



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**TRAKYA BÖLGESİNDE KESİME SEVK EDİLEN SIĞIRLARIN İLEUM
LENF YUMRULARINDA MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP.
PARATUBERCULOSIS VARLIĞININ PCR İLE ARAŞTIRILMASI**

ERHAN YALÇIN

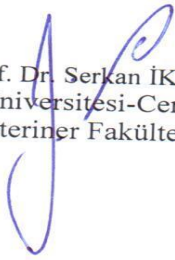
**DANIŞMAN
PROF.DR.SERKAN İKİZ**

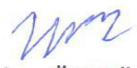
**VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

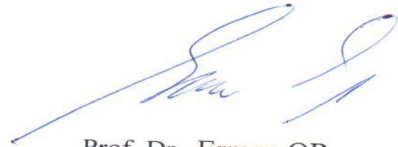
İSTANBUL-2020

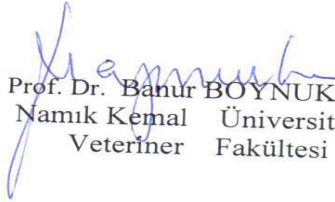
Bu çalışma 03.02.2020 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Doktora Programı Doktora Tezi olarak kabul
edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ


Prof. Dr. Serkan İKİZ
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakülte


Prof. Dr. N.Yakut ÖZGÜR
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Fakültesi

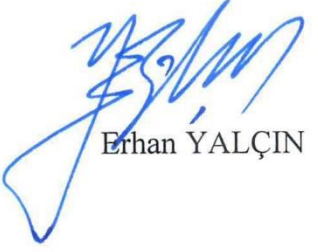

Prof. Dr. Erman OR
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
İç Hastalıkları Fakültesi


Prof. Dr. Banur BOYNUKARA
Namık Kemal Üniversitesi
Veteriner Fakültesi


Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Sencer KARAGÜL
Kocaeli Üniversitesi
Kartepe Atçılık Meslek Yüksek Okulu

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Erhan YALÇIN

İTHAF

Bu tez çalışmamı rahmetli dedem Emin YILMAZ, ninem Mahide YILMAZ ile annem ve babama ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora tezim boyunca çalışmamın her aşamasında yardımcı olan, bilgi ve önerileri ile yanımda olan, bana en büyük desteği sağlayan değerli danışman hocam Prof.Dr. Serkan İKİZ'e,

Doktora eğitimim süresince bir çok konuda bilgi ve destek veren Anabilim Dalı Başkanımız hocam Sayın Prof.Dr. Seyyal AK'a, Sn. Prof.Dr. N.Yakut ÖZGÜR'e Sn. Prof.Dr. A. Funda BAĞCIGİL'e, Sn. Doç.Dr. Kemal METİNER'e, Sn. Doç.Dr. Beren BAŞARAN KAHRAMAN'a, Sn. Doç.Dr. Belgi DİREN SİĞİRCİ'ya, Sn. Dr. Baran ÇELİK'e, Sn. Gülten KARAKUZ'a, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Sn. Araş. Gör. Barış HALAÇ'a ve Sn. Araş. Gör. A. Ilgın KEKEÇ'e,

Örnek toplamamda ve tez yazım aşamasında yardımlarını esirgemeyen mesai arkadaşlarım Veteriner Hekim Bilal EMÜL'e, Veteriner Hekim Ali Ekber GÖKKAYA'ya , Veteriner Hekim Yunus Emre KÖSEOĞLU'na, Veteriner Hekim Eda GÖKTEPE'ye, Şube Müdürüm Kamil YAMAN'a,

Doktora çalışmam ve hayatımın her anında yanımda olan annem, babam ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 23295

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hastalığın tanımı ve tarihçesi.....	3
2.2. Etyoloji.....	4
2.3. Epidemiyoloji.....	5
2.4. Patogenez	9
2.5. Klinik bulgular	11
2.6. Tanı	13
2.6.1. Nekropsi	13
2.6.2. Bakterioskopi	13
2.6.3. Kültür	13
2.6.4. PCR	15
2.6.5. Seroloji	15
2.6.5.1. ELISA	15
2.6.5.2. Komplement Fiksasyon Test (CFT).....	15
2.6.5.3. Agar Jel İmmüdifüzyon Test (AGID)	16
2.6.6. Hücresel Bağışıklık Testleri.....	16
2.6.6.1. İntradermal test.....	16
2.6.6.2. İnterferon Gamma (IFN- γ) Assay	16
2.7. Tedavi	17
2.8. Korunma ve Kontrol	17

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Gereç	19
3.1.1. Örnekler	19
3.1.2. Real-time PCR	29
3.1.2.1. Ekstraksiyon kiti.....	30
3.1.2.2. Amplifikasyon.....	30
3.1.2.3. Diğer gereçler.....	30
3.2. Yöntem.....	31
3.2.1. Real time PCR.....	31
3.2.1.1. DNA Ekstraksiyonu	31
3.2.1.2. DNA amplifikasyonu	33
3.2.2. İstatistiksel analiz.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Real-time PCR bulguları.....	35
4.2. İstatistiksel bulgular	36
5. TARTIŞMA	37
KAYNAKLAR	44
HAM VERİLER	55
FORMLAR	56
ETİK KURUL KARARI	57
PATENT HAKKI İZNİ	58
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	59
ÖZGEÇMİŞ	60

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Örneklerin alındığı hayvanların yaş, cinsiyet, ırk, kesime sevk edildiği yer, ağırlık, ishal varlığı, kesim yeri bilgileri.....	19
Tablo 3-2: DNA Ekstraktlarının miktar ve saflığı	32
Tablo 4-1: Real-time PCR ile <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> saptanan örneklerin ırk, yaş, cinsiyet, kesime sevk edildiği yer, ağırlık, kesim yeri bilgileri	35



ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 4-1: Real-time PCR amplifikasyon eğrisi (96-97 nolu örnekler) 36
- Şekil 4-2: Real-time PCR amplifikasyon eğrisi (188 nolu örnek)..... 36



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Agar Jel İmmun Difüzyon	AGID
Cycle threshold	C _T
Deoksiribonükleik asit	DNA
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	ELISA
İnseriyon sekansı	IS
İnterleukin	IL
Gecikmiş tip hipersensitivite	DTH
Herrolds's Egg Yolk Medium	HEYM
Hexadecylpyridinium chloride	HPC
Holştayn siyah alaca	Hol SA
Hücrel immun yanıt	CMI
İnterferon Gamma	IFN γ
Koloni oluşturan birim	CFU
Komplement Fikzasyon Testi	CFT
Löwenstein–Jensen	LJ
Mikrolitre	μ l
Mililitre	ml
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	MAP
Polymerase Chain Reaction	PCR
Purifiye Protein Derivatı	PPD
Ribonükleik asit	RNA
Santigrat derece	°C
Sodyum hidroksit	NaOH
Statistical Package for the Social Science	SPSS
Tümör nekroz faktörü alfa	TNF- α
Yardımcı T hücresi	Th
Ziehl Nielsen	ZN

ÖZET

Yalçın, E. (2019). Trakya Bölgesinde Kesime Sevk Edilen Sığırların İleum Lenf Yumrularında *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Varlığının PCR ile Araştırılması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Veterinerlik Mikrobiyolojisi ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada, Trakya yöresinde yetiştirilen sığırlarda paratüberküloz prevalansının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla yöredeki farklı kesimhanelerde kesilen erişkin sığırlardan ileum lenf yumruları alındı. DNA ekstraksiyonu için her lenf yumrusundan 20 mg doku örneği kullanıldı. Tüm DNA numuneleri, Roche LightCycler 480 real time PCR kullanılarak *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*'in varlığını belirlemek için amplifiye edildi.

Çalışmada 200 örneğin 3'ünün (%1,5) real time PCR ile pozitif olduğu tespit edildi.

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* tespit edilen hayvanların, ırk, yaş, cinsiyet, genel kondisyon ve kaşeksi varlığı, yetiştirildiği bölge ve kesim yeri gibi parametrelerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde, anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Sonuç olarak, Trakya yöresinde yetişen sığırların ileum lenf yumrularında spesifik DNA'nın düşük prevalansı (%1,5) umut vericidir. Halk sağlığı açısından ve ekonomik önemi nedeniyle, Johne's hastalığı hakkında Trakya yöresinde ve Türkiye'nin diğer yerlerinde farklı iklim ve yönetim koşullarına sahip çiftliklerin de dahil olduğu çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Johne's Disease, Sığır paratüberkülozu, Real-time PCR, ileal lenf yumrusu,

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 23295

ABSTRACT

Yalcin, E. (2019). Investigation on presence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis by PCR in ileal lymph nodes of slaughtered cattle in Thrace district. Istanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Veterinary Microbiology. PhD Thesis. İstanbul.

In this study, determination of prevalence of paratuberculosis in cattle raised in Thrace district of Turkey was aimed.

For this purpose, ileum lymph nodes were taken from adult cattle slaughtered in different slaughterhouses of the district. 20 mg of tissue sample from each lymph node was used for DNA extraction. All the DNA samples were amplified to determine presence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis by Roche LightCycler 480 real time PCR.

As a result, 3 (1.5%) of 200 samples were found to be positive by real time PCR.

In statistical evaluation, there is no significant difference in *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis detected animals according to race, age, gender, general condition, breeding area, location of slaughterhouse and existence of cachexia.

In conclusion, low prevalence (1.5%) of specific DNA in the ileum lymph nodes of cattle raised in Thrace district is hopeful. Because of the economic significance and importance in terms of public health of the disease, further studies on John's disease including farm-based researches that have different climate and management conditions in Thrace district and other districts of Turkey are needed.

Key Words: *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis, Johne's Disease, bovine paratuberculosis, Real-time PCR, ileal lymph node.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University-Cerrahpasa. Project No. 23295

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Paratüberküloz, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*'in (MAP) neden olduğu, sığır, koyun, keçi gibi evcil ruminantlarda ve yabani ruminantlarda ishalle seyreden kronik, yangısal ve kilo kaybı ile karakterize enfeksiyöz bir hastalıktır.

Hayvanlar arasında bulaşma genellikle feko-oral yolla, kontamine süt, kolostrum ve yemin alınması ile olduğu gibi intrauterin yolla da bulaşma olmaktadır. Hastalığın uzun süren inkübasyon periyodu boyunca enfekte hayvanlar etkeni etrafa saçmaya devam ederler. Sessiz dönemdeki ve subklinik dönemdeki hayvanların teşhisinin zor olması, subklinik dönemde etkenin etrafa saçılması hastalığının kontrolünü zorlaştırmaktadır.

Hastalığa yakalanan hayvanlarda meydana gelen kilo kaybı, süt ve döl veriminde düşüş gibi verim kayıpları ile ölüm, teşhis, tedavi, koruma ve kontrol programlarındaki giderler nedeniyle dünya genelinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Etkin bir tedavisi olmayan, koruyucu olarak ülkemizde onaylı aşısı olmayan hastalığın kontrolünde hasta hayvanların tespit edilerek sürüden uzaklaştırılması ve gerekli hijyenik tedbirlerin alınması önem arz etmektedir.

Paratüberküloz hastalığının etkeni *M. avium* subsp. *paratuberculosis*'in, insanlarda paratüberküloza benzer bulguları olan Crohn hastalığının etyolojisinde önemli rolü olduğuna ilişkin deliller bulunmaktadır. Etkenin sütün pastörizasyon sıcaklığına dayanıklı olması, insanlardaki Crohn hastalığında potansiyel rolünün olması, hayvan popülasyonunda hastalığın kontrolünün gerekli olduğunu göstermektedir.

Hastalığın teşhisinde fekal kültür gold standart test olarak kabul edilmesine rağmen etkenin izolasyon süresinin çok uzun olması, kontaminasyon gibi dezavantajları vardır. Sessiz enfeksiyon döneminde etkenin dışkı ile atılımı ve serum antikorları tespit edilemez. Bu nedenle ELISA ve Komplement Fiksasyon Testleri serum antikorlarını belirlemede yetersiz kalmaktadır. Ancak bu dönemde ileum veya mesenterik lenf yumrusu örneklerinde *M. avium* subsp. *paratuberculosis*'in kültür veya PCR yöntemi ile varlığının tespit edilebildiği bildirilmiştir.

Ülkemizde ihbarı mecburi hastalıklar listesinde olmayan hastalığın tam prevalansı bilinmemektedir. Türkiyede paratüberküloz hastalığı ile ilgili olarak süt ve dışkı

örneklerinden çalışmalar yapılmış olup, spesifitesi yüksek olan PCR yöntemi ile lenf yumrularında etkenin tespitine yönelik herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışmada, Trakya yöresinde yetiştirilerek mezbahaya kesime sevk edilen ve tesadüfi örnekleme ile seçilen iki yaş ve üzeri sığırlardan toplanan ileal lenf yumrularında Real Time PCR ile *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*'in varlığı araştırılarak, hastalığın bölgedeki prevalansının saptanması amaçlanmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hastalığın tanımı ve tarihçesi

Paratüberküloz (Johne's hastalığı) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* tarafından evcil ve yabani ruminantlarda, barsaklar ve ilgili lenf yumrularının kronik granulomatöz yangısı ile kronik entetirite neden olan infeksiyöz bir hastalıktır (Sivokumar ve ark. 2005; OIE 2014).

Paratüberküloz, sığır, koyun, keçi, deve ve manda gibi evcil ruminantlarda görülmesinin yanında yabani ruminantlarda da (geyik) görülür ve küresel bir dağılıma sahiptir. Hastalık ayrıca atlarda, domuzlarda, tavşanlarda, tilki ve gelinciklerde de bildirilmiştir (Erume ve ark. 2001; OIE 2014).

Çoğu hayvan türünde kronik ishal, kilo kaybı, kondisyon düşüklüğü ve ölüm ile karakterize olan ve özellikle ruminantları etkileyen hastalık dünya çapında hayvancılık endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Greig ve ark. 1999).

Paratüberkülozun klinik semptomları ve patolojik bulguları ilk olarak 19. yüzyılda tanımlanmıştır. Johne's Disease adı 1895'te barsak mukozasındaki asit-fast mikroorganizmaların varlığı ile sığır enteriti arasında bir bağlantı olduğunu gösteren H. A. Johne ve L. Frothingham'ın çalışmasından gelmektedir. 1906'da, Bang, tüberküloz ve nontüberküloz enterit arasında ayırım yaparak, nontüberküloz enteritin psödotüberküloz enterit olarak adlandırılmasını önermiştir. Etyolojik olarak etkenin identifikasyonu, 1912'de mikobakterileri izole etmeyi ve tanımlamayı başaran, 1914 yılında da deneysel olarak enterit oluşturduğunu gösteren F. W. Twort tarafından yapılmıştır. *Mycobacterium* cinsi içerisinde farklı bir tür olarak *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*'in tanımlanmasından sonra hastalık paratüberküloz olarak adlandırılmıştır (Cocito ve ark. 1994).

Ülkemizdeki ilk paratüberküloz olgusu 1928 yılında Sezginer tarafından sığırlarda; 1968 yılında ise Hakioglu tarafından İzmit'te koyunlarda bildirilmiştir. Keçilerde hastalık, 1973 yılında Alibaşoğlu ve arkadaşları tarafından İç Anadolu bölgesinde (Ankara'da), daha sonra da 1983 yılında Yeşildere ve arkadaşları tarafından Marmara bölgesinde (Gebze'de) bildirilmiştir (Karadaş ve ark. 2000).

2.2. Etyoloji

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*, Mycobacteriaceae familyasında tek cins olan *Mycobacterium* cinsinde yer almaktadır. Küçük (0,5-1,5 µm) sporsuz, kapsülsüz, hareketsiz ve asido-rezistans özelliğe sahip fakültatif hücre içi bir bakteridir (Atala ve Akçay 2001; Rathnaiah ve ark., 2017).

M.avium, *M.avium* subsp. *avium* (*M. avium*), *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *silvaticum* (*M. silvaticum*) olmak üzere 3 alt türe ayrılır. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* 'in alt tür gösterilmesi DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarına ve sayısal taksonomi analizine dayanmaktadır. *Mycobacterium avium intracellulare* kompleksinde yaygın olarak *M.avium* ile gruplandırılmış olmasına rağmen, *M.intracellulare* genetik olarak ayrı bir türdür. *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, fenotipik olarak mikobaktin bağımlılığı, genotipik olarak insersiyon sekansın (IS900) çoklu kopyalarının varlığı ile alt türler arasında *M.avium* ve *M.silvaticum*'dan ayırt edilebilir (Harris ve Barletta 2001).

