W.R., Stanford, J.L. and Lennard-Jones, J.E.: Evidence for mycobacterial aetiology of Crohn's disease. Gut, 1978; 18: 965.
13. Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Merkal, R.S., Thayer, W.R. and Couto, J.A.: Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. J. Clin. Microbiol., 1984; 24: 966-971.
14. Hermon-Taylor, J., Moss, M., Tizard, M., Malik, Z. and Sanderson, J.: Molecular biology of Crohn's disease mycobacteria. Bailliere's Clinical Gastroenterology, 1990; 4: 23-42.

15. Morgan, K.L., Çetinkaya, B. and Egan, K.: Johne's and Crohn's: Inflammatory bowel diseases with a similar aetiology?. Soc. Vet. Epidem. Prev. Med. Proc., Chester, UK (edited by Goodall, E.A. and Trusfield, M.V.), 1997 (9-11 April); 47-56.
16. Taylor, T.K., Wilks, C.R. and McQueen, D.S.: Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. Vet. Rec., 1981; 109: 532-533.
17. Sweeney, R.W., Whitlock, R.H. and Rosenberger, A.E.: *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. J. Clin Microbiol., 1992; 30: 166-171.
18. Chiodini, R.J. and Hermon-Taylor, J.: The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. J. Vet. Diagn. Invest., 1993; 5: 629-631.
19. Grant, I.R., Ball, H.J., Neill, S.D. and Rowe, M.T.: Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. Appl. Environ. Microbiol., 1996; 62: 631-636.
20. Merkal, R.S., Whipple, D.L., Sacks, J. and Snyder, G.R.: Prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes of cattle culled in the United States. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1987; 190: 676-680.
21. Chiodini, R.J. and Van Kruiningen, H.J.: The prevalence of paratuberculosis in New England. Cornell Vet., 1986; 76: 91-104.
22. Vandegraaff, R., Barton, M.D., Barry, G.R. and Van Wijk, J.G.A.: Prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in dairy cattle in South Australia. Proc. Fourth Int. Coll. Paratuberculosis, Cambridge, UK. (edited by Chiodini, R.J., Collins, M.T. and Basse, E.O.E.), 1994 (17-21 July); 9-18.
23. Jorgensen, J.B.: On the occurrence of *Mycobacterium johnei* in the mesenteric lymph nodes of abattoir cattle. Nord. Vet. Med., 1965; 17: 97-102.
24. Çetinkaya, B., Ergun, K., Harbour, D.A. and Morgan, K.L.: An abattoir-based study of the prevalence of subclinical Johne's disease in adult cattle in south west England. Epidemiol. Infect., 1996; 116: 373-379.
25. Çetinkaya, B., Erdoğan, H.M. and Morgan, K.L.: Prevalence, incidence and geographical distribution of Johne's disease in cattle in England and the Welsh borders. Vet. Rec., 1998; 143: 265-269.
26. Vural, B. and Atala, N.: Serological study on bovine paratuberculosis in central Anatolia using the micro-complement fixation and tube complement fixation tests. Etiol. Vet. Mikrobiol. Derg., 1988; 6: 87-97.
27. Yeşildere, T., Alibaşoğlu, M., Çalışkan, A.U. ve Bilal, T.: Marmara bölgesinde bir zirai üretim işletmesinde rastlanan keçi paratüberkülozisi olayları üzerinde patolojik incelemeler. İst. Üniv. Vet. Fak. Der., 1984; 10: 15-30.
28. Çiftçi, M.K. ve Hatipoğlu, F.: Dört oğuda gözlenen koyun paratüberkülozu olayları üzerinde patolojik incelemeler. Veterinarium, 1991; 2: 32-36.
29. Sanderson, J.D., Moss, M.T., Tizard, M.L. and Hermon-Taylor, J.: *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. Gut, 1992; 33: 890-896.
30. Dean, A.G., Dean, J.A., Coulombier, D., Brendel, K.A., Smith, D.C., Burton, A.H., Dicker, R.C., Sullivan, K.M., Fagan, R.F. and Arner, T.G.: Epi-Info, Version 6: A word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. Center for disease control and prevention, Atlanta, Georgia, U.S.A., 1994.
31. Millar, D., Ford, J., Sanderson, J., Withey, S., Tizard, M., Doran, T. and Hermon-Taylor, J.: IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. Appl. Environ. Microbiol., 1996; 62: 3446-3452.
32. Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J. and Merkal, R.S.: Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. Cornell Vet., 1984; 74: 218-262.
33. Çetinkaya, B.: An epidemiological study of clinical and subclinical Johne's disease (Paratuberculosis) in cattle, (PhD thesis). Dept. Vet. Clin. Sci., Univ. Bristol, England, 1996.
34. Çetinkaya, B., Ergun, K., and Morgan, K.L.: A practice-based survey of the frequency of Johne's disease in southwest England. Vet. Rec., 1994; 134: 494-497.
35. Wilson, D.J., Rossiter, C., Han, H.R. and Sears, P.M.: Association of *Mycobacterium paratuberculosis* infection with reduced mastitis, but with decrease milk production and increased cull rate in clinically normal dairy cows. Am. J. Vet. Res., 1993; 54: 1851-1857.
36. Larsen, A.B., Stalheim, O.H., Hughes, D.E., Appell, L.H., Richards, W.D. and Himes, E.M.: *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and the genital organs of a semen-donor bull. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1981; 179: 169-171.
37. Withers, F.W.: Incidence of the disease. Vet. Rec., 1959; 71: 1150-1153.
38. Katic, I.: On the occurrence of paratuberculosis in Denmark. Nord. Vet. Med., 1964; 16: 107-118.
39. Jorgensen, J.B.: Studies on the incidence of paratuberculosis in cattle in Denmark. Nord. Vet. Med., 1972; 24: 297-308.
40. Çetinkaya, B., Erdoğan, H.M., and Morgan, K.L.: Relationships between the presence of Johne's disease and farm and management factors in dairy cattle in England. Prev. Vet. Med., 1997; 32: 253-266.