



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**SIĞIR TÜBERKÜLOZ VE PARATÜBERKÜLOZ  
ENFEKSİYONLARININ ANTEMORTEM TANI  
YÖNTEMLERİYLE AYRIMI**

**Halil PİR**

**VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Hakan YARDIMCI**

**ANKARA**

**2023**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIĞIR TÜBERKÜLOZ VE PARATÜBERKÜLOZ  
ENFEKSİYONLARININ ANTEMORTEM TANI  
YÖNTEMLERİYLE AYRIMI**

**Halil PİR**

**VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Hakan YARDIMCI**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün  
TDK-2022-2478 proje numarası ile desteklenmiştir**

**ANKARA**

**2023**

## ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Sığır Tüberküloz ve Paratüberküloz Enfeksiyonlarının Antemortem Tanı Yöntemleriyle Ayrımı” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Halil PİR

Tarih: 09.06.2023

İmza:

## KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalında  
Halil PİR tarafından hazırlanan  
“Sığır Tüberküloz ve Paratüberküloz Enfeksiyonlarının Antemortem Tanı Yöntemleriyle  
Ayrımı” adlı tez çalışması  
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile  
kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza  
Unvanı Adı ve Soyadı  
Üniversitesi  
Jüri Başkanı

İmza  
Unvanı Adı ve Soyadı  
Üniversitesi  
Raportör

İmza  
Unvanı Adı ve Soyadı  
Üniversitesi  
Üye

İmza  
Unvanı Adı ve Soyadı  
Üniversitesi  
Üye

İmza  
Unvanı Adı ve Soyadı  
Üniversitesi  
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza  
Unvanı Adı ve Soyadı  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Mikobakterilerin Genel Özellikleri	1
1.2. Sığır Tüberküloz Enfeksiyonu	3
1.2.1. Epidemiyoloji	5
1.2.2. Tanı	9
1.2.2.1. Bakteriyoskopi ve Kültür	10
1.2.2.2. Hücresel Bağışıklığın Ölçülmesi	12
1.2.2.2.1. Tüberkülin Deri Testi (TDT)	12
1.2.2.2.2. Gama İnterferon (IFN- $\gamma$ ) Testi	13
1.2.2.3. Humoral Bağışıklığın Ölçülmesi	14
1.2.2.4. Moleküler Metotlar	16
1.3. Sığır Paratüberküloz Enfeksiyonu	16
1.3.1. Epidemiyoloji	17
1.3.2. Tanı	20
1.3.2.1. Direkt Tanı Yöntemleri	22
1.3.2.1.1. Nekropsi	22
1.3.2.1.2. Bakteriyoskopi	22
1.3.2.1.3. Bakteriyolojik Kültür	23
1.3.2.1.4. Moleküler Teşhis	23
1.3.2.2. İndirekt Tanı Yöntemleri	24
1.3.2.2.1. Hücresel İmmun Yanıtı Ölçen Testler	24
1.3.2.2.1.1. Gecikmiş Tip Aşırı Duyarlılık (DTH) Testi	24
1.3.2.2.1.2. Gama İnterferon (IFN- $\gamma$ ) Testi	25
1.3.2.2.2. Humoral İmmun Yanıtı Ölçen Testler	26
1.3.2.2.2.1. Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	26
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>28</b>
2.1. Gereç	28
2.1.1. Örneklenen Hayvanlar	28
2.1.2. Kan ve Dışkı Örnekleri	29
2.1.3. Ziehl-Neelsen (ZN) Boyama	31
2.1.4. Avian ve Bovine Tüberkülin (PPD)	32
2.1.5. Gama İnterferon (IFN- $\gamma$ ) Test Kiti	32