M. avium subsp. *paratuberculosis* genomundaki insersiyon sekans (IS900) ün 15-20 kopyasının varlığı, *M.avium* ve *M. avium* subsp. *paratuberculosis* arasındaki ayırıcı özelliktir. *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M.avium* ve *M.avium* subsp. *Silvaticum*'dan restriksiyon endonükleaz analizi, restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi (RFLP), pulsed field jel lektroforezi ve alan inversiyonu jel elektroforezi gibi DNA teknikleri ile ayrılabilir. Bu organizmaların 3 ayrı gruba ayrılması, fenotipik testlere dayanan büyük bir sayısal taksonomi çalışmasında doğrulanmıştır. Thorel ve arkadaşları daha sonra bu üç grubun *M.avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ve *M.avium* subsp. *Silvaticum* olarak isimlendirilmesini önermişlerdir (Thorel ve ark. 1990; Cousins ve ark. 2002).

M. avium subsp. *paratuberculosis* suşları konakçı tercihine göre 2 gruba ayrılır. Aynı zamanda tip C olarak bilinen tip II suşlar başlangıçta sığırlarda tanımlanmıştır. Ancak koyun, keçi, deve kuşları ve hem ruminant hem de ruminant olmayan yaban hayatı içeren geniş bir konak yelpazesine sahiptirler. Tip I (tip S) suşlar en çok küçükbaş hayvanlarda bulunur ama koyunlarla yakın temas halindeki bazı sığırlarla birlikte, Güney Amerika deve kuşları, develer, geyikleri içeren diğer türlerde de artan bir şekilde rapor edilmektedir. Tip III suşları bir zamanlar ayrı bir “intermediate” grup olarak değerlendirilirken günümüzde tip I'in alt tipi olarak kabul edilmektedir. Kuzey

Amerika'da ve Asya'da olmak üzere iki farklı bizon tipi (tip B) suşu da vardır. İkincisi tip II'nin bir alt soyudur ve "Hint Bison tipi" olarak bilinir. Sığır, manda, koyun, keçi, geyik, bizon, tavşan, yaban domuzu ve diğer hayvanlarda bulunmuş ve Asya'nın bazı bölgelerinde baskın türdür. Paratuberkülozun esas olarak keçiler üzerinde etkisi olduğu, sığır ve koyunlarda sadece sporadik enfeksiyonların bildirildiği Norveç'te keçi-spesifik bir suş olduğu öne sürülmüştür (Paratuberculosis 2017).

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* % 60 lipitten oluşan kalın hücre duvarına sahiptir. Bu hücre duvarı etkeni asitlere, kimyasallara (chlorin) ve pastörizasyona karşı dirençli hale getirir ve hidrofobik özellik kazandırır. Ayrıca bu kalın hücre duvarı besinlerin alımını kısıtlayarak organizmanın çok yavaş büyümesini ve kültürünün zor olmasını sağlar (Rosenfeld ve Bressler 2010).

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* birçok dezenfektana dirençlidir. %5 lik formalin, 1/32 dilüe cresylic, 1/40 dilüe phenol, 1/1000 dilüe civabiklorür ve 1/50 dilüe kalsiyum hypochloride içeren dezenfektanlara 10 dakika maruz kalındığında, etkeni öldürmede etkili olanlardır. Ancak bu dezenfektanlar, sulu organizma süspansiyonları ile test edilmiş olup, dışkının varlığı, birçok dezenfektanın etkinliğini büyük ölçüde azaltmaktadır (Chiodini ve ark. 1984).

Paratuberküloz etkeni uzun süre hayvanın dışında hayatta kalabilir. Etken 163 gün nehir suyunda, 270 gün gölet suyunda, sığır dışkısı ve toprakta 11 ay canlı kalabilmesine rağmen idrarda 7 gün canlılığını devam ettirebilir. En az bir yıl boyunca - 14 ° C'de donarak hayatta kalabilir. Dışkının bakteristatik, idrarın bakteriosidal etkisi gözönünde bulundurulduğunda, durağan dışkı ve idar ortamında etkenin barınma olasılığı, sadece dışkı ortamına göre daha düşüktür (Chiodini ve ark. 1984).

Etken güneş ışığına, kurumaya, yüksek kalsiyum içeriğine ve yüksek pH'lı toprağa nispeten duyarlıdır. İdrar ve dışkı ile sürekli temas *M. avium* subsp. *paratuberculosis*'in ömrünü azaltır (Ayele ve ark. 2001).

2.3. Epidemiyoloji

Hastalık dünyanın birçok yerinde görülmekte ve bazı ülkelerde prevalansı artmaktadır. Paratuberküloz, yeterli yağış ve yer altı sularının olduğu ılıman iklimlerde ve bazı nemli tropik bölgelerdeki sığır ve koyunlarda baskındır. Paratuberküloz insidansı,

enfeksiyonun yayılmasına elverişli olan çevre ve hayvancılık koşulları altında tutulan hayvanlarda yüksektir (Ayele ve ark. 2001).

Paratuberküloz, beş kıtada özellikle geniş getiren evcil ve yabani hayvanları etkiler. Veteriner dünyası sığır, koyun ve keçilere odaklanmış olsa da, birçok vahşi yaşam ruminantı (geyik, antilop, dağ keçisi, papyon, deve, lama ve diğerleri) paratuberkülozdan etkilenmektedir. Ayrıca etyolojik ajan, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, at ve katırlarda çoğalır. Laboratuvar hayvanlarına (fareler, sıçanlar, tavşanlar, hamsterler, gerbiller ve kobaylar) ve kuşlara (güvercinler ve kümes hayvanları) deneysel olarak enjekte edilen *M. avium* subsp. *paratuberculosis* 'in ürediği saptanmıştır (Cocito ve ark. 1994).

Paratuberküloz ayrıca at ve domuzlarda da saptanmıştır. Domuzların deneysel enfeksiyonunun granülomatöz enterit ve lenfadenite neden olduğu bildirilmiştir. Fareler ve hamsterler hassastır ve deneysel çalışmalarda kullanılırlar. Enfeksiyon aynı zamanda egzotik türlerde ve yaban hayatındaki koyun, keçi, tavşan, tilki, geyik, kısa kuyruklu şebek gibi türlerde ortaya çıkar. Tavşanlardaki paratuberküloz ile hastalık geçmişi olan sığır çiftlikleri arasında güçlü bir istatistiksel ilişki bulunmuştur (Ayele ve ark. 2001).

M. avium subsp. *paratuberculosis*'in insanlarda Crohn hastalığının meydana gelmesinde etken olup olmadığı konusundaki süregelen belirsizlik, hastalığın önemini her zamankinden daha fazla artırmaktadır (Ayele ve ark. 2001).

Sığırlar buzağı döneminde, kontamine dışkı, süt, yem ve suyun oral yolla alınması ile enfekte olurlar (Ayele ve ark. 2001). Hastalığın genç buzağılara bulaşmasında sütün rol oynadığı, etkenlerin bu şekilde sindirim yolu ile alınmasının hastalığa neden olabildiği gösterilmiştir (Grant ve ark. 1996).

Hayvanlar, hastalık etkeninin canlılığını devam ettirebildiği uygun ortamların olduğu, enfekte hayvanlarla yakın temasın olduğu şartlar altında paratuberküloz enfeksiyonuna maruz kalmaktadır. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ile enfekte sığırlar, dışkıları ile çok sayıda etkeni etrafa saçarlar ve etken çevre koşullarına bağlı olarak uzun süre canlı kalabilir. Fekal kontaminasyon sığırlar için en yaygın enfeksiyon kaynağıdır. Farklı yoğunluk derecelerinde olsa da, enfeksiyon merada ve kapalı ahırda görülebilir (Ayele ve ark. 2001).

Yüksek prevalanslı evcil besi sürülerinden elde edilen *M. avium* subsp. *paratuberculosis* kontamine hayvansal gübrelerin tarlalarda kullanılmasıyla, çiftlik

hayvanlarından serbest dolaşan ruminantlara hastalığın geçişi muhtemeldir. Enfekte bir sığır dışkının gramında 10^6 CFU etken saçabilir, deneysel enfeksiyon çalışmalarında genç ruminantlar için infektif oral dozun 4×10^6 CFU olduğunu gösterilmektedir. Ancak çevresel bir örnekten düşük miktardaki MAP ın geri alınması, enfeksiyonun bir rezervuarının oluşmasını ve yabani ruminantlara geçişi sağlamaz. Yeni bir hastalık vakasının ortaya çıkması için tahmini olarak 6 aylıktan küçük duyarlı yaştaki hayvan tarafından, yeterli miktarda ve sıklıkta etkenin alınması gerekmektedir (Manning 2011).

M. avium subsp. *paratuberculosis*'li fetüslerin transplasental veya intrauterin enfeksiyonu ilk olarak 1935'te bildirilmiştir. Daha sonraki çalışmalarla bu bulgular doğrulanmış ve enfekte ineklerden alınan fetüslerin %20 ile %40'ının uterusunda enfekte olduğu gösterilmiştir. Genel olarak bu çalışmalar enfekte ineklerden elde edilen ve kilo kaybı, ishal gibi paratüberkülozun klinik belirtilerini gösteren, enfeksiyonun ilerlemiş aşamalarına sahip inekler ile yapılan çalışmalardır. Ancak dışkıda çok sayıda etken atılsa da sürüdeki enfekte hayvanların çoğunluğu klinik belirti göstermez (Sweeney 1996).

Hayvanlar arasındaki bulaşmanın öncelikle *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ile kontamine olan süt, kolostrum veya hayvan yemi alımıyla fekal-oral yolla olduğu düşünülmektedir. Mikroorganizmanın intrauterin yoldan bulaşma olasılığı, klinik belirti gösteren hastalıklı bir anneden doğanlarda % 20-40 ve subklinik enfeksiyonlu bir anneden doğanlarda % 10-% 20 enfekte doğum olarak belgelenmiştir (Liverani ve ark. 2014).

Ülkemizde paratüberküloz ile ilgili ilk araştırmalar 1928 yılında Sezginer tarafından yapılmıştır (Atala ve Akçay 2001).

Elazığ'da, ilk olarak 5 yaşındaki dişi bir kıl keçisinde, nekropsi ve histopatolojik bulgular, taze bağırsak ve lenf yumrusu örneklerinden hazırlanan sürme preparatlarda ve histolojik kesitlerde Ziehl Nielsen boyama yöntemi ve PCR ile paratüberküloz teşhis edilmiştir (Karadaş ve ark. 2000).

Elazığ ve ilçelerinde tesadüfi olarak seçilen, 2 yaş ve üstü 500 inekten toplanan süt numunelerinin PCR ile incelenmesi sonucunda, 25 numunede sonuç pozitif olarak bulunmuştur. PCR pozitif olarak tespit edilen süt örneklerinden yapılan kültür sonucunda 25 örneğin 17 sinde üreme görülmüştür. PCR sonuçlarına göre %5 olarak tespit edilen prevalans ile kültür çalışması sonucu tespit edilen %3,4 prevalans arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır (Çetinkaya ve ark. 2000).

İki yaş ve üzeri sığırlardan alınan kan serumlarında ELISA yöntemi ile yapılan araştırmada, coğrafi özelliklerine göre Türkiye 9 bölgeye bölünmüş, bölgelerdeki bireysel prevalans %0 ile %9,6 arasında, ülke genelindeki bireysel prevalans ise %3,7 olarak tespit edilmiştir. Her köy bir sürü olarak kabul edildiğinde, bölgelerdeki sürü prevalansı %26,6 ile %48,2 arasında değişim göstermiştir (Atala ve Akçay 2001).

Trakya yöresinde yetiştirilen, 2 ve daha yaşlı süt sığırlarından toplanan dışkı örneklerinde, PCR ile hastalık etkeninin varlığının araştırıldığı çalışmada, etken tespit edilmemiştir (İkiz ve ark. 2005).

Serum örneklerinde ELISA yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada, Kars yöresindeki subklinik paratüberküloz'un seroprevalansının %3.5, çiftlik prevalansının %41.6 olduğu, yaşları ≥ 2 -<5, ≥ 5 -<7 ve ≥ 7 olarak gruplandırılan sığırlarda paratüberkülozun seroprevalansının %1.7, %3.8 ve %5.1 olduğu tespit edilmiştir (Makav ve Gökçe 2013).

Burdur ilinde sığır, koyun, keçi sürülerindeki 2 yaş ve üzeri hayvanlardan alınan kan serumlarında ELISA ile yapılan araştırmada; sığırlarda bireysel prevalans %8-8,9, sürü-içi %17,1-20,4, sürüler-arası %46,7-57,8 koyunlarda bireysel prevalans %48->100, sürü-içi %48->100, sürüler-arası %100->100, keçilerde bireysel prevalans %24-35,9, sürü-içi %25,7-38,6, sürüler-arası %93,3->100 olarak hesaplanmıştır. Paratüberkülozun sığır, koyun ve keçilerde ırka göre dağılımının istatistiksel açıdan fark oluşturmadığı; ancak istatistiksel açıdan önemli olmasa da yaş ve sürü büyüklüğü arttıkça hastalığın görülme oranının yükseldiği tespit edilmiştir (Çelik 2015).

Trakya yöresindeki süt işletmelerindeki 2 yaş ve üzeri sığırlardan alınan fekal örnekler ile işletmelerin bulunduğu köylerdeki süt toplama tanklarından alınan süt örneklerinde F57 Real time PCR ve IS900 nested PCR yöntemi kullanılarak yapılan araştırmada *M. avium* subsp. *paratuberculosis* tespit edilmemiştir (Özpınar ve ark. 2015).

Manisa yöresindeki Holstein ırkı süt sığırlarında yapılan araştırmada, klinik olarak sağlıklı multiparoz hayvanlardan alınan serum örneklerinde, ELISA yöntemi ile subklinik paratüberküloz oranı %21,72 olarak belirlenmiştir. Örneklerin alındığı tüm ahırlarda enfeksiyonun varlığı tespit edilmiştir (Berberoğlu ve Civelek 2016).

Kırklareli yöresinde, 3-4 yaşları arasındaki klinik olarak belirti göstermeyen süt sığırlarında, ELISA yöntemi ile serumdaki antikor tespitine yönelik yapılan araştırmada

subklinik paratüberkülozun prevalansı %1,5 pozitif, %1,5 şüpheli, %97 negatif olarak tespit edilmiştir (Karakaş ve Civelek 2018).

Orta Karadeniz bölgesindeki kronik ishalli sığırlarda, 2012 ve 2014 yılları arasında ELISA yöntemi ile serumdaki *M. avium* subsp. *paratuberculosis* antikorlarının tespitine yönelik yapılan çalışmada, serum örneklerinin %10'unda, işletmelerin %46,7'sinde *M. avium* subsp. *paratuberculosis* antikorları tespit edilmiştir. 2012 yılında %2,4, 2013 yılında %21,5 ve 2014 yılında %50 oranında pozitiflik saptanmıştır (Tütüncü ve ark. 2018).

Avrupa'da sığırlarda paratüberkülozun sürü prevalansının %7-55 arasında olduğu bildirilmiştir (Ayele ve ark., 2001).

Almanya'da süt sığırı işletmelerinde serum ELISA yöntemi ile yapılan çalışmada %4,24 (Denzin ve ark., 2011), fekal kültür yöntemi ile yapılan çalışmada bireysel prevalans %41,43 olarak tespit edildiği bildirilmiştir (Donat ve ark., 2015).

Almanya'nın bazı bölgelerinde süt sürülerinde prevalansın % 84,7 e kadar ulaştığı rapor edilmiştir. Avusturyada sığır sürülerinde hastalığın prevalansı 1994-1997 yılları arasında %6,97 iken 2002-2003 yılları arasında %19,05 e çıkmıştır (Khol ve Baumgartner, 2012).

Belçika'da 2000 yılında serum ELISA yöntemi ile yapılan çalışmalarda süt işletmelerindeki sığırlarda bireysel prevalans %1,16; et besiciliği işletmelerinde ise %0,52 olarak; süt sığırlarında sürü bazında prevalans %32; et besiciliği işletmelerinde sürü bazında prevalans %32 olarak tespit edilmiştir (Boelart ve ark., 2000).

Amerika Birleşik Devletleri'nde serum ELISA yöntemi ile yapılan çalışmalarda süt işletmelerindeki sığırlarda bireysel prevalans %3,8 (Lombard ve ark., 2005), başka çalışmada %4,12 (Hirst ve ark., 2004), sürü bazında fekal kültür ve PCR ile yapılan çalışmada prevalans %76,92 (Toth ve ark., 2013); et besiciliği işletmelerinde serum ELISA yöntemi ile yapılan çalışmada sürü bazında prevalans %7,9 olarak tespit edilmiştir (Dargatz ve ark., 2001).

2.4. Patogenez

Hayvan MAP'ye oral olarak maruz kaldığında, etken iki ayrı portal yol ile vücuda yayılabilir. Yüksek dozdaki MAP ile buzağılarda yapılan bazı deneysel infeksiyon çalışmalarında, etken alındıktan kısa bir süre sonra retrofaringeal lenfoid dokuda ve

tonsillerden başlayarak yayılma olmuştur. MAP'nin tonsil kriptlerine doğrudan inokülasyonu da enfeksiyona yol açabilir ve hematojen olarak veya lenf yoluyla mezenterik lenf düğümlerine ve ileuma yayılabilir. Ancak deneysel çalışmalardan elde edilen kanıtların çoğu ana giriş yolu olarak ileumu göstermektedir (Sweeney 2011).