2.1.5.1. IFN- $\gamma$ Uyarıcı Antijen	33
2.1.6. <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> Antikor Test Kiti	34
2.2. Yöntem	35
2.2.1. Tüberküloz Enfeksiyonu Antemortem Tanı Yöntemleri	35
2.2.1.1. Tüberkulin (PPD) Deri Testi (TDT)	35
2.2.1.1.1. PPD Reaksiyonlarının Değerlendirilmesi	35
2.2.1.1.2. Karşılaştırmalı İntradermal PPD Bovine ve Avian Reaksiyonlarının Değerlendirilmesi	36
2.2.1.2. Gama İnterferon (IFN- $\gamma$ ) Testi	38
2.2.1.2.1. Kan Kültürünün Hazırlanması	38
2.2.1.2.2. Plazma Örneklerinin Alınması	39
2.2.1.2.3. Sandviç ELISA	40
2.2.1.2.4. Testin Değerlendirilmesi	41
2.2.2. Paratüberküloz Enfeksiyonu Antemortem Tanı Yöntemleri	42
2.2.2.1. Bakteriyoskopi	42
2.2.2.2. <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> Antikor Testi	44
2.2.2.2.1. Testin Uygulanışı	44
2.2.2.2.2. Testin Değerlendirilmesi	45
2.2.2.3. IFN- $\gamma$ Sonuçlarının Değerlendirilmesi	45
2.2.2.4. Karşılaştırmalı İntradermal PPD Reaksiyonlarının Değerlendirilmesi	46
2.2.3. Bir Teşhis Metodunun Spesifitesi ve Sensitivitesinin Belirlenmesi	48
<b>3. BULGULAR</b>	49
3.1. Tüberküloz Enfeksiyonu Antemortem Tanı Sonuçları	49
3.1.1. PPD Deri Testi	49
3.1.2. Gama İnterferon ELISA (IFN- $\gamma$ )	50
3.2. Paratüberküloz Enfeksiyonu Antemortem Tanı Sonuçları	52
3.2.1. Antikor ELISA	52
3.2.2. IFN- $\gamma$ ELISA	54
3.2.3. Bakteriyoskopi	55
3.2.4. İntradermal PPD Avian Sonuçları	56
3.2.5. Tanı Yöntemlerinin Karşılaştırılması	59
<b>4. TARTIŞMA</b>	62
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	71
<b>ÖZET</b>	73
<b>SUMMARY</b>	74
<b>KAYNAKLAR</b>	75
<b>EKLER</b>	89
Ek-1. Etik Kurul Raporu	89

## ÖNSÖZ

Çok geniş konakçı yelpazesine sahip, enfeksiyöz ve zoonoz bir hastalık olan Sığır Tüberkülozu, dünyanın bilinen en eski hastalıklardan biridir. Sığır Paratüberkülozu, dünyanın birçok bölgesinde endemik olarak görülen, hayvancılık ve ilgili endüstrilerde önemli ekonomik kayıplara neden olan, kronik ilerleyici granülomatöz bir enteritis ile karakterize, oldukça bulaşıcı bir hastalıktır. Her iki enfeksiyonda doğru, hızlı ve güvenilir tanı metotları kullanılması bulaşın önlenmesi ve enfeksiyonun yayılımının engellenmesi bakımından önemlidir.

Türkiye’de Sığır Tüberkülozu ve Paratüberküloz enfeksiyonları ile ilgili bilimsel çalışmalar ve vaka bildirimleri yapılmasına rağmen, her iki hastalığın insidansı ve prevalansı konusunda yeterli sayıda güncel araştırma ve kapsamlı bilgi sınırlı sayıdadır. Bu çalışmada Tüberküloz şüpheli süt sığırı işletmelerinde bulunan hayvanlara, Sığır Tüberkülozunun antemortem tanı ve ayırımında kullanılan tüberkülin deri testleri (PPD bovine ve avian) sonuçlarından yola çıkılarak, Paratüberküloz enfeksiyonu teşhisi koymak için serolojik olarak incelendi ve fekal bakteriyoskopi yapıldı. Ayrıca Türkiye’de endemik olarak görülen Sığır Tüberküloz hastalığının antemortem tanı yöntemleri karşılaştırılıp, gama interferon testinin sensitivite ve spesifite değerleri belirlenerek Sığır Tüberküloz hastalığının eradikasyon çalışmalarına katkı sağlayacak verilerin elde edilmesi amaçlandı.

Doktora eğitimim boyunca yardımlarını ve ilgilerini esirgemeyen başta danışman hocam Prof. Dr. Hakan YARDIMCI olmak üzere Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, tez izleme komitesindeki hocalarım Prof. Dr. Mehmet AKAN ve Prof. Dr. T. Haluk ÇELİK’e, saha çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Çorum Tarım ve Orman İl Müdürlüğünde çalışan Vet. Hek. Orhan UYAR ve Vet. Hek. Muhammet KILIÇEL’e, Çankırı/Çerkeş İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğünde çalışan Vet. Hek. Emre DEMİR, Vet. Hek. Umutcan ÇALIK ve Vet. Hek. Ahmet EJDER’e, Ankara/Sincan İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğünde çalışan Vet. Hek. Ali USLU’ya, Eskişehir/Odunpazarı İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğünde çalışan Vet.

Hek. Salih GÜRDOĞAN'a, Konya/Ereğli İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğünde çalışan Vet. Hek. Rasim KARAAĞAÇ'a ve bu süreçte destekleriyle hep yanımda olan aileme çok teşekkür ederim.

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) tarafından TDK-2022-2478 proje kodu ile desteklenmiştir.



## SİMGELER VE KISALTMALAR

BCG	Bacillus Calmette-Guerin
bTB	Sığır Tüberkülozu
CITT	Karşılaştırmalı İntradermal Tüberkulin Testi
CMI	Hücrel İmmun Yanıt
DTH	Gecikmiş Tip Aşırı Duyarlılık
ELISA	Enzim Linked Immunosorbent Assay
GC	DNA ve RNA'da bulunan bazlardan Guanin (G) ve Sitozin (C)
HIV	Human Immunodeficiency Virüsü
IFN- $\gamma$	Gama İnterferon
KFT	Komplement Fiksasyon Testi
MAIK	<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> Kompleks
Map	<i>Mycobacterium avium</i> spp. <i>paratuberculosis</i>
MIRU-VNTR	Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit - Variable Number Tandem Repeat
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Kompleks
OD	Optik Dansite
OIE	Office International Epizootica (Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü)
PPD	Prufiye Protein Derivatı
PTB	Paratüberküloz
PBS	Fosfat Buffer Solüsyonu
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
TB	Tüberküloz
TOB	Tarım ve Orman Bakanlığı
TDT	Tüberkulin Deri Testi
ZN	Ziehl-Neelsen
WAHIS	Dünya Hayvan Sağlığı Bilgi Sistemi
WHO	World Health Organization

## ŞEKİLLER

Şekil 1.1. 2019-2022 yılları arasındaki Sığır Tüberkülozu mihrak sayıları	8
Şekil 1.2. Postmortem muayenede tespit edilen tüberküller	10
Şekil 1.3. Konağın immün tepkisini gösteren grafik	15
Şekil 2.1. Hayvanlardan dışkı ve kan örneklerinin alınması	30
Şekil 2.2. Avian ve Bovine PPD	32
Şekil 2.3. Gama İnterferon ELISA Kiti	33
Şekil 2.4. <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> Antikor ELISA Kiti	34
Şekil 2.5. A. PPD uygulaması yapılacak bölgelerin traş edilmesi, B. Kumpas, C. Kumpasla ölçülmesi, D. PPD'nin deri içine enjekte edilmesi	38
Şekil 2.6. A. Kan örnekleri üzerine antijenlerin ilave edildiği 24 kuyucuklu hücre kültürü pleyti, B. Hücre kültürü pleytlerinin 37 °C'de %5 CO <sub>2</sub> 'li etüvde 16-24 saat inkübasyonu	39
Şekil 2.7. Plazma örneklerinin mikropleytlere IFN- $\gamma$ Sandviç ELISA testinde dağıtılması. Nil: PBS, Bo: PPD Bovine, Av: PPD Avian ile uyarılan plazma örnekleri	40
Şekil 2.8. A. Sürme preparatların hazırlanması, B. ZN ile boyanması, C. Mikroskopik sahada incelenmesi, D. Preparatların muhafaza edilmesi	43
Şekil 3.1. A. Bovine PPD pozitif reaksiyon, B. Avian PPD ve Bovine PPD pozitif reaksiyon	50
Şekil 3.2. Sığır plazma örneklerinin IFN- $\gamma$ ELISA sonucu	51
Şekil 3.3 Sığır kan serumu örneklerinin Antikor ELISA sonucu	53
Şekil 3.4. ZN boyama yöntemi ile dışkı örneklerindeki ARB'lerin mikroskopik görüntüsü (Kısa, kırmızı-pembe renkte, kalın ve iç içe girmiş kokobasil görünüm)	56
Şekil 3.5. A. Avian PPD pozitif reaksiyon, B. Avian PPD ve Bovine PPD pozitif reaksiyon	57