Mikobakteriler sindirim yolu ile alındıktan sonra jejunum lenfoid dokusunu ve özellikle ileumdaki peyer plaklarını kaplayan dome epitelyumunun M hücreleri tarafından endositoza uğrar. Kubbe bölgelerine bitişik az sayıda villus epitel hücresinin enfekte olduğuna dair bazı kanıtlar vardır, ancak diğer alanlarda enterositler etkilenmez. Bununla birlikte yapılan in vitro çalışmalar, bazı *M. avium* suşlarının insan enterosit hücre hattını enfekte edebildiğini göstermiştir (Clarke 1997). Intact ve degrade mikobakteriler, M hücreleri boyunca vakuollarda, Peyer plakları ve bitişik lamina propriada subepitelyal ve intraepitelyal bölgelerdeki makrofajlara nakledilir. (Clarke 1997; Manning ve Collins 2001; Sweeney 2011). Burada MAP, fagositoz yoluyla girdikleri makrofajlar tarafından temizlenir. Deneysel olarak buzağının ileumu içine direk inokülasyondan 5 saat sonra, submukozal makrofajlar içerisinde MAP etkeni tespit edilmiştir (Sweeney 2011).

Bakteriler makrofajlar tarafından alındıktan sonra Th1 ve Th2 ler farklı konak immun yanıtı aktive ederler. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infeksiyonunda *M. leprae*, *M. bovis* veya *M. tuberculosis* tarafından oluşturulan infeksiyonlardaki gibi immun yanıt modeli gözlemlenmektedir. Saptanabilen etkenlerle lenfositler tarafından ayrılan doku infiltrasyonu ile karakterize tüberküloid olarak ifade edilen ilk Th1 yanıtına yol açar. Th1 yanıtı ayrıca interleukin 2 (IL-2) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) ya ilave olarak, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* infeksiyonuna karşı en erken saptanabilen reaksiyonlardan biri olan sitokin gamma interferonun (IFN γ) üretimi ile karakterizedir. Bu sitokinlerin hücreiçi infeksiyonlardaki hücresel bağışıklık fonksiyonlarını düzenlediğine inanılmaktadır (Manning ve Collins 2001). Bazı sığırlar bu mekanizma ile MAP enfeksiyonunu atlatsa da çoğu hayvanda etken makrofajlar tarafından yok edilemez (Sweeney 2011). *M. avium* subsp. *paratuberculosis* infeksiyonunun erken, subklinik aşamasında, Th1 T hücresi aktivitesi baskın görünmektedir. Etken makrofaj ve mikroskobik granulomların içerisinde olduğu için infeksiyonun subklinik evresi aylar ve yıllarca sürebilir. Bu granulomları korumak, bakteriyel yayılımı kontrol etmek ve doku hasarını en aza indirmek için sürekli T hücre belleği ve yanıtı gereklidir (Manning ve Collins 2001).

MAP infeksiyonuna paradoksal bir konakçı immün yanıtı vardır. Erken evrelerde intradermal gecikmiş tip hipersensitivite (DTH), periferik kan lenfosit gama interferon yanıtı ve lenfositlerin proliferasyonu ile ortaya çıkan güçlü bir hücrel immün yanıt olmasına karşın, daha sonraki aşamalarda güçlü bir humoral immün, antikor aracılı yanıt vardır. Hücrel immün yanıt, birçok enfekte hayvanda, hastalığın klinik olarak gelişmiş bir formuna doğru ilerlemesini önlemek için yeterlidir (Over ve ark. 2011).

Hayvanlar infeksiyonunun lepramatöz veya Th2 evresine girerken, kilo kaybı, bazı türlerde ishal gibi *M. avium* subsp. *paratuberculosis* infeksiyonunun spesifik olmayan klinik belirtilerini göstermeye başlarlar. Bu geçişin sebebi bilinmemektedir. Th2 T hücreleri, humoral (antikor) bağışıklık yanıtını (IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-10) koordine eden sitokinlerin üretimini uyarır. Bu humoral yanıt koruyucu değildir ve *M. avium* subsp. *paratuberculosis* infeksiyonunu ve patolojisinin ilerlemesini durdurmaz. Yangı hücrelerinin infiltrasyonu, bağırsak duvarının fonksiyonunu yerine getiremeyecek kadar kalınlaşmasına, malabsorbsiyona ve protein kaybına neden olur. Aynı zamanda TNF- α 'nın yükselmesi de doku katabolizmasının uyarılması yoluyla aşırı zayıflamaya neden olur. Enfeksiyonunun bu aşamasında etken gastrointestinal sistemde ve böbrek, karaciğer, meme bezleri gibi diğer organlara yayılabilir, etken ve makrofaj infiltrasyonlarını içeren lezyonlar görülebilir. Klinik olarak etkilenmiş hastalığın bu evresindeki hayvanlar genellikle haftalar içinde enfeksiyona yenik düşer (Manning ve Collins 2001).

İmmün kontrolün zayıflamasıyla birlikte dışkı ile etken atılmaya başlar ve etken uterus, meme bezleri, diğer iç organlar ve kas dokularına yayılır. Bu dönemde hayvanlar hastalığın herhangi bir dış belirtisini göstermeyebilir ve çoğu durumda ELISA ile tespit edilebilen antikor gelişimi, dışkı ile saçılma başladıktan sonrasına kadar meydana gelmez (Sweeney 2011).

2.5. Klinik bulgular

M. avium subsp. *paratuberculosis* ile enfekte sığırlarda uzun süren inkübasyon periyodundan sonra genellikle aralıklı ve kronik ishal, kilo kaybı, düşük süt verimi ve artan morbidite görülür. İnkübasyon süresi 2-4 yıl arasındadır. Klinik belirtiler genellikle 2 yaşından büyük hayvanlarda görülür (Williams ve Spraker 1979; Wu ve ark. 2007).

Hastalık klinik belirtilerine, etkenin etrafa saçılmasına, laboratuvar tespit metodlarına göre incelendiğinde 4 ayrı döneme ayrılabilir.

Sessiz enfeksiyon dönemi:

İki yaşına kadar genç hayvanlardaki klinik belirtilerin görülmediği dönemdir. Bu dönemdeki enfekte hayvanları belirlemenin tek yolu barsaklardaki etkenin kültür ile tespit edilmesi veya barsak ve bölgesel lenf yumrularındaki granülomların histolojik tespiti ile olmaktadır. Johnin deri testi ve gama interferon testi kullanılsa da spesifitesi düşük testlerdir (Twari ve ark. 2006). Etkenin dışkı ile atılımı veya serum antikorları tespit edilemez. Lenfosit proliferasyonunu veya interferongamma üretimini ölçen in vitro testler gibi spesifik hücresel immünite ölçümleri pozitif sonuçlar verebilir, ancak bu testler klinik bir ortamda nadiren uygulanabilir. Enfeksiyonun bu aşamasında hayvanları tanımlamak için tek güvenilir yöntem, kültür veya polimeraz zincir reaksiyonu ile MAP tespiti için ileum veya mesenterik lenf yumurusu örnekleridir (Sweeney 2011).

Subklinik enfeksiyon dönemi:

M. avium subsp. *paratuberculosis* ile enfekte yetişkin hayvanlar bu dönemde hastalığın diyare veya diğer tipik belirtilerini göstermezler. Tespit edilebilir düzeyde antikor ve hücresel immün yanıt oluşur, mastitis ve infertiliteye yatkın olabilirler. Bu hayvanların çoğu fekal kültür yöntemi ile tespit edilemezler, ancak dışkı yolu ile etkeni etrafa saçarak hastalığın yayılmasına neden olurlar. Fekal kültür yöntemi ile enfekte hayvanların %15-%25 i belirlenerek sürüden ayrılabilir (Whitlock ve Buergelt 1996).

Klinik dönem:

Genellikle buzağılama sonrası oluşan, kronik ve aralıklı ishal görülür. Çoğu hayvanın fekal kültürü pozitifdir ve antikor titresinde artış vardır. Diyareye bağlı kilo kaybı, deride kuruma, kıllarda düzensizlik oluşur. Çoğu hayvanın fekal kültüründe test pozitif sonuç verir ve antikor titresi artar (Baumgartner ve Khol 2006).

İleri klinik dönem:

Hastalığın ilerleyen döneminde hayvanlarda halsizlik, aşırı zayıflama ve hipoproteinemiye bağlı intermandibular ödem şekillenir. Kaşeksi ve projektıl ishal (fışkırma tarzında) bu dönemde karakteristiktir. Ağırlık kaybı ve süt verimindeki azalmaya istinaden hayvanlar sürüden ayrılırlar. Subklinik dönemden ileri klinik döneme birkaç hafta içerisinde geçiş olabilir (Whitlock ve Buergelt 1996). Bu dönemde prognoz kötüdür ve hastalık hayvanın ölümü ile sona ermektedir. Paratüberküloz tedavisi için herhangi bir ilaç bulunmamaktadır (Baumgartner ve Khol 2006).

2.6. Tanı

Paratuberküloz tanısında karşılaşılan en büyük zorluk, subklinik vakaların tam olarak belirlenememesidir. Enfekte hayvanlar, enfeksiyondan sonra 3 ile 5 yıl boyunca hastalığın semptomlarını göstermeyebilir ve klinik belirtiler ortaya çıkıncaya kadarki süreçte etkeni etrafa saçarak bulaşmaya neden olabilirler. Ayrıca *M. avium* subsp. *paratuberculosis* 'in hücre içi ve yavaş üremesi nedeniyle tanı süreci zorlaşmaktadır. Hastalığın teşhisinde kullanılan testlerin sensitivitesinin düşük olması da bu nedenlere bağlıdır. İnfeksiyonun dört aşaması göz önünde bulundurulduğunda mevcut testler genellikle I. evre enfeksiyonunu ve II. evredeki subklinik enfekte hayvanların çoğunu tespit edemezler. Bu nedenle, daha spesifik ve sensitiv teşhis yöntemlerinin kombinasyonu ile teşhis konabilir (Whitlock ve Buergelt, 1996; Kumar ve ark. 2016).

2.6.1. Nekropsi

Sığırların otopsisinde lezyonlar enterit, yaygın granümatöz değişiklikler ile karakterizedir. Hastalıklı hayvanların yağ dokularında seröz atrofi, aşırı zayıflama, mandibula arası ödem, vücut boşluklarında seröz akıntı bulunabilir. Lezyonlar gastrointestinal sistem ile bölgesel lenf yumurlarında sınırlıdır. İleumun bağırsak mukozasında belirgin bir kalınlaşma, beyin görünümünde geniş ve enine kıvrımlar görülür. İleumdaki bu patognomik görünüm bağırsak gerildiği zaman kaybolmaz. (Baumgartner ve Khol, 2006).

2.6.2. Bakterioskopi

Dışkıdan hazırlanan preparatlarda Ziehl Neelsen boyama metodu ile yapılan mikroskopik incelemede, kümeler halinde asit fast bakterilerin görülmesi (Weber ve ark. 2009) ile hızlı bir sonuç alınmasına rağmen, bu yönetimin duyarlılık ve özgünlüğünün düşük olması nedeniyle şüpheli sonuçlar alınabilmektedir (Ris ve ark. 1988; Zimmer ve ark.1999).

2.6.3. Kültür

Mikobakteriyel izolatların mikobaktin bağımlılığı, koloni morfolojisi ve etkenin boyanma özellikleri gözönünde bulundurulduğunda, çoğu araştırmacı tarafından fekal kültürün özgünlüğünün yüksek olduğu düşünülmektedir (Buergelt ve ark. 1977; Chiodini ve ark. 1984; Socket ve ark. 1992a; 1992b; Whitlock ve ark. 2000). Dışkı kültürü canlı etkilenmiş hayvanlarda paratüberkülozun tanısı için altın standart test olarak kabul edilir

(OIE 2018). Ağır enfekte sığır sürülerinde, klinik belirti gösteren sığırların dışkılarıyla kontamine olan yem ve su ile etkeni alan hayvanlar, etkeni dışkıları ile saçabilirler. “Pass through” fenomeni olarak adlandırılan bu durumda, enfekte olmadan alınan etkenin 1-7 gün boyunca etrafa saçılması ile yanlış pozitif test sonuçları alınabilir (Sweeney ve ark. 1992; Whitlock ve ark. 2000; Nielsen ve Toft, 2008). Hastalıktan etkilenmiş, enfekte, infeksiyöz sığırlarda teşhis için fekal kültür yöntemi kullanılarak yapılan araştırmalarda yöntemin duyarlılığının %23-%74 arasında olduğu tespit edilmiştir (Billman-Jacobe ve ark. 1992; Sockett ve ark. 1992c; Egan ve ark. 1999; Whitlock ve ark. 2000; McKenna ve ark. 2005; Nielsen ve Toft, 2008).

Dışkı, doku gibi klinik örneklerden *M. avium* subsp. *paratuberculosis*’in izolasyonunda, bağırsak florasından kültür besiyerinin kontaminasyonunu engellemek için bir takım dekontaminasyon protokollerinin uygulanması gereklidir. Dekontaminasyon prosedürleri esnasında kullanılan antibiyotik ve dezenfektanlar, santrifüj ve sedimentasyon işlemleri, besi yeri inokulasyonunda alikotların uzaklaştırılması nedeni ile canlı organizmaların sayısı azaltılabilir. Bunun için laboratuvarlarda çeşitli teknikler kullanılmakta ve dekontaminasyon işlemi ile yanlış negatiflik arasındaki optimizasyonun sağlanması için çaba sarfedilmektedir. Bu amaçla uygulanan tüm protokoller klinik örneklerden izole edilen *M. avium* subsp. *paratuberculosis* sayısını azaltabilir (Reddaclif ve ark. 2003).

M. avium subsp. *paratuberculosis*’in izolasyonunda okzalik asit ve NaOH ile dekontaminasyon sağlanarak Löwenstein–Jensen (LJ) besiyerinin kullanıldığı metod ile hexadecylpyridinium chloride (HPC)’in dekontaminasyonda kullanıldığı, Herrolde’s Egg Yolk Medium (HEYM) ve Middlebrook 7H10 gibi katı besiyerleri ile Middlebrook 7H9 gibi sıvı besiyerlerinin kullanıldığı iki temel metod vardır. Etkenin izolasyonunda sıvı besiyerlerinin katı besi yerlerine göre daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir (OIE,2018).

M. avium subsp. *paratuberculosis*’in dışkı veya dokudan kültür ve izolasyonu, kesin tespit metodu olsa da dokulardaki düşük kolonileşme seviyesi, dışkıda az miktarda veya sürekli etken atılımının olmaması, hastalığın teşhisinde yanlış negatif sonuçlara neden olabilir. Ayrıca 8-16 haftalık inkübasyon periyodu da teşhisin uzun sürede konmasına neden olmaktadır (Huntley ve ark.2005).

2.6.4. PCR

Genomunda 15- 20 kopya ile 1.451 baz çiftine sahip olan IS900 insersiyon sekansın karakterizasyonu, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği ile minimum miktarda MAP DNA'sının spesifik tanımlanmasını sağlamaktadır. F57, ISMav2, ISMAPO2, ISMAPO4 ve IS1311 dahil diğer 58 insersiyon elementlerinin *M. avium* subsp. *paratuberculosis* genomunda değişken sayıda kopya olarak tanımlanmıştır (Gilardoni ve ark. 2012)

PCR, kolostrum, süt, dışkı ve ileosekal valf, ileum, jejunum dokuları, jejunal veya ileosekal lenf yumrularından alınan örneklerde spesifik DNA sekanslarının tespiti için güçlü bir yöntemdir (Buergelt ve Williams, 2004, Gilardoni ve ark. 2012). Ancak numunelerdeki bazı bileşenlerin Taq polimeraz üzerindeki inhibitör etkileri nedeniyle yanlış negatif sonuçlara neden olabileceği gözönünde bulundurulmalıdır (Tiwari ve ark. 2006, Gilardoni ve ark. 2012). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* çeşitli dokulardan bulunmaktadır, ancak tanı için mezenterik ve ileosekal lenf yumruları, ileum ve karaciğer önerilir ki bu sayede dışkıda bulunan inhibitörlerden kaçınıldığı bildirilmiştir (Wells ve ark. 2009; Collins, 2019).

2.6.5. Seroloji

2.6.5.1. ELISA

Serum ELISA genellikle sürü düzeyinde hastalığın teşhisinde, düşük maliyetli ve kolay otomasyon açısından en yaygın kullanılan tekniktir (Garcia ve ark. 2008; Dieguez ve ark. 2009). Ancak, çeşitli nedenlerden dolayı, ELISA sonuçlarının dikkatli yorumlanması gerekir. Enfeksiyon ile inkübasyon süresi ve immun yanıtın oluşması esnasındaki gecikme nedeniyle, subklinik enfekte sığırların belirlenmesi için serum ELISA duyarlılığı, fekal kültür duyarlılığından daha düşük olup, yanlış negatif sonuçlara yol açmaktadır. Birçok çalışmada serum ELISA'sının duyarlılığının, seropozitif olan fekal atılımın oranına dayanarak %15-75 arasında olduğu değerlendirilmiştir (Tiwari ve ark. 2006).