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 1.1.</b> Sığır Tüberkülozu enfeksiyonu tesbit edilen mihraklardaki hayvan sayısı	8
<b>Çizelge 2.1.</b> İllerdeki işletme sayıları ve hayvan sayıları	28
<b>Çizelge 2.2.</b> Çalışmada kullanılan sığırların yaş ve cinsiyet dağılımını	29
<b>Çizelge 2.3.</b> Karşılaştırmalı İntradermal Tüberkulin test sonuçlarının Değerlendirilmesi	37
<b>Çizelge 2.4.</b> Asido Resistants Basil (ARB) skorlama kriteri	43
<b>Çizelge 2.5.</b> Karşılaştırmalı İntradermal PPD deri test sonuçlarının PTB enfeksiyonu yönünden değerlendirilmesi	47
<b>Çizelge 2.6.</b> Bir teşhis metodunun spesifitesi ve sensitivitesi	48
<b>Çizelge 3.1.</b> Karşılaştırmalı İntradermal Tüberkulin test sonuçları	49
<b>Çizelge 3.2.</b> IFN- $\gamma$ testi ve İntradermal Tüberkulin test sonuçları	51
<b>Çizelge 3.3.</b> IFN- $\gamma$ testinin sensitivitesi ve spesifitesi	52
<b>Çizelge 3.4.</b> Sığır işletmelerindeki hayvanların Antikor ELISA sonuçları	53
<b>Çizelge 3.5.</b> PTB IFN- $\gamma$ ELISA sonuçları	54
<b>Çizelge 3.6.</b> <i>Map</i> 'in ZN boyama yöntemiyle dışkı bakışı sonuçları	55
<b>Çizelge 3.7.</b> Avian PPD sonuçlarına göre <i>Map</i> enfeksiyonu bakımından şüpheli bulunan 14 sığırın PTB tanı testleri sonuçları	58
<b>Çizelge 3.8.</b> <i>Map</i> enfeksiyonunun antemortem tanı yöntemleri sonuçlarının karşılaştırılması	60
<b>Çizelge 3.9.</b> <i>Map</i> enfeksiyonu antemortem tanı yöntemlerinin pozitif sonuçlarının karşılaştırılması	61

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Mikobakterilerin Genel Özellikleri