2.6.5.2. Komplement Fiksasyon Test (CFT)

CFT uzun yıllardır sığırlar için kullanılan standart testtir. Bu test klinik olarak şüpheli hayvanlarda iyi çalışır, ancak genel popülasyonda kontrol amacıyla kullanılmak

için yeterli bir özgünlüğü yoktur. Bununla birlikte, sığır ithal eden ülkeler tarafından sıklıkla talep edilmektedir (OIE 2018).

2.6.5.3. Agar Jel İmmundifüzyon Test (AGID)

AGID'in temeli enfekte hayvanların antikorları ile MAP'in protoplazmik ekstraktından çözülebilir antijen tarafından oluşturulan immün kompleksin, agar jel matrisinde çökeltmesidir. Basit, hızlı ve nispeten ucuz bir yöntemdir, ancak paratüberkülozun erken evrelerinde düşük duyarlılığa sahiptir ve ileri klinik evrelerde hayvanlarda iyi bir tanı yöntemi olarak kabul edilir. Şüpheli vakaların hızlı bir doğrulayıcı testi olarak kullanılabilir. İleri klinik paratüberküloziste duyarlılık iyi (% 90-95), subklinik evrelerde ise düşüktür (% 18,9-30) (Ayele ve ark. 2001; Gilardoni ve ark. 2012).

2.6.6. Hücresel Bağışıklık Testleri

Intradermal test, lenfosit transformasyon test, migrasyon inhibisyon test, interferon gamma (IFN- γ) test gibi hücresel bağışıklık testleri vardır (Kumar ve ark. 2016).

2.6.6.1. İntradermal test

Mikobakteriyel enfeksiyonlara karşı ilk ve en güçlü konakçı cevabı hücresel immün yanıtıdır ve hücresel immün (CMI) yanıt testleri, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* enfeksiyonlarının erken teşhisi için kullanılabilir. Mikobakteriyel antijenlere karşı gecikmiş aşırı duyarlılık tipini ölçen intradermal deri testi, mikobakteriyel enfeksiyonlar için iyi bilinen bir CMI testidir. Mikobakteriyel antijen preparasyonu PPD derialtı uygulanmadan önce ve uygulamadan 72 saat sonra deri kalınlığı ölçülerek değerlendirme yapılır. 2 mm ve daha fazla kalınlık artışı pozitif olarak değerlendirilir. (Kalis ve ark. 2003). Kumar ve arkadaşlarına (2016) göre testin özgünlüğü %54, duyarlılığı yaklaşık %79 olarak bildirilmiştir.

2.6.6.2. Interferon Gamma (IFN- γ) Assay

IFN- γ testi in vitro koşullarda yapılması dışında intradermal teste benzer. IFN- γ antijenlere maruz kaldıktan sonra lenfositler tarafından salınır (Kumar ve ark. 2016). PPD ile uyarılan T lenfositler tarafından sitokin IFN- γ spesifik üretimi ölçülür. IFN- γ 'nın kantitatif tespiti, 1 ila 2 yaş arası hayvanlarda kullanılabilir. Subklinik evrede bulunan hayvanlarda bu testin duyarlılığı serolojik testlerden daha yüksektir, ancak mutlak anlamda düşüktür (% 41). Tüberküloz ve paratüberküloz miks enfeksiyonlu sürülerde

testin duyarlılığı yaklaşık % 20'ye kadar düşebilir. Bu farklılıklar konakçı türlere veya her sürüde mevcut olan suşlara bağlı olabilir (Gilardoni ve ark. 2012).

2.7. Tedavi

Hastalığın tedavisi için onaylı ilaç bulunmamaktadır. Ancak nadir olarak antimikrobiyal ajanların etiket dışı kullanımıyla antibiyotik kullanımı denenmektedir. Paratüberküloz tedavisi pahalı ve faydasız olduğundan, sadece damızlık olarak kullanılan çok değerli hayvanların ömrünü uzatmak için uygulanır. Johne hastalığı için en yaygın kullanılan tedavi yöntemleri, clofazimine veya isoniazid ve rifabutin veya ethambutoldür. Bunu hayvanın ömrü boyunca günde bir isoniazid dozu takip eder. Her ne kadar sığırlarda *M. tuberculosis* ve *M. bovis* enfeksiyonlarının tedavisi için isoniazid reçetelense de hem *M. avium* subsp. *paratuberculosis* hem de *M. avium*, in vitro olarak isoniazid'e dirençlidir ve bu nedenle in vivo olarak etkili olmayabilir. *M. avium* subsp. *Paratuberculosis* in vitro olarak D-sikloserin, etambutol, amikasin, klaritromisin, rifabutine duyarlıdır (Harris ve Barletta, 2001).

2.8. Korunma ve Kontrol

Paratüberkülozun kontrolü klinik belirtiler göstermeyen enfekte hayvanların tespit edilmesinin zor olması nedeniyle oldukça zordur (Dieguez ve ark. 2009).

Paratüberküloz kontrol programlarının temelinde etkeni dışkısı ile saçı hayvanların sürüden uzaklaştırılması ve sığır buzağı bulaşmasının önlenerek hijyenik önlemlerin alınması vardır (Kalis ve ark. 2003). Genel olarak çoğu buzağının yaşamlarının erken döneminde MAP ile enfekte olduğu kabul edilir. Bu nedenle, kontrol programları temel olarak yetişkin sığırlardan çiftlikte yetiştirilen genç hayvanlara doğrudan veya dolaylı MAP geçişinin önlenmesine dayanmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde aşılama uygulamaları sınırlı seviyede olup, aşılama ile klinik hastalık insidansını azaltabilir ve deneysel çalışmalarda etkenin bağırsak dokularında kolonileşmesinin azaltılmasına yardımcı olabildiği bildirilmiştir (Fecteau ve Whitlock, 2011). Amerika Birleşik Devletlerinde sınırlı kullanım için onaylanmış yalnızca bir aşı (Mycopar®, Boehringer Ingelheim) vardır (Patton, 2011; Setless ve ark.,2014). Bu aşı hücrel immunitiyi uyarmasına rağmen, aşılanmış hayvanlardan etkenin sınırlı miktarda atılması ile hastalığın diğer hayvanlara yayılması devam eder (Setless ve ark.,2014). Ancak aşılar enfeksiyondan tamamen korunma sağlamaz ve hayvanlar dışkıları ile MAP saçmaya devam edebilir. Aşılama ile enfeksiyondan korunmayacağı genel olarak kabul

edilmektedir. Aşılamanın temel faydaları, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*'in fekal saçılımının azalması ve sürülerde hastalık insidansının azaldığını gösteren kanıtlarla, enfekte hayvanlarda klinik bulguların azalmasıdır (Chiodini ve ark. 1984; Harlis ve Barletta, 2001; Stabel ve ark.,2011; Fecteau ve Whitlock, 2011).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örnekler

Trakya yöresinde hayvancılığın yoğun olduğu yerlerdeki mezbahalar tespit edilip örnek toplamak için izinler alındıktan sonra İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi hayvan kesim yerinde ileal lenf yumurularının yeri belirlenerek ilk örnek alınmıştır. Tekirdağ Süleymanpaşa, Malkara, Hayrabolu ilçelerinde faaliyet gösteren mezbahalar ile Edirne Merkez ve Keşan ilçesinde faaliyet gösteren mezbahalara Temmuz 2017 ve Ağustos 2017 tarihlerinde gidilerek örnekler toplanmıştır. Bu yörede yetiştirilen sığırların kültür ırkı olması ve erkek hayvanların 12-18 ay arasında kesime sevk edilmesi, dişi hayvanların damızlık olarak kullanılması, dişi hayvan kesiminin Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından şarta tabi olması nedeniyle 2 yaşını geçmiş hayvan kesiminin az olduğu görülmüştür. Tesadüfi örnekleme yolu ile seçilen hayvanlardan steril bistüri ile alınan lenf yumuruları, steril numune poşetlerine konarak soğuk zincirde İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına getirildi. Örneklerin alındığı hayvanların yaş, ırk, cinsiyet, kesim yeri, kesime sevk edildiği yer, kilo ve ishal durumu Tablo 3-1’de verilmiştir.

Tablo 3-1: Örneklerin alındığı hayvanların yaş, cinsiyet, ırk, kesime sevk edildiği yer, ağırlık, ishal varlığı, kesim yeri bilgileri

No	Yaş	Cinsiyet	İrk	Geldiği Yer	Kilo	Durumu-İshal E/H	Mezbaha
1	4	D	Hol SA	İÜ Vet Fak. Avcılar-İstanbul	310	H	Veteriner Fakültesi
2	2	E	Hol SA	Sağlamtaş-Malkara-Tekirdağ	375	H	Malkara
3	2	E	Hol SA	Balabancık-Malkara-Tekirdağ	290	H	Malkara
4	5	D	Hol SA	Izgar-Malkara-Tekirdağ	248	H	Malkara
5	5	D	Hol SA	Izgar-Malkara-Tekirdağ	230	H	Malkara
6	7	D	Hol SA	Haliç-Malkara-Tekirdağ	225	H	Malkara
7	4	D	Hol SA	Haliç-Malkara-Tekirdağ	267	H	Malkara

8	3	D	Hol SA	Ferhadanlı-Süleymanpaşa-Tekirdağ	232	H	Süleymanpaşa
9	6	D	Hol SA	Karadeniz-Süleymanpaşa-Tekirdağ	165	H	Süleymanpaşa
10	6	D	Hol SA	Yağcı-Süleymanpaşa-Tekirdağ	209	H	Süleymanpaşa
11	5	D	Hol SA	Osmanlı-Süleymanpaşa-Tekirdağ	199	H	Süleymanpaşa
12	5	D	Hol SA	İncelik-Süleymanpaşa-Tekirdağ	282	H	Süleymanpaşa
13	4	D	Hol SA	Müsellim-Lüleburgaz-Kırklareli	249	H/Kondiyon u kötü	Süleymanpaşa
14	2	E	Hol SA	Çınarlıdere-Malkara-Tekirdağ	390	H	Süleymanpaşa
15	2	D	Hol SA	Çınarlıdere-Malkara-Tekirdağ	305	H	Süleymanpaşa
16	2	E	Hol SA	Nusratlı-Süleymanpaşa-Tekirdağ	243	H	Süleymanpaşa
17	2	E	Hol SA	Işılar-Süleymanpaşa-Tekirdağ	311	H	Süleymanpaşa
18	2	D	Hol SA	Tayakadın Mah-Merkez-Edirne	211	H	Süleymanpaşa
19	2	D	Montofon Melezi	Türkmen Mah-Keşan-Edirne	202	H	Süleymanpaşa
20	7	D	Hol SA	Balabancık-Malkara-Tekirdağ	195	H	Malkara
21	2	D	Hol SA	Ahievren-Malkara-Tekirdağ	232	H	Malkara
22	2	D	Hol SA	Ahievren-Malkara-Tekirdağ	273	H	Malkara
23	3	D	Hol SA	Ahievren-Malkara-Tekirdağ	301	H	Malkara
24	3	D	Hol SA	Sağlamta-Malkara-Tekirdağ ş	210	H	Malkara
25	2	D	Hol SA	Ballısüle-Malkara-Tekirdağ	196	H	Malkara

26	6	D	Hol SA	Sarıpolat-Malkara-Tekirdağ	232	H	Malkara
27	6	D	Hol SA	Kürtüllü-Malkara-Tekirdağ	346	H	Malkara
28	6	D	Hol SA	Sarnıç-Malkara-Tekirdağ	222	H	Malkara
29	7	D	Hol SA	Yörücek-Malkara-Tekirdağ	244	H	Malkara
30	2	E	Hol SA	Balabancık-Malkara-Tekirdağ k	291	H	Malkara
31	5	D	Hol SA	Balabancık-Malkara-Tekirdağ k	255	H	Malkara
32	8	D	Hol SA	Büyükdoğanca-Keşan-Edirne	327	H	Keşan
33	7	D	Montofon	Aliçopehlivan-İpsala-Edirne	174	H/Lenflerde Büyüme	Keşan
34	8	D	Hol SA	Aliçopehlivan-İpsala-Edirne	164	H	Keşan
35	4	D	Hol SA	Esetçe-İpsala-Edirne	210	H	Keşan
36	8	D	Hol SA	Maltepe-Keşan-Edirne	268	H	Keşan
37	7	D	Hol SA	Altıntaş-Keşan-Edirne	221	H	Keşan
38	7	D	Hol SA	Hacıköy-İpsala-Edirne	202	H	Keşan
39	2	D	Hol SA	K.Altıagaç Mah-Meriç-Edirne	210	H	Süleymanpaşa
40	5	D	Hol SA	Çayırılı-Merkez-Kırklareli	245	H	Hayrabolu
41	4	D	Hol SA	Hacısungur-Malkara-Tekirdağ	255	H	Hayrabolu
42	8	D	Hol SA	Çıkrıkçı-Hayrabolu-Tekirdağ	235	H	Hayrabolu
43	6	D	Hol SA	Habiller-Havsa-Edirne	217	H	Hayrabolu
44	8	D	Hol SA	Taptık-Havsa-Edirne	338	H	Hayrabolu
45	4	D	Hol SA	Düğünçübaşı-Lüleburgaz-Kırklareli	258	H	Hayrabolu
46	4	D	Hol SA	Çıkrıkçı-Hayrabolu-Tekirdağ	215	H	Hayrabolu

47	6	D	Hol SA	Tatarlı-Hayrabolu-Tekirdağ	223	H	Hayrabolu
48	7	D	Hol SA	Tatarlı-Hayrabolu-Tekirdağ	202	H	Hayrabolu
49	6	D	Hol SA	Tatarlı-Hayrabolu-Tekirdağ	230	H	Hayrabolu
50	8	D	Hol SA	Elbasan-Çatalca-İstanbul	241	H	Hayrabolu
51	6	D	Hol SA	Haznedar-Babaeski-Kırklareli	236	H	Hayrabolu
52	5	D	Hol SA	Tatarlı-Hayrabolu-Tekirdağ	204	H	Hayrabolu
53	2	D	Hol SA	Tatarlı-Hayrabolu-Tekirdağ	243	H	Hayrabolu
54	5	D	Hol SA	Söğütlüdere-Havsa-Edirne	289	H	Hayrabolu
55	4	D	Hol SA	Değirmencik-Merkez-Kırklareli	417	H/Septisemi	Hayrabolu
56	5	D	Hol SA	Değirmencik-Merkez-Kırklareli	192	H	Hayrabolu
57	5	D	Hol SA	Değirmencik-Merkez-Kırklareli	200	H	Hayrabolu
58	3	D	Hol SA	Değirmencik-Merkez-Kırklareli	266	H	Hayrabolu
59	6	D	Hol SA	Karadeniz Mah-Süleymanpaşa-Tekirdağ	238	H/Septisemi	Hayrabolu
60	4	D	Hol SA	Değirmencik-Merkez-Kırklareli	279	H	Hayrabolu
61	5	D	Hol SA	Değirmencik-Merkez-Kırklareli	220	H	Hayrabolu
62	7	D	Hol SA	Çıkrıkçı-Hayrabolu-Tekirdağ	282	H/Kondüyo nu Kötü	Hayrabolu
63	6	D	Hol SA	Çıkrıkçı-Hayrabolu-Tekirdağ	275	H/Lenflerde Büyüme	Hayrabolu
64	6	D	Hol SA	Çıkrıkçı-Hayrabolu-Tekirdağ	272	H/Septisemi	Hayrabolu

65	4	D	Hol SA	Bahramşah-Hayrabolu-Tekirdağ	295	H	Hayrabolu
66	6	D	Hol SA	Çıkırkçı-Hayrabolu-Tekirdağ	222	H	Hayrabolu
67	8	D	Hol SA	Araphacı-Süleymanpaşa-Tekirdağ	202	H	Süleymanpaşa
68	2	D	Simental	Çeşmeli-M.Ereğilisi-Tekirdağ	222	H	Süleymanpaşa
69	5	D	Simental	Çeşmeli-M.Ereğilisi-Tekirdağ	277	H	Süleymanpaşa
70	3	D	Hol SA	Dedecik-Süleymanpaşa-Tekirdağ	187	H	Süleymanpaşa
71	5	D	Hol SA	Müsellim-Lüleburgaz-Kırklareli	201	H/Kaşektik	Süleymanpaşa
72	5	D	Hol SA	Kırıkköy-Lüleburgaz-Kırklareli	266	H/Kondisyonu Kötü	Süleymanpaşa
73	8	D	Hol SA	Kaşıkcı-Süleymanpaşa-Tekirdağ	192	E/Kaşektik	Süleymanpaşa
74	2	D	Hol SA	Yağcı-Süleymanpaşa-Tekirdağ	171	H	Süleymanpaşa
75	4	D	Hol SA	Yenice-Süleymanpaşa-Tekirdağ	201	H	Süleymanpaşa
76	3	D	Hol SA	Osmanlı-Süleymanpaşa-Tekirdağ	333	H	Süleymanpaşa
77	5	D	Hol SA Melezi	Karadeniz-Süleymanpaşa-Tekirdağ	279	H	Süleymanpaşa
78	3	D	Hol SA	Karapınar-uzunköprü-Edirne	322	H	Hayrabolu
79	13	D	Hol SA	Büyükgerdelli-Süloğlu-Edirne	289	H	Hayrabolu
80	3	D	Simental	Kocahıdır-İpsala-Edirne	345	H	Hayrabolu
81	8	D	Hol SA	Veliköy-Çerkezköy-Tekirdağ	279	H	Hayrabolu
82	7	D	Hol SA	Kemalköy-Merkez-Edirne	203	H	Hayrabolu
83	10	D	Hol SA	Taplık-Havsa-Edirne	207	H	Hayrabolu

84	10	D	Hol SA	Seydiköy- Keşan-Edirne	253	H	Hayrabolu
85	10	D	Hol SA	Büyükgerdelli- Süloğlu-Edirne	311	H	Hayrabolu
86	7	D	Hol SA	Harmanlı- Uzunköprü- Edirne	246	H	Hayrabolu
87	10	D	Hol SA	Haznedar- Babaeski- Kırklareli	230	H	Hayrabolu
88	7	D	Montofon	Dombay- Lalapaşa-Edirne	205	H	Hayrabolu
89	8	D	Hol SA	Haznedar- Babaeski- Kırklareli	303	H	Hayrabolu
90	10	D	Hol SA	Abalar-Havsa- Edirne	335	H	Hayrabolu
91	9	D	Hol SA	Oğulpaşa- Havsa-Edirne	212	H	Hayrabolu
92	7	D	Hol SA	Oğulpaşa- Havsa-Edirne	303	H	Hayrabolu
93	8	D	Hol SA	Ürünlü-Merkez- Kırklareli	199	H	Hayrabolu
94	4	D	Hol SA	Yolageldi- Havsa-Edirne	222	H	Hayrabolu
95	11	E	Hol SA	Merkez- Edirne	244	H	Hayrabolu
96	9	D	Hol SA	Değirmencik- Merkez- Kırklareli	260	H	Hayrabolu
97	5	D	Hol SA	Bayramşah- Hayrabolu- Tekirdağ	195	H	Hayrabolu
98	6	D	Hol SA	Değirmencik- Merkez- Kırklareli	228	H	Hayrabolu
99	10	D	Hol SA	Kuleli- Babaeski- Kırklareli	212	H	Hayrabolu
100	7	D	Hol SA	Değirmencik- Merkez- Kırklareli	245	H	Hayrabolu
101	4	D	Hol SA	Değirmencik- Merkez- Kırklareli	249	H	Hayrabolu
102	5	D	Hol SA	Kermeyan- Malkara- Tekirdağ	228	H	Malkara
103	5	D	Hol SA	Bağpınarı- Malkara- Tekirdağ	336	H/Kondisyo nu Kötü	Malkara

104	5	D	Hol SA	Bağpınarı-Malkara-Tekirdağ	274	H	Malkara
105	11	D	Hol SA	Develi-Malkara-Tekirdağ	161	H/Kondisyonu Kötü	Malkara
106	8	D	Hol SA	Aliçopehlivan-İpsala-Edirne	245	H	Keşan
107	5	D	Hol SA	Dişbudak-Keşan-Edirne	249	H	Keşan
108	2	E	Montofon	İzzetiye-Keşan-Edirne	317	H	Keşan
109	2	D	Hol SA	Yenimuhacir-Keşan-Edirne	215	H	Keşan
110	9	D	Hol SA	Yenimuhacir-Keşan-Edirne	255	H/Kondisyonu Kötü	Keşan
111	8	D	Hol SA	Yenimuhacir-Keşan-Edirne	255	H	Keşan
112	3	D	Simental Melezi	Beğendik-Keşan-Edirne	214	H	Keşan
113	3	D	Hol SA	Sarpdere-İpsala-Edirne	213	H/Karaciğer de Parazit	Keşan
114	2	D	Hol SA	Subaşı-Hayrabolu-Tekirdağ	230	H/Kondisyonu Kötü	Hayrabolu
115	13	D	Hol SA	Bostanlı-Havsa-Edirne	281	H	Hayrabolu
116	8	D	Hol SA	Oğulpaşa-Havsa-Edirne	172	H	Hayrabolu
117	7	D	Hol SA	Yenicegörece-Meriç-Edirne	286	H	Hayrabolu
118	10	D	Hol SA	Şehitler-Enez-Edirne	170	H	Hayrabolu
119	3	E	Hol SA	Küçükkarıştıran-Lüleburgaz-Kırklareli	214	H/Lenflerde Büyüme	Hayrabolu
120	8	D	Hol SA	Bostanlı-Havsa-Edirne	360	H	Hayrabolu
121	5	D	Hol SA	Kızılıkdere-Merkez-Kırklareli	248	H	Hayrabolu
122	4	D	Hol SA	Türkobaşı-Uzunköprü-Edirne	224	H	Hayrabolu
123	6	D	Hol SA	Serem-Meriç-Edirne	304	H	Hayrabolu
124	16	D	Hol SA	Bostanlı-Havsa-Edirne	223	H	Hayrabolu
125	4	D	Hol SA	Kızılıkdere-Merkez-Kırklareli	273	H/Lenflerde Büyüme	Hayrabolu

126	4	D	Hol SA	Kızılcıkdere-Merkez-Kırklareli	276	H/lenflerde Büyüme	Hayrabolu
127	9	D	Hol SA	Oruçlu-Babaeski-Kırklareli	240	H	Hayrabolu
128	5	D	Hol SA	Sofuhalil-Babaeski-Kırklareli	216	H	Hayrabolu
129	2	D	Simental Melezi	Abalar-Havsa-Edirne	218	H	Hayrabolu
130	4	D	Hol SA	Süleymaniye-Uzunköprü-Edirne	177	H	Hayrabolu
131	2	D	Hol SA	Soylu-Hayrabolu-Tekirdağ	276	H	Hayrabolu
132	4	D	Hol SA	Üsküp Cevatpaşa-Merkez-Kırklareli	215	H	Hayrabolu
133	11	D	Hol SA	Naipyusuf-Havsa-Edirne	190	H	Hayrabolu
134	7	D	Montofon Melezi	Naipyusuf-Havsa-Edirne	240	H	Hayrabolu
135	7	D	Simental Melezi	Naipyusuf-Havsa-Edirne	376	H	Hayrabolu
136	7	D	Simental Melezi	Naipyusuf-Havsa-Edirne	214	H	Hayrabolu
137	5	D	Hol SA	Çerkezmüşellim-Hayrabolu-Tekirdağ	262	H	Hayrabolu
138	4	D	Hol SA	Karahalil Fevziçakmak-Babaeski-Kırklareli	207	H	Hayrabolu
139	4	D	Hol SA	Hacıumur-Merkez-Edirne	265	H	Hayrabolu
140	7	D	Hol SA	Elçili-Merkez-Edirne	264	H	Hayrabolu
141	3	D	Hol SA	Merkez- Edirne	235	H	Hayrabolu
142	7	D	Hol SA	Çömlekakpınar-Lalapaşa-Edirne	286	H	Hayrabolu
143	7	D	Hol SA	Abalar-Havsa-Edirne	235	H	Hayrabolu
144	7	D	Montofon	Merkez-Süloğlu-Edirne	314	H	Hayrabolu
145	7	D	Hol SA	Elçili-Merkez-Edirne	256	H	Hayrabolu
146	6	D	Hol SA	Tatarlar-Süloğlu-Edirne	230	H/Lenflerde Büyüme	Hayrabolu

147	11	D	Hol SA	Merkez-Süloğlu-Edirne	301	H	Hayrabolu
148	4	D	Hol SA	Paşayığit-Keşan-Edirne	272	H	Hayrabolu
149	4	D	Hol SA	Dokuzhöyük-Merkez-Kırklareli	203	H/Bağırsaklar Hemorajik	Hayrabolu
150	4	D	Hol SA	Müsellim-Babaeski-Kırklareli	218	H	Hayrabolu
151	7	D	Hol SA	Çömlekakpınar-Lalapaşa-Edirne	210	H/Lenflrde Büyüme	Hayrabolu
152	4	D	Hol SA	Üyükütatar-Merkez-Edirne	214	H	Hayrabolu
153	3	D	Hol SA	Yolageldi-Havsa-Edirne	244	H	Hayrabolu
154	7	D	Hol SA	Doğanca-Pehlivanköy-Kırklareli	234	H	Hayrabolu
155	5	D	Hol SA	Oğulpaşa-Havsa-Edirne	221	H	Hayrabolu
156	6	D	Hol SA	Oğulpaşa-Havsa-Edirne	190	H	Hayrabolu
157	9	D	Hol SA	Değirmencik-Merkez-Kırklareli	257	H/Kondisyonu Kötü	Hayrabolu
158	3	D	Hol SA	Övenler-Hayrabolu-Tekirdağ	194	H/Bağırsaklar Hemorajik	Hayrabolu
159	4	D	Hol SA	KarahalilFevziçakmak-Babaeski-Kırklareli	204	H/Lenflrde Büyüme	Hayrabolu
160	3	D	Hol SA	Taptık-Havsa-Edirne	253	H/Kondisyonu Kötü	Edirne
161	3	D	Montofon	Merkez-Kırklareli	396	H	Edirne
162	3	D	Simental	Demirhalı-Merkez-Edirne	386	H	Edirne
163	2	D	Montofon	Merkez-Edirne	323	H	Edirne
164	4	D	Hol SA	Demirhalı-Merkez-Edirne	303	H	Edirne
165	3	D	Hol SA	Demirhalı-Merkez-Edirne	329	H	Edirne
166	4	D	Hol SA	Merkez-Keşan-Edirne	364	H	Edirne
167	4	D	Hol SA	Kadıköy-Keşan-Edirne	342	H	Edirne
168	3	D	Hol SA	Koyunbaba-Merkez-Kırklareli	179	H	Hayrabolu

169	4	D	Hol SA	Çayırılı-Merkez-Kırklareli	354	H	Edirne
170	3	D	Hol SA	Yıldırımbeyazıt-Merkez-Edirne	347	H/Bağırsaklar Hemorajik	Edirne
171	8	D	Hol SA	Hacısarraf-Merkez-Edirne	185	H/Kaşektik,	Edirne
172	4	D	Hol SA	Musulça-Havsa-Edirne	280	H	Edirne
173	6	D	Hol SA	Osmanlı-Süleymanpaşa-Tekirdağ	217	H/Kaşektik,	Süleymanpaşa
174	3	D	Hol SA	Çiftlikönü Mah-Süleymanpaşa-Tekirdağ	243	H	Süleymanpaşa
175	9	D	Hol SA	Yukarıkılıçlı-Süleymanpaşa-Tekirdağ	220	H	Süleymanpaşa
176	13	D	Hol SA	İsmailli-Hayrabolu-Tekirdağ	283	H	Süleymanpaşa
177	7	D	Hol SA	İsmailli-Hayrabolu-Tekirdağ	245	H	Süleymanpaşa
178	6	D	Hol SA	İsmailli-Hayrabolu-Tekirdağ	188	H	Süleymanpaşa
179	3	D	Hol SA	Emiryakup-Hayrabolu-Tekirdağ	187	H	Süleymanpaşa
180	2	D	Hol SA	Karadeniz Mah-Süleymanpaşa-Tekirdağ	227	H	Süleymanpaşa
181	3	D	Hol SA	Zafer Mah-Süleymanpaşa-Tekirdağ	190	H	Süleymanpaşa
182	3	E	Hol SA	Zafer Mah-Süleymanpaşa-Tekirdağ	210	H	Süleymanpaşa
183	3	E	Hol SA	Zafer Mah-Süleymanpaşa-Tekirdağ	227	H	Süleymanpaşa
184	3	E	Hol SA	Zafer Mah-Süleymanpaşa-Tekirdağ	169	H	Süleymanpaşa
185	3	E	Hol SA	Zafer Mah-Süleymanpaşa-Tekirdağ	168	H	Süleymanpaşa
186	2	D	Hol SA	Gazioğlu-Süleymanpaşa-Tekirdağ	321	H	Süleymanpaşa

187	2	D	Hol SA	Gazioğlu-Süleymanpaşa-Tekirdağ	184	H	Süleymanpaşa
188	5	D	Hol SA	Naip-Süleymanpaşa-Tekirdağ	181	H/Tüberkülin Pozitif Şartlı Kesim	Süleymanpaşa
189	3	D	Hol SA	Ferhadanlı-Süleymanpaşa-Tekirdağ	185	H	Süleymanpaşa
190	8	D	Hol SA	Zafer Mah-Süleymanpaşa-Tekirdağ	262	H	Süleymanpaşa
191	2	D	Hol SA	Karamehmet-Ergene-Tekirdağ	144	H/Tüberkülin Pozitif Şartlı Kesim	Süleymanpaşa
192	6	D	Hol SA	Çıkrıkçı-Hayrabolu-Tekirdağ	220	H/Lenflerde Büyüme	Hayrabolu
193	13	D	Hol SA	Tahal-Havsa-Edirne	270	H/Bağırsaklar Hemorajik	Hayrabolu
194	4	D	Hol SA	Davuteli-Malkara-Tekirdağ	287	H/Lenflerde Büyüme	Hayrabolu
195	2	D	Hol SA	Beyazköy-Saray-Tekirdağ	262	H/Kondisyonu Kötü	Hayrabolu
196	7	D	Hol SA	Aydınevler-Hayrabolu-Tekirdağ	250	H/Kondisyonu Kötü	Hayrabolu
197	5	D	Hol SA	Elbasan-Çatalca-İstanbul	235	H	Hayrabolu
198	16	D	Hol SA	Haznedar-Babaeski-Kırklareli	253	H	Hayrabolu
199	6	D	Hol SA	Emirali-Lüleburgaz-Kırklareli	185	H	Hayrabolu
200	11	D	Hol SA	Ağayeri-Babaeski-Kırklareli	252	H	Hayrabolu

Hol SA: Holştayn siyah alaca, D:Dişi, E:Erkek, H:Hayır

3.1.2. Real-time PCR

İleal lenf yumrularından DNA ekstraksiyonu ve *M. avium* subsp. *paratuberculosis*'e spesifik gen bölgelerinin tespiti için kullanıldı.

3.1.2.1. Ekstraksiyon kiti

PCR aşaması için lenf yumrularından saf DNA elde edilmesi amacıyla Vivantis GF-1 Tissue DNA Extraction kiti kullanıldı.

Ekstraksiyon kit içeriği:

- Filtreli tüpler (GF-1 kolon)
- Toplama tüpleri
- Doku lizis tampon çözeltisi (Buffer TL)
- Lysis enhancer
- Doku genomik DNA bağlanma çözeltisi (Buffer TB)
- Konsantre yıkama tamponu (Wash Buffer)
- Elüsyon tampon çözeltisi (Elution Buffer)
- Proteinaz K

3.1.2.2. Amplifikasyon

Amplifikasyon için IDEXX RealPCR MAP DNA Test kiti kullanıldı.

PCR kit içeriği:

- RealPCR Map DNA Mix (MAP DNA Mix) (MAP DNA'sını tespit için primerler ve prob içerir)
- RealPCR DNA Master Mix (DNA MMx) (Hot-start polimeraz, ROX ve nükleotidleri içerir)
- RealPCR Positive Control (PC) (MAP pozitif kontrol)
- RealPCR PCR Grade Water (PCR için saf su, ayrıca PCR negatif kontrol için)

Thermocycler:

Roche LightCycler 480 Real-time PCR cihazı

3.1.2.3. Diğer gereçler

- Benmari (Biosan)

- Ethanol (%96)
- Isıtıcı blok (Labnet Accublock)
- Mikrosantrifüj (Denville 260D)
- Mikrosantrifüj tüpleri (Dnase/Rnase free 1,5ml)
- Pudrasız eldiven
- Sınıf II kabinet (Heal Force)
- Spektrofotometre (Nanodrop 1000, Thermo Scientific)
- Steril bistüri
- Steril petri kutusu
- Terazi (Radwag AS 220/C/2)
- Vorteks mikser (Velp)
- 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl filtreli pipet ucu
- 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl otomatik pipet
- 96 kuyucuklu PCR plate ve optik kaplayıcı film

3.2. Yöntem

3.2.1. Real time PCR

3.2.1.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu Vivantis GF-1 Tissue Extraction kitinde belirtilen prosedür izlenerek gerçekleştirildi. Konsantre buffer içeren Wash Buffer şişesine 56 ml ethanol ilave edilerek seyreltilti. Proteinaz K dışındaki tüm çözeltiler oda sıcaklığında, Proteinaz K +4°C' de muhafaza edildi. Çalışmaya başlamadan önce benmari 65 °C'ye ayarlandı. Mezbahalardan toplanarak İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesindeki derin dondurucuda -20°C'de muhafaza edilen lenf yumruları bistüri ile parçalanarak homojenize edildi ve bu örneklerden alınan 10-20 mg doku örneği ependorf tüpüne konuldu. Örneğe 250 µl Buffer TL ve 20 µl Proteinaz K eklenerek homojenize çözelti elde etmek için pulse vorteksleme ile iyice karıştırıldı. 12 µl Lysis Enhancer eklenerek hemen karıştırıldı ve 65 °C'de ısıtıcı blokta gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası 560 µl Buffer TB ilave edilerek homojenize solüsyon elde edilinceye

kadar vortekslendi ve 65 °C’de 10 dakika inkübe edildi. 200 µl absöüt etanol eklenerek hemen vortekslendi. Temiz bir toplama tüpüne konan kolona yaklaşık 650 µl örnek aktararak 5.000x g’de 1 dakika santrifüje edildi ve akıntının tamamı atıldı. Kolonu yıkamak için 650µl Wash Buffer ilave edilerek 5.000x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Akıntının tamamı atıldıktan yıkama işlemi tekrar edilerek, 650µl Wash Buffer ilave edildi ve 5.000x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Akıntı atıldıktan sonra etanol kalıntılarını tamamen uzaklaştırmak için 10.000x g’de 1 dakika daha santrifüjlendi. Kolon ependorf tüpünden çıkarılarak temiz bir ependorf tüpüne alındı. Daha önceden 65°C’ye ısıtılmış olan Elution Bufferdan 200µl kolon membranı üzerine ilave edilerek oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi. DNA elüsyonu için 5.000x g’de 1 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Üstteki kolon atıldıktan sonra, mikrosantrifüj tüpünde toplanan DNA ekstraksiyonu PCR aşamasında kullanılabilecek kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

Ekstraksiyondaki DNA miktarı ölçümü:

Örneklerden elde edilen ekstraksiyonlardan tesadüfi olarak seçilen 24 tanesinin nükleik asit saflığı, DNA/RNA oranları ve DNA miktarları spektrofotometre ile ölçüldü. Ölçüm değerleri Tablo 3-2’de verilmiştir.

Tablo 3-2: DNA Ekstraktlarının miktar ve saflığı

Örnek No	DNA Miktarı (ng/µl)	A260/280	A260/230
2	149,16	1,92	2,26
3	114,60	1,89	2,17
8	315,09	1,83	1,71
20	249,11	1,94	2,35
22	343,50	1,93	2,33
24	529,69	1,90	2,28
33	86,94	1,94	2,53
63	81,13	1,89	2,38
90	152,99	1,89	2,03
95	145,78	1,85	1,82
96	266,10	1,90	2,19
98	280,54	1,78	1,67

109	128,93	1,90	2,14
127	119,67	1,88	2,20
119	159,05	1,91	1,99
125	113,67	1,90	2,49
126	115,36	1,92	2,57
146	103,86	1,90	2,35
149	98,76	1,88	2,44
151	100,85	1,89	2,33
159	129,10	1,90	1,87
188	148,30	1,88	2,43
191	133,64	1,93	2,45
192	97,64	1,90	2,50

3.2.1.2. DNA amplifikasyonu

Real-time PCR karışımı hazırlanması:

IDEXX RealPCR MAP DNA Test kitinde bulunan RealPCR MAP DNA Mix (MAP DNA Mix) 1 ml RealPCR PCR DNase RNase free distile su ile, RealPCR Positive Control (PC) ise 500 µl RealPCR PCR Grade Water ile sulandırılarak oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra mikrosantrifüjle karıştırıldı.

Bir örnek için *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA gen bölgesine spesifik primer ve probu içeren RealPCR MAP DNA Mix'ten 10µl ve DNA MMX'ten 10µl alınıp mikrosantrifüj tüpüne konarak PCR karışımı hazırlandı. PCR miksi bir kaç kere pipetlendikten sonra vortekslendi. Hazırlanan PCR karışımından 20µl alınarak PCR plakasındaki kuyucuklara aktarıldı. Her kuyucuğa örneklerden elde edilen ekstraksiyonlardan 5 µl eklenerek toplam hacmi 25 olan PCR karışımı elde edildi. Her çalışmada pozitif kontrol için bir kuyucuğa 5 µl RealPCR Positive Control (PC), negatif kontrol için 5 µl RealPCR PCR DNase RNase free distile su ilave edildi. PCR plakasının üzeri film ile kapatılarak kuyucuklarda hava kabarcığı kalmaması için santrifüj edildi.

Roche LightCycler 480 Real Time PCR cihazına göre optimize edilen ısı değerlerinde Realtime PCR aşaması tamamlanmıştır. Bu amaçla thermal cycler 50°C'de 15 dakika reverse transcription işleminden sonra, denatürasyon için 95°C'de 1 dakika 1 siklus, amplifikasyon için 95°C'de 15 saniye ve 60°C'de 30 saniye 45 siklus, son aşamada

40°C’de 30 saniye soğutma olacak şekilde ayarlanmıştır. Her 60°C lik amplifikasyon aşamasından sonra floresan kayıtları alınmıştır. Floresan artışı olan örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir. PCR sonunda elde edilen grafiklerdeki cycle threshold (C_T) değerlerine göre değerlendirme yapılmıştır.

3.2.2. İstatistiksel analiz

Pozitif sonuç bulunan hayvanların, ırk, yaş, cinsiyet, genel kondisyon ve kaşeksi varlığı, yetiştirildiği bölge ve kesim yeri gibi parametrelerin istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde, sonuçlar Statistical Package for the Social Science (SPSS) 13 programında “Khi-kare (χ^2) Testi” ile değerlendirilmiştir (Özdamar 1999).



4. BULGULAR

4.1. Real-time PCR bulguları

Çalışmada kullanılan 200 adet 2 yaş üzeri sığır ileal lenf yumrusu örneğinin 3 tanesinde (%1,5) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA'sı saptanmıştır.

Real-time PCR ile pozitif olduğu tespit edilen örneklerin C_T değeri, ırk, yaş, cinsiyet, kesime sevk edildiği yer, ağırlık, kesim yeri bilgileri Tablo 4-1'de verilmiştir.

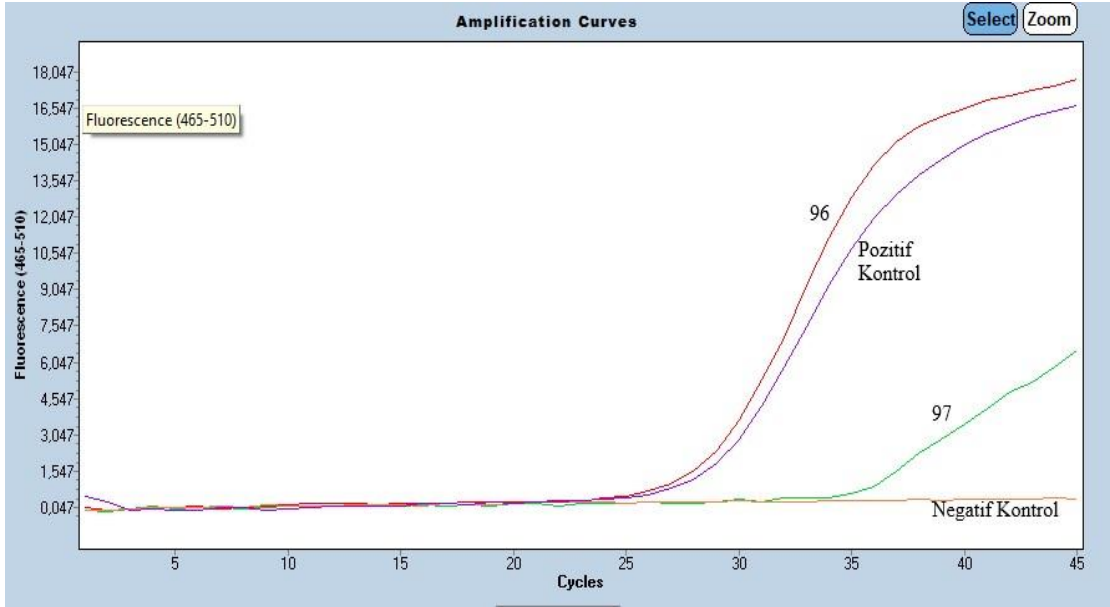
Tablo 4-1: Real-time PCR ile *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* saptanan örneklerin ırk, yaş, cinsiyet, kesime sevk edildiği yer, ağırlık, kesim yeri bilgileri

Örnek No	C _T Değeri	İrk	Yaş	Cinsiyet	Kesime Sevk Edilen Yer	Ağırlık-Durumu	Kesim Yeri
96	28,78	Hol SA	9	Dişi	Kırklareli Merkez/Değirmencik	Normal	Hayrabolu
97	35,32	Hol SA	5	Dişi	Tekirdağ Hayrabolu/Bayramşah	Zayıf	Hayrabolu
188	34,91	Hol SA	5	Dişi	Tekirdağ Süleymanpaşa/Naip	Zayıf- *Tüberküli n Pozitif Şartlı kesim	Süleymanpaşa

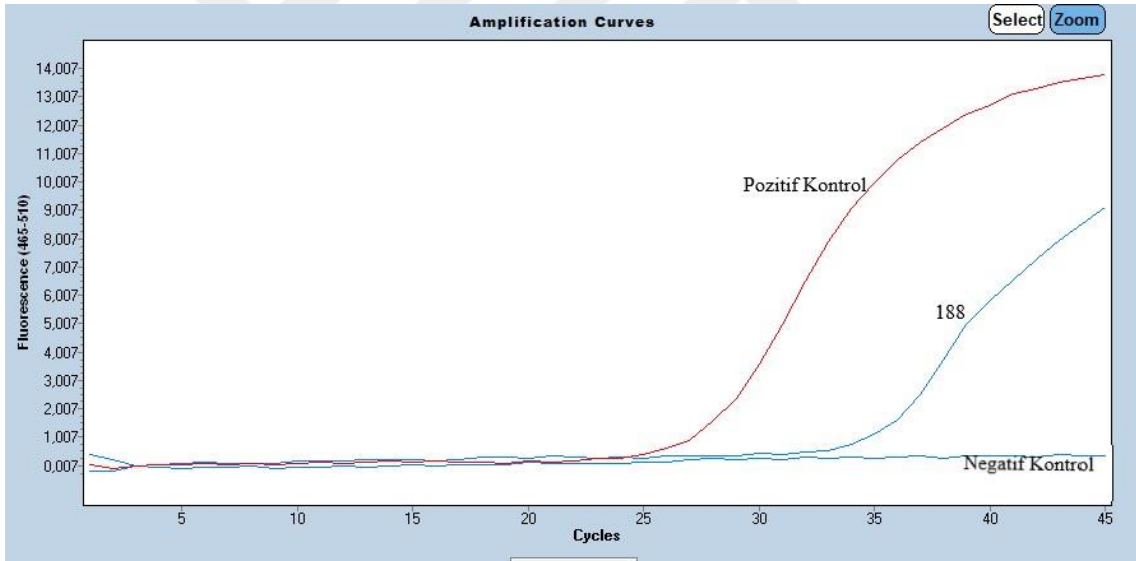
*PPD sığır tüberkülin kullanılarak yapılan, tek intradermal tüberkülin test sonucu tespit.

Hol SA: Holştayn siyah alaca

Real-time PCR ile pozitif olduğu tespit edilen örnekler ile pozitif ve negatif kontollere ait real-time PCR amplifikasyon eğrileri Şekil 4-1 ve 4-2'de gösterilmiştir.



Şekil 4-1: Real-time PCR amplifikasyon eğrisi (96-97 nolu örnekler)



Şekil 4-2: Real-time PCR amplifikasyon eğrisi (188 nolu örnek)

4.2. İstatistiksel bulgular

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* tespit edilen hayvanların, ırk, yaş, cinsiyet, genel kondisyon ve kaşeksi varlığı, yetiştirildiği bölge ve kesim yeri gibi parametrelerinin Statistical Package for the Social Science (SPSS) 13 programında “Chi-kare (χ^2) Testi” ile istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,05$).

5. TARTIŞMA

Paratüberkuloz (Johne hastalığı) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* tarafından ruminantlarda kronik enteritise neden olan bir enfeksiyöz hastalıktır (Lazaro ve ark. 2005).

İlk olarak sığır, ardından koyun ve daha sonra keçide saptanan paratüberkuloz tüm dünyada evcil ve yabani ruminantlarda da görülmektedir. Hastalık ayrıca at, domuz, geyik, tavşan, gelincik, tilki ve çakalda da bildirilmiştir (OIE 2018).

Paratüberkuloz kronik ishal, kilo kaybı, verim düşüklüğü, infertilite ve ölüm nedeni ile dünya genelinde sığır yetiştiriciliğinde ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Çetinkaya ve ark. 2000; Atala ve ark. 2001; Ayele, W.Y., 2004; Sivakumar ve ark. 2005).

Hastalık süt ve kolostrum ile buzağılara ve fekal-oral yolla her yaştan hayvanlara bulaşır. Ayrıca intrauterin bulaşmanın da olabildiği, hastalık etkeninin salyada da tespit edilebildiği bildirilmiştir (Yue ve ark. 2016).

Hastalığın inkübasyon süresi uzundur ve erken yaşta etken alınsa bile enfeksiyon 2 yaş ve üstü hayvanlarda görülür. İnkübasyon süresinin uzun olmasından dolayı, hastalığının tanısı da zordur. (Atala ve ark. 2001). Etkenler alındıktan sonra lenfatik sisteme girer ve daha sonra tüm vücuda yayılarak ince bağırsaklarda lokalize olur ve burada çoğalmaya başlarlar. Propria mukoza tabakasında epiloid hücre, lenfosit, eosinofil, plazma hücresi infiltrasyonu görülür. Etkenler afferent lenf damarları yolu ile ilgili lenf düğümlerine taşınarak özellikle subkapsüler bölgede yoğun lenfoid hücre infiltrasyonuna neden olur. Histolojik değişiklikler sonucu genellikle jejunumun son bölümü ile ileum ve sekum mukozasının kalınlaşması ve enine kıvrımlı bir hal alması ile karakterize enteritis kataralis kronika hipertrofikans ile paratüberkuloz oluşur. Bu patolojik değişiklikler sonucu hayvanlarda ishal şekillenir, dehidrasyon ve ölümle sonuçlanır. (Çiftçi ve Hatipoğlu, 1991).

Paratüberkuloz 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. Paratüberkuloz 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 (Çetinkaya ve ark. 2000).

Türkiyede sığırlarda paratüberküloz hastalığı ilk olarak 1928 yılında Sezginer tarafından, koyunlarda ise 1968 yılında Hakioğlu tarafından İzmit’de koyunlarda tespit edilmiştir (Karadaş ve ark. 2000).

Paratüberküloz hastalığının ilgi görmesinin en önemli nedenlerinden birisi, hastalığın etkeni *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*’in insanlarda paratüberküloza benzeyen bir tablo gösteren Crohn hastalığının etyolojisinde rolü olduğuna dair varsayımlardır. Crohn hastalığı, insanlarda sindirim sistemini özellikle ince bağırsakları etkileyen kronik bir hastalık olup histopatolojik olarak ruminant paratüberkülozuna benzerlik göstermektedir (Çetinkaya ve ark. 2000). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*’in sütün pastörizasyon sıcaklığına dayanıklı olması ve insan Crohn hastalığındaki potansiyel rolü hayvan popülasyonunda hastalığın kontrolünün gerekli olduğunu göstermektedir (Khan ve ark. 2010).

İnfeksiyonun tanısında kullanılan geleneksel metotlar etken izolasyonu ve serolojidir. Ancak etken izolasyonunun uzun zaman alması (16-22 hafta), pahalı olması ve kontaminasyon gibi dezavantajları vardır. ELISA ve Komplement Fiksasyon gibi serolojik yöntemlerin ise duyarlı olmayıp, enfeksiyonun erken devresinde spesifik antikorları saptamada yetersiz oldukları bildirilmiştir. Moleküler biyolojideki gelişmelere paralel olarak günümüzde enfeksiyonun tanısında etkenin spesifik IS900 geninin saptanması için PCR teknikleri başarı ile kullanılmaktadır (İkiz ve ark. 2005).

Real time PCR, mikrobiyal patojenlerin tespitinde çok etkili bir yaklaşım sunmakta ve ve konvansiyonel PCR ile karşılaştırıldığında, prob kullanımına bağlı olarak daha hızlı, daha iyi duyarlılık, özgünlük, objektif sinyal okuma, minimum çapraz kontaminasyon, kantitasyon potansiyeli gibi avantajları vardır (Mackay, 2004; Lazaro ve ark. 2005).

Paratüberküloz lezyonları gösteren mandaların (*Bubalus bubalis*) bağırsak ve mezenterial lenf yumrusu dokularından, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*’in saptanmasına yönelik bakteriyel kültür ve IS900’e özgü PCR yönteminin karşılaştırıldığı çalışmada, PCR yöntemi ile 20 mandanın 14 ünde, bakteriyel kültür yöntemi ile 6 tanesinde pozitif sonuç elde edilmiştir. Mandalarda subklinik paratüberkülozun saptanmasında PCR yönteminin bakteriyel kültürden daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Sivakumar ve ark., 2005).

Yukarıdaki nedenlerden dolayı çalışmamızda *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*'in varlığını belirlemek için real time PCR (Roche LightCycler 480) kullanılmıştır.

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* tercihen sığırlarda ileumun terminal bağırsak duvarında kolonize olur, makrofajlar tarafından asimile edilir ve lokal lenf yumrularında birikir. (Chiodini, 1989; Cocito ve ark. 1994; Chiodini ve ark. 1996; Wells ve ark. 2009). Pavlik ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, aynı hayvanların fekal örnekleri ile karşılaştırıldığında, gastro intestinal lenf yumruları örneklerinde daha yüksek prevalans gösterdiği bildirilmiştir (Wells ve ark. 2009). Gaita ile yapılan PCR çalışmalarında çeşitli sebeplerden dolayı inhibisyon olması nedeni ile sütte ve doku örneklerinde PCR ile *M. avium* subsp. *paratuberculosis*'in tespit edilmesinin daha uygun olduğu önerilmiştir (Millar ve ark. 1996).

Ayrıca sessiz enfeksiyon döneminde etkenin dışkı ile atılımı veya serum antikorları tespit edilemez. Lenfosit proliferasyonunu veya interferongamma üretimini ölçen in vitro testler gibi spesifik hücresel immünite ölçümleri pozitif sonuçlar verebilir, ancak bu testler klinik bir ortamda nadiren uygulanabilir. Enfeksiyonun bu aşamasında hayvanları tanımlamak için tek güvenilir yöntem, kültür veya polimeraz zincir reaksiyonu ile MAP tespiti için ileum veya mesenterik lenf yumrusu örnekleri olduğu bildirilmiştir (Sweeney 2011).

Çalışmamızda mezbahada kesime sevk edilen 2 yaş ve üstü hayvanların ileal lenf yumruları çalışma materyali olarak kullanılmıştır.

Türkiyede hastalığın prevalansına yönelik çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Elazığ'da ineklerde hastalığın prevalansını saptamak için yapılan çalışmada, 2 yaş ve üzeri 500 hayvandan alınan süt numunelerinin IS 900 PCR yöntemi ile incelenmesi sonucunda, 25 örnekte pozitif sonuç tespit edilmiştir. PCR pozitif olan süt örneklerinden yapılan kültür çalışmasında ise 25 örneğin 17 sinde üreme görülmüştür. PCR sonucu elde edilen prevalans (%5) ile kültür sonucu elde edilen prevalans (%3,4) arasında istatistiki olarak önemli farklılık bulunmamıştır. (Çetinkaya ve ark. 2000).

Türkiye genelinde 2 yaş ve üstü sığırlardan toplanan 8873 adet kan serumunda ELISA yöntemi ile yapılan çalışma sonucunda, 409 adet örnekte pozitif sonuç elde edilmiş ve Türkiye'deki bireysel prevalansın %3,7 olduğu hesaplanmıştır. Çalışma 9 ayrı

bölgede yapılmış olup, bölgelerdeki bireysel prevalansın %0 ile %9,6 arasında olduğu, her köy bir sürü olarak kabul edildiğinde ise bölgelerdeki sürü prevalansının %26,6 ile %48,2 arasında olduğu saptanmıştır (Atala ve Akçay 2001).

Trakya yöresinde yetiştirilen, rastgele örnekleme olarak seçilen 2 yaş ve üzeri 96 adet süt sığırının rektum mukozasından alınan dışkı örneklerinin PCR ile incelenmesi sonucu *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* tespit edilememiştir (İkiz ve ark., 2005).

Uşak ilinde 3-7 yaşlarında 200 adet süt ırkı sığırdan alınan süt ve dışkı örneklerinde yapılan çalışmada; dışkıda ZN boyama ile %17, Outer PCR ile %9,5, Nested PCR ile %20, bakteriyolojik kültür ile %4; süt örneklerinde ise ZN boyama ile %15,5, Outer PCR ile %5,5, Nested PCR ile %17,5, bakteriyolojik kültür ile %2,5 prevalans olduğu saptanmıştır (Yıldırım, 2011).

2011 yılında Trakya yöresindeki 30 adet süt çiftliğinden alınan, 2 yaş ve üstü sığırların 270 fekal örneği ile bu çiftliklerin bulunduğu köylerdeki süt toplama tanklarından alınan 45 adet çiğ süt örneklerinin F57 Real time PCR ve IS900 nested-PCR yöntemleri ile incelenmesi sonucunda *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* tespit edilememiştir (Özpınar ve ark., 2015).

Kars ili ve ilçelerinde 2 yaş üzeri 400 sığırdan alınan kan serumu örneklerinde ELISA yöntemi ile yapılan araştırmada, 400 hayvanın 14'ünde antikor tespit edilerek bireysel seroprevalansın %3,5 olduğu, çiftlik bazında hesaplandığında ise %41,6 olduğu belirlenmiştir. ≥ 2 -<5 yaş sığırlarda %1,7; ≥ 5 -<7 yaş sığırlarda %3,8; 7 ve daha yaşlı sığırlarda seroprevalansın %5,1 olduğu saptanmıştır (Makav ve Gökçe, 2013).

Afyon ve civarındaki hayvancılık işletmelerinden, 4-8 yaş 305 adet Holstein Frieisan ırkı sığırların, dışkı ve kan serumları alınarak yapılan çalışmada, Ziehl-Neelsen boyama ile %4.59, ELISA testi ile %31.80 oranında prevalans olduğu tespit edilmiştir (Borum ve ark., 2014).

Burdur ilinde 2 yaş ve üzeri sığır, koyun ve keçilerden 150'şer adet, toplamda 450 hayvandan alınan kan serumlarında ELISA yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada, bireysel seroprevalansın % 8 - % 8.9 olduğu, sürü-içi seroprevalansın % 17.1 - % 20.4 olduğu, sürüler arası seroprevalansın % 46.7 - % 57.8 olduğu tespit edilmiştir (Çelik, 2015).

Manisa’da subklinik paratüberkülozun prevalansını tespit etmek için yapılan çalışmada, 442 holştayn ırkı inekten alınan kan serumu örneklerinin ELISA yöntemi ile incelenmesi sonucunda; subklinik paratüberküloz prevalansının %21,72 olduğu belirlenmiştir. Örnekler 40 farklı hayvancılık işletmesinden alınmış ve her ahırda hastalık tespit edilmiştir (Berberoğlu ve Civelek, 2016).

2012-2014 yılları arasında, Amasya ve Samsun illerinde yer alan 15 hayvancılık işletmesinde, 2 yaş ve üzeri kronik ishal şikayeti olan 859 Holstein-Friesian ırkı sığırdan alınan kan serumlarının indirek ELISA yöntemi ile incelenmesi sonucunda, 7 işletmede (%46,7), 86 hayvanın (%10) kan serumunda *M. avium* subsp. *paratuberculosis* antikorları tespit edilmiştir (Tütüncü ve ark., 2018).

Kırklareli ilindeki subklinik paratüberkülozun prevalansının belirlenmesi için yapılan çalışmada, 3-4 yaşlarındaki 400 holştayn ırkı inekten alınan kan serumu örneklerinin ELISA yöntemi ile incelenmesi sonucunda; %1,5 pozitif, %1,5 şüpheli, %97 negatif sonuç elde edilmiştir (Karakaş ve Civelek, 2018).

Dünyada çiftlik hayvanlarında paratüberkülozun prevalansı üzerine bir çok çalışma yapılmıştır. Ancak gerçek prevalans tahminlerinin elde edilmesi zordur. Ayrıca, hayvan düzeyinde yaygınlık, kalıtım sıklığı ve sürü düzeyinde yaygınlık arasında ayırım yapılması gerekir (Garcia ve Shallo, 2015).

Avrupada sığırlarda paratüberkülozun sürü prevalansının %7-55 arasında olduğu bildirilmiştir (Ayele ve ark., 2001).

Almanya’da süt sığırı işletmelerinde serum ELISA yöntemi ile yapılan çalışmada %4,24 (Denzin ve ark., 2011), fekal kültür yöntemi ile yapılan çalışmada bireysel prevalans %41,43 olarak tespit edildiği bildirilmiştir (Donat ve ark., 2015).

Almanya’nın bazı bölgelerinde süt sürülerinde sürü prevalansın % 84,7 e kadar ulaştığı rapor edilmiştir. Avusturyada sığır sürülerinde hastalığın prevalansı 1994-1997 yılları arasında %6,97 iken 2002-2003 yılları arasında %19,05 e çıkmıştır (Khol ve Baumgartner, 2012).

Belçikada 2000 yılında serum ELISA yöntemi ile yapılan çalışmalarda süt işletmelerindeki sığırlarda bireysel prevalans %1,16; et besiciliği işletmelerinde ise %0,52 olarak; süt sığırlarında sürü bazında prevalans %32; et besiciliği işletmelerinde sürü bazında prevalans %32 olarak tespit edilmiştir (Boelart ve ark., 2000).

İsveç'te 4000 sığırın dışkı örneklerinde etken izole edilmediği, araştırma sonucunda İsveç'te hastalıktan ariliğin olduğu rapor edilmiştir (Stenberg ve ark., 2002). İsveç hastalıktan ari olduğunu bildiren tek ülke olmasına rağmen bu ülkede sporadik vakaların olduğu bildirilmektedir (Khol ve Baumgartner, 2012).

Hollanda'da süt çiftliklerinde paratüberkülozun prevalansını belirlemek için, 378 çiftlikte 3 yaş ve üzeri 15822 adet hayvanın kan serumunda absorbe ELISA yöntemi ile yapılan çalışmada, gerçek bireysel prevalansın %2,7-6,9 arasında olduğu, sürü bazında gerçek prevalansın %31-71 arasında olduğu hesaplanmıştır (Muskens ve ark., 2000).

İngiltere'nin güney batısındaki mezbahalarda kesilen 1533 sığırın intestinal lenf yumrularında PCR ve fekal kültür ile yapılan inceleme sonucunda, subklinik paratüberkülozun prevalansı PCR ile %3,5, kültür yönteminde ise %2,6 olarak tespit edilmiştir (Çetinkaya ve ark., 1996).

İrlanda'da 2005 yılında sığırlarda paratüberkülozun prevalansını belirlemek için ELISA yöntemi ile yapılan çalışmada, 639 sığır çiftliğinden 20.322 hayvandan alınan kan örneklerinde hesaplanan gerçek bireysel prevalans %2,86, 2 yaş üstü hayvanlarda %3,3, sütçü sığır sürülerinde ortalama sürü prevalansı %31,5, et besiciliği yapılan sürülerde ortalama sürü prevalansı %17,9 olarak tespit edilmiştir (Good ve ark., 2009).

Amerika Birleşik Devletleri'nde serum ELISA yöntemi ile yapılan çalışmalarda süt işletmelerindeki sığırlarda bireysel prevalans %3,8 (Lombard ve ark.,2005), başka çalışmada %4,12 (Hirst ve ark., 2004), sürü bazında fekal kültür ve PCR ile yapılan çalışmada prevalans %76,92 (Toth ve ark., 2013); et besiciliği işletmelerinde serum ELISA yöntemi ile yapılan çalışmada sürü bazında prevalans %7,9 olarak tespit edilmiştir (Dargatz ve ark., 2001).

Dünyada hastalığın prevalansının tespitine yönelik yapılan araştırmalarda elde edilen veriler, kullanılan tanı ve materyal farklılıkları, ülkelerdeki coğrafi farklılıklar, hayvan yetiştiricilik şekilleri, alınan tedbirlere göre farklılık göstermektedir.

Çalışmamız sonucu Trakya yöresinde kesime gönderilen 2 yaş ve üzeri sığırlarda %1,5 olarak tespit edilen prevalans değerinin, ülkemizde diğer yörelerde yapılan çalışmalarda tespit edilen prevalans değerlerinden daha az olduğu görülmüştür. Trakya yöresinde yapılan başka 2 çalışmada paratüberküloz tespit edilmemiş, Kırklareli ilinde

Karakaş ve Civelek (2018) tarafından yapılan araştırma sonucu elde edilen veriler ile çalışmamızdaki verilerin benzer olduğu saptanmıştır.

Trakya yöresine hayvan sevklerinin ve yöredeki hayvan hareketlerinin kontrollü olması, hastalıktan arı işletme çalışmalarının olması, bölgedeki iklim, çevre, bakım ve besleme koşullarının daha iyi olmasından dolayı prevalansın Türkiye geneline göre düşük olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda hayvanların, ırk, yaş, cinsiyet, genel kondisyon ve kaşeksi varlığı, yetiştirildiği bölge ve kesim yeri gibi parametrelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bunun sebebinin örnek sayısının ve insidensinin düşük olmasından kaynaklanması muhtemeldir.

Sonuç olarak, Trakya yöresinde yetişen sığırların ileum lenf yumrularında spesifik DNA'nın düşük prevalansı (% 1.5) umut vericidir. Halk sağlığı açısından ve ekonomik önemi nedeniyle, Johne's hastalığı hakkında Trakya yöresinde ve Türkiye'nin diğer yerlerinde farklı iklim ve yönetim koşullarına sahip çiftlik araştırmaları da dahil olmak üzere daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Atala, N. ve Akçay, E. (2001). Türkiye genelinde sığır paratuberkülozu prevalansının ELISA ile araştırılması. *Etlik Vet.Mikrob.Derg.*, 12, 1-2.
- Ayele W.Y., Machackova M., Pavlik İ. (2001). The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Vet. Med.-Czech*, 467–8), 205–224.
- Ayele, W.Y., Bartos, M., Svastova, P., Pavlik, I. (2004). Distribution of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Veterinary Microbiology*, 103, 209–217.
- Baumgartner, W. ve Khol, J.L. (2006). Paratuberculosis (Johne's Disease) in ruminants-an ongoing story. *Slov Vet Res*, 43(1), 5-10.
- Berberoğlu, M., Civelek, T. (2016). Seroprevalence of subclinical paratuberculosis in dairy cattle in Manisa region of Turkey. *Kocatepe Vet J.*, 9(3), 194-199.
- Billman-Jacobe, H., Carrigan, M., Cockram, F., Corner, L.A., Gill, I.J., Hill, J.F., Jessep, T., Milner, A.R., Wood, P.R. (1992). A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Australian Veterinary Journal*, 69(2), 25-28.
- Boelaert, F., Biron, K.P., Vermeersch, J.P., Berkvens, D., Godfroid, J. (2000). Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Vet. Microbiol.* 77, 269–281.
- Borum, A.E., Çatık, S., Mecitoğlu, Z., Demir, G., Ülgen, M., Şentürk, S. (2014). ELISA ve fekal bakteriyoskopi ile sığırlarda Paratuberküloz prevalansının belirlenmesi. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 25(1), 1-5.

Buergelt, C.D., Hall, C.E., Merkal, R.S., Whitlock, R.H., Duncan, J.R. (1977). Lymphocyte transformation: an aid in the diagnosis of paratuberculosis. *American Journal of Veterinary Research*, 38(11), 1709-1715.

Buergelt, C.D., Williams, J.E. (2004). Nested PCR on blood and milk for the detection of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis DNA in clinical and subclinical bovine paratuberculosis. *Australian Veterinary Journal*, 82(8), 497-503.

Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Merkal, R.S. (1984). Ruminant paratuberculosis (Johne's Disease) the current status and future prospects. *The Cornell Veterinarian*, 74(2), 218-262.

Chiodini, R. J. (1989). Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin. Rev. Microbiol.* 2:90-117.

Chiodini, R. J., and Rossiter, C. A. (1996). Paratuberculosis: a potential zoonosis? *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 457-467.

Clarke, C.J.(1997) The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Path.*, 116, 217-261.

Cocito, C., Gilot, P., Coene, M., Kesel, M., Poupart, P. ve Vannuffel, P. (1994). Paratuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(3), 328-345.

Collins, M.T. (2019). *Overview of Paratuberculosis*. Erişim 13.09.2019. Merck Manual Veterinary Manual. <https://www.merckvetmanual.com/generalized-conditions/paratuberculosis/overview-of-paratuberculosis?query=paratuberculosis>

Cousins, D.V., Condrón, R.J., Eamens, G.J., Whittington, R.J., Lisle, G.W. (2002). Paratuberculosis (Johne's Disease). Erişim 25.09.2018, *Australia and New Zealand Standart Diagnostic Procedures*. https://www.researchgate.net/profile/Richard_Whittington3/publication/228937426_Par_tuberculosis_Johnes_Disease/links/548566ad0cf283750c3714af.pdf

Çelik, A., (2015). Burdur ilinde sığır, koyun ve keçilerde paratüberküloz seroprevalansı. Erişim 23.02.2018, Yüksek Öğretim Kurulu Başkanlığı Tez Merkezi https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/TezGoster?key=Br_XTptK8CZ70f0JGX9xEgWbCDNotNcWWwQJlJ3sILXB1c4O9v1x5P0s6s9p1KCe

Çetinkaya, B., Egan, K., Harbour, D.A., Morgan, K.L. (1996). An abattoir-based study of the prevalence of subclinical Johne's disease in adult cattle in south west England. *Epidemiol. Infect.*, 116, 373-379.

Çetinkaya B., Öngör H., Ertaş H.B., Muz A. (1998). Detection of *M.avium* subsp. paratuberculosis DNA in the intestines and lymph nodes of small ruminants by polymerase chain reaction (PCR). *F.Ü. Sağlık Bil.Dergisi*, 12(2), 229-233.

Çetinkaya, B., Muz, A., Ertaş, H.B., Öngör, H., Sezen, İ.Y., Gülcü, H.B. (2000). Süt ineklerinde Paratüberküloz prevalansının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile saptanması. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 24(4), 371-379

Çiftçi, M.K. ve Hatipoğlu, F. (1991). Dört olguda gözlenen koyun paratübekülozu olayları üzerinde patolojik incelemeler. *Veterinarium*.

Dargatz, D.A., Byrum, B. A., Hennager, S. G., Barber, L. K., C. A., Kopral, Wagner, B. A., Wells, S. J. (2001). Prevalence of antibodies against *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis among beef cow-calf herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219, 497–501.

Denzin, N., Gehrmann, B., Ewert, B., Rohde, H. (2011). Estimation of the prevalence at animal level of paratuberculosis in female cattle of Saxony-Anhalt (Germany). *Vet. Sci. Dev.* 1, 10.

Dieguez, F.J., Gonzalez, A.M., Menendez, S., Vilar, M.J., Sanjuan, M.L., Yus, E., Arnaiz, I. (2009). Evaluation of four commercial serum ELISAs for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in dairy cows. *The Veterinary Journal*, 180, 231-235.

Donat, K., Schlotter, K., Erhardt, G., Brandt, H. R. (2014). Prevalence of paratuberculosis in cattle and control measures within the herd influence the performance of ELISA tests. *Vet. Rec.*, 174, 119.

Egan, J., Weavers, E., O'Grady, D. (1999). An evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in cattle. *Irish Veterinary Journal*, 52(2), 86–89.

Erume, J., Spengler, J., Rosengarten, R. (2001). Rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis from cattle and zoo animals by Nested PCR. *African Health Sciences*, Vol 1 No 2, 83-89.

Fecteau, M.E., Whitlock, R.H. (2011). Treatment and Chemoprophylaxis for Paratuberculosis. *Vet Clin Food Anim*, 27, 547-557.

Garcia, R.R., Lastra, J.M.P., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Garrido, J.M., Gortazar, C. (2008). Large-scale ELISA testing of Spanish red deer for paratuberculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 124, 75-81.

Garcia, A.B., Shalloo, L. (2014). Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *J. Dairy Sci.*, 98, 5019–5039.

Gilardoni, L.R., Paolicchi, F.A., Mundo, S.L. (2012). Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests. *Revista Argentina de Microbiologia*, 44, 201-215.

Good, M., Clegg, T., Sheridan, H., Yearsely, D., O'Brien, T., Egan, J., Mullowney, P. (2009). Prevalence and distribution of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle herds in Ireland. *Irish Veterinary Journal*, 62,9, 597-606.

Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Perez, V. Hughes, V., Pavlik I., Hines II, M.E., McKendrick, I., Sharp, J.M. (1999). Epidemiological Study of Paratuberculosis in Wild Rabbits in Scotland. *Journal of Clinical Microbiology*, 1746-1751

Grant, I.R., Ball, H.J., Neill, S.D., Rowe, M.T., (1996). Inactivation of Mycobacterium paratuberculosis in Cows' Milk at Pasteurization Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 62 No 2, 631-636

Harris, N.B. ve Barletta, R.G. (2001). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 489-512

Hirst, H.L., Garry, F.B., Morley, P.S., Salman, M.D., Dinsmore, R.P., Wagner, B.A., McSweeney, K. D., Goodell, G.M. (2004). Seroprevalence of Mycobacterium avium ssp. Paratuberculosis infection among dairy cows in Colorado and herd-level risk factors for seropositivity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 225, 97–101.

Huntley, J.F.J., Whitlock, R.H., Bannantine, J.P., Stabel, J.R. (2005). Comparison of Diagnostic Detection Methods for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in North American Bison. *Vet Pathol*, 42, 42-51.

İkiz, S., Bağcıgil, A.F., Ak, S., Özgür, N.Y., İlğaz A. (2005). Paratuberculosis in cattle in Turkey detected by PCR. *Medycyna Wet.*, 61(8), 881-883

Kalis, C.H.J., Collins, M.T., Hesselin, J.W., Barkema, H.W. (2003). Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Veterinary Microbiology*, 97, 73-86.

Karadaş, E., Metin, N., Yaman, İ. (2000). Elazığ'da bir keçide gözlenen ilk paratüberküloz olgusunda patolojik bulgular. *Türk J Vet Anim Sci*, 24, 317-323

Karakaş, B. ve Civelek, T. (2018). Kırklareli yöresi süt sığırlarında subklinik paratüberkülozun seroprevalansı. *Kocatepe Vet J.*, 11(2), 160-164.

Khan F.A., Chaudhry Z.I., Ali M.I., Khan S., Mumtaz N., Ahmad I. (2010). Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in tissue samples of cattle and buffaloes. *Trop Anim Health Prod*, 42, 633-638.

Khol, J.L., Baumgartner, W. (2012). Examples and Suggestions for the Control of Paratuberculosis in European Cattle. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 60, 1-7.

Kumar, S., Singh, R.V., Chauhan, A., Kumar, S., Sonwane, A. (2016). Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis infection in cattle: pathogenesis and diagnosis. *International Journal of Science and Nature*, 7(2), 469-476.

Lazaro, D.R., D'Agostino, M., Herrewegh, A., Pla, M., Cook, N., Ikonopoulou J. (2005). Real-time PCR-based methods for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in water and milk. *International Journal of Food Microbiology*. 101,1, 93-104.

Liverani E., Scaioli E., Cardamone C., Monte P.D., Belluzzi A. (2014). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in the etiology of Crohn's disease, cause or epiphenomenon? *World Journal of Gastroenterology*, 20-36, 13060-13070

Lombard, J. E., Garry, F. B., McCluskey, B.J., Wagner, B. A. (2005). Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227, 1975–1981.

Mackay, I.M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*; 10, 190–212.

Makav, M., Gökçe, E., (2013) Kars yöresi sığırlarında subklinik paratüberkülozun seroprevalansı. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(5), 913-916

Manning, E.J.B. (2011) Paratuberculosis in Captive and Free-Ranging Wildlife. *Vet Clin Food Anim*, 27, 621-630

Manning, E.J.B. ve Collins, M.T. (2001) Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE (France)* 20(1), 133-150

McKenna, S.L., Keefe, G.P., Barkema, H.W., Sockett, D.C. (2005). Evaluation of three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis using tissue and fecal culture as comparison standards. *Veterinary Microbiology*, 110, 105-111.

Millar, D., Ford, J., Sanderson, J., Withey, S., Tizard, M., Doran, T. and Hermon-Taylor, J. (1996). IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3446-3452.

Muskens, J., Barkema, H.W., Russchen, E., Maanen, K., Schukken, Y.H., Bakker, D. (2000). Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in the Netherlands. *Veterinary Microbiology*, 77, 253-261.

Nielsen, S.S., Toft, N. (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and faecal culture techniques. *Veterinary Microbiology*, 129, 217-235.

OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018 Chapter 2.1.15 Paratuberculosis (Johne's disease). 2014. Erişim 10/08/2018 http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.15_PARATB.pdf

Over, K., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Ricke, S.C. (2011). Current perspectives on *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis, Johne's disease, and Crohn's disease: a Review. *Critical Reviews in Microbiology*, 37:2, 141-156

Ozpinar, H., Tekiner, İ.H., Karaman, O., Kurt, Y. (2015). Investigation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) in fecal and bulk milk samples from dairy Farms in Thrace region of Turkey. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 21 (2), 247-252.

Özdamar, K. (1999). SPSS ile Biyostatik (3. Baskı), Kaan Kitabevi Eskişehir; 341-349.

Paratuberculosis (2017) 27.09.2018 The Center for Food Security&Publica Health.: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/paratuberculosis.pdf>

Patton, E.A. (2011). Paratuberculosis Vaccination. *Vet Clin Food Anim*, 27, 573-580.

Rathnaiah, G., Zinniel, D.K., Bannantine, J.P., Stabel, J.R., Gröhn, Y.T., Collins, M.T., Barletta, R.G. (2017). Pathogenesis, Molecular Genetics, and Genomics of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis, the etiologic Agent of Johne's Disease. *Frontiers in Veterinary Science*, 4,187.

Reddacliff, L.A., Vadali, A., Whittington, R.J. (2003). The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis isolated from tissues and faeces. *Veterinary Microbiology*, 95, 271-282.

Ris, D.R., Hamel, K.L., Ayling, J.M. (1988). The detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces by isolation and the comparison of isolation with the examination of stained smears by light microscopy. *New Zealand Veterinary Journal*, 36:3, 112-114.

Rosenfeld, G., Bressler, B. (2010). *Mycobacterium avium* paratuberculosis and the etiology of Crohn's disease: A review of the controversy from the clinician's perspective. *Can J Gastroenterol.*, 24(10), 619-624.

Settles, E.W., Kinka, J.A., Talaat, A. (2014). Attenuated strains of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis as vaccine candidates against Johne's disease. *Vaccine*, 32, 2062-2069.

Sivokumar, P., Tripathi, B.N., Singh N. (2005). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) by PCR and bacterial culture. *Veterinary Microbiology*, 108, (2005), 263-270.

Socket, D.C., Conrad, T.A., Thomas, C.B., Collins, M.T., (1992a). Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(5), 1134-1139.

Sockett, D.C., Carr, D.J., Richards, W.D., Collins, M.T. (1992b). A repository of specimens for comparison of diagnostic procedures for bovine paratuberculosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 188-191.

Sockett, D.C., Carr, D.J., Collins, M.T. (1992c). Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle. *Can. J. Vet. Res.*, 56, 148-153.

Stabel, J.R., Waters, W.R., Bannantine, J.P., Lyashchenko, K. (2011). Mediation of Host Immune Responses after Immunization of Neonatal Calves with a Heat-Killed *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Vaccine. *Clinical and vaccine Immunology*, 18, 12, 2079-2089.

Stenberg, S., Bölske, G., Robertsson, J.A., Olsson, S.O., Visker, D. (2002). Screening of Swedish dairy farms for paratuberculosis. 7th International colloquium on paratuberculosis, Bilbao, Spain.

Sweeney R.W. (1996): Transmission of paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practise.*, 12-2, 305–312.

Sweeney, R.W. (2011) Pathogenesis of Paratuberculosis. *Vet Clin Food Anim*, 27, 537-546.

Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Hamir, A.N., Rosenberger, A.E., Herr, S.A., (1992). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected animals. *American Journal of Veterinary Research*, 53(8), 1312-1314.

Thorel, M.F., Krichevsky, M., Frebault, V.V.L. (1990). 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. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40, 254-260.

Tiwari, A., VanLeeuwen, J.A., McKenna, S.L.B., Keefe, G.P., Barkema, H.W. (2006). Johne's disease in Canada Part I: Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can Vet J.*, 47, 874-882.

Toth, J. D., Aceto, H. W., Rankin, S. C., Dou, Z. (2013). Short communication: Survey of animal-borne pathogens in the farm environment of 13 dairy operations. *J. Dairy Sci.* 96, 5756–5761.

Tütüncü, M., Kılıçoğlu, Y., Güzel, M., Pekmezci, D. Gülhan, T. (2018). Seropositivity of Mycobacterium paratuberculosis in Cattle with Chronic Diarrhea in the Middle Black Sea Region. *Atatürk Üniversitesi Vet.Bil.Derg.*, 13(1), 1-5.

Weber, M.F., Verhoeff, J., Schaik, G., Maanen, C. (2009). Evaluation of Ziehl–Neelsen stained faecal smear and ELISA as tools for surveillance of clinical paratuberculosis in cattle in the Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine*, 92, 256-266.

Wells, J.E., Bosilevac, J.M., Kalchayanand, N., Arthur, T.M., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Koohmaraie, M. (2009). Prevalence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in ileocecal lymph nodes and on hides and carcasses from cull cows and fed cattle at commercial beef processing plants in the United States. *Journal of Food Protection*, 72,7, 1457–1462.

Whitlock, R.H., Buergelt, C. (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 12(2), 345-356.

Whitlock, R.H., Wells, S.J., Sweeney, R.W., Tiem, J.V. (2000). ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Veterinary Microbiology*, 77, 387-398.

Williams, E.S., Spraker, T.R. (1979). Paratuberculosis (Johne's Disease) in bighorn sheep and a rocky mountain goat in Colorado. *Journal of Wildlife Disease*, 15, 221-227.

Wu, C., Livesey, M., Schmoller, S.K., Manning, E.J.B., Steinberg, H., Davis, W.C., Hamilton, M.J., Talaat, A.M. (2007). Invasion and persistence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis during early stages of Johne's Disease in calves. *Infection and Immunity*, 75 (5), 2110-2119.

Yue, R., Liu, C., Barrow, P., Liu, F., Cui, Y., Yang, L., Zhao, D., Zhou, X. (2016). The isolation and molecular characterization of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Shandong province, China. *Gut Pathogens*, 8,9.

Zimmer, K., Drager, K.G., Klawonn, W., Hess, R.G. (1999). Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl–Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-Probe test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle. *Zentralbl Veterinarmed B.*, 46(2), 137-140.

HAM VERİLER



FORMLAR



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2011/ 139

27/10/ 2011

Sn: Doç. Dr. Serkan İKİZ
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Karar No :2011/ 139
Başvuru :20.10.2011

Sorumluluğunu Üstlendiğiniz, Doktora Öğrencisi Erhan YALÇIN'a ait "Trakya Bölgesinde Kesime Sevk Edilen Sığırların İleum Lenf Yumrularında Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Varlığının PCR İle Araştırılması" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İ.Ü.HADYЕК Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
Üye

Prof. Dr. Pınar YAMANTÜRK ÇELİK
Üye

Doç.Dr.Ufuk ÇAKATAY
Üye

Yard.Doç.Dr.Alper OKYAR
Üye

Yard.Doç.Dr Altan ARMUTAK
Üye

Uzm.Vet.Hek.Fatma TEKELİ
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

Mak.Yük.Müh. Dr.Burak OLGUN
Üye

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

TRAKYA BÖLGESİNDE KESİME SEVK EDİLEN SIĞIRLARIN İLEUM LENF YUMRULARINDA MYCOBACTERİUM AVİUM SUBSP. PARATUBERCULOSİS VARLIĞININ PCR İLE ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLIK RAPORU

% 10	% 7	% 2	% 6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	ooegm.meb.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
2	Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi	% 1
3	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
4	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 1
5	acikerisim.aku.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	Submitted to Akdeniz University Öğrenci Ödevi	<% 1
7	Submitted to Haliç Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
8	acikerisim.istanbul.edu.tr	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Erhan	Soyadı	YALÇIN
Doğ.Yeri	Tekirdağ	Doğ.Tar.	06/02/1978
Uyruğu	TC	TC Kim No	10679453106
Email	erhan.yalcin@tarimorman.gov.tr	Tel	05326853522

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2002
Lise	İstanbul Selimiye Veteriner Sağlık Meslek Lisesi	1994

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	İl Müdür Yardımcısı	Tekirdağ Tarım ve Orman İl Müdürlüğü	2019-Devam
2.	Veteriner Hekim	Tekirdağ Tarım ve Orman İl Müdürlüğü	2007-2019-
3.	Veteriner Hekim	Erzurum Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	2003-2007
4.	Veteriner Sağlık Teknisyeni	İstanbul Tarım İl Müdürlüğü	1995-2003
5.	Veteriner Sağlık Teknisyeni	Bulanık tarım İlçe Müdürlüğü	1995-1995

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	Orta	85	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Saglam, Y.S., Yener, Z., Temur, A., Yalcin, E. (2008). Immunohistochemical detection of leptospiral antigens in cases of naturally occurring abortions in sheep. *Small Ruminant Research*, 74, 119-122.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Yürüyüş, futbol, kayak