Mikobakteriler, aside dirençli, uzun veya kısa çomakçıklar halinde, 1,0-10 µm boyunda, 0,3-0,6 µm eninde, Gram pozitif, hafifçe eğri veya düz çomak şeklinde, hareketsiz, sporsuz, katalaz pozitif, hücre içi, kapsülsüz, fakültatif aerob özellik taşırlar (Arda ve ark., 1992; Coros ve ark., 2008). Mikobakteriler besi yerlerinde genellikle çok yavaş ürerler ve basiller bölünme 18-24 saat arasında bir gerçekleşir ve 10-15 gün içinde makroskopik olarak tespit edilebilir hale gelir, suşlar; sarı, pembe veya oranj renginde pigment oluşturur ve buruşuk, düzensiz koloniler halinde görünürler. Mikobakterilerin optimum şartlarda üremesi için pH 5-6 aralığında olması, % 5-10 CO<sub>2</sub> içerikli ortamın bulunması ve ısının 37°C'de olması gereklidir (Arda ve ark., 1992; Costa ve ark., 2014). Mikobakterilerin hücre duvarlarında kapsül yoktur ancak hücre duvarında çok fazla lipid bileşikleri barındırır. Bu yapı bakteriyi, çevresel şartlarına karşı dayanıklılığı sağladığı gibi, bakterinin karakteristik boyanma özelliğine sahip olmasını sağlar. Mikobakteriler, genomlarında yüksek oranda GC (Guanin- Sitozin) bazları barındırmaktadır. Genomlarında bulunan yüksek miktardaki GC (%62-%70) oranı ile ve hücre duvarında arabinoz, galaktoz ve amino asitlerden de alanin, glutamik asit ve DL-diaminopimelik asit üretmesi nedeniyle diğer mikolik asit üreten; *Nocardia*, *Rhodococcus* ve *Korinebakteriler* benzemektedirler. Mikobakteriler, hücre duvarlarında yüksek oranda mikolik asit barındırması sebebiyle asidik ortama duyarsız olan ve aside direnç gösteren asido-rezistans (ARB) bakteriler denilmektedir. Bu bakterilerin hücre duvar yapısında bulunan mikolik asit, peptidoglikan ve arabinomannanın meydana getirdiği tabaka ARB olmasını sağlamaktadır. Oluşan bu tabaka ile anilin boyasının (karbol fuksin gibi) oluşturduğu bağ sayesinde bakteri asit ve alkolle dekolere edildiğinde boya kendini bırakmaz. Ziehl-Neelsen boyama yöntemi özel bir asid fast boyama yöntemi olması sebebiyle bu özelliği ortaya çıkarmaktadır. Mikobakteriler, Gram boya ile zor boyanmalarına karşın Gram pozitif bakteri olarak değerlendirilmektedir ancak bu tür bir sınıflandırman içinde bulunmazlar (Arda ve ark., 1992; Borrell ve Gagneux, 2009).

Mikobakteriler; polisakkarit (karbonhidrat), protein ve özellikle lipit (yağ) tabakasından oluşan kompleks ve eşsiz hücre duvarına sahiptir. Bu bileşimler güçlü ve büyük bir direnç oluşturur böylece mikobakterilerin hücre içi saldırılara karşı ve konakçı dışında canlı kalma şansını artırır (Lulu ve Hussen, 2022).

Mikobakteriler, birçok antimikrobiyallara, dezenfektanlara, kimyasallara ve kuru ortama direnç göstermektedir. Formalin (%3), fenol (%2), sodyum hidroksit (NaOH) (%5) ve krezol (%1) içinde bakteri 4 saate kadar ve 3 ay balgamda, 2-6 ay merada, toprakta ve gübrede canlı kalabilmektedirler. Kuru ortama dirençlidir. Kurumuş insan balgamında aylarca enfeksiyöz yeteneğini korurlar. Laboratuvar koşullarında 6 ay süre ile canlılığını koruyabilmektedir. Pastörizasyon sıcaklığında çoğunlukla bakteriler ölmektedirler. Fenolik dezenfektanlara karşı çok dayanıksızdırlar. Direkt güneş ışınları ve ultraviolet ışınları kısa sürede öldürmektedir. (Akay, 1997; Arda ve ark., 1992; Ayele ve ark., 2004; Yardımcı, 2006 ).

Patojen mikobakteriler, insanlarda ve hayvanlarda hastalık oluşturmaktadır ve bu mikobakteriler ikiye ayrılmaktadır; *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBC) ve *Mycobacterium avium-intracellulare* kompleks. MTBC türleri arasında enfeksiyona sebep olan; *Mycobacterium tuberculosis* ve *Mycobacterium africanum* insanlarda, *Mycobacterium bovis* ve *Mycobacterium caprae* ruminantlarda, *Mycobacterium canettii* insanlarda, *Mycobacterium pinnipedii* deniz memelileri, *Mycobacterium microti* kemirgen ve insanlarda enfeksiyon yaparken, son zamanlarda yapılan moleküler çalışmalarla MTBC'nin 11 farklı mikobakteri türünden oluştuğu bildirilmiştir. Mikobakterilerin yüzden fazla türünün olduğu ve bağışıklık sistemi zayıflamış hastalarda birkaç atipik mikobakterinin hastalarda Tüberküloz dışı enfeksiyonlara sebep olabileceği bildirilmiştir ancak mikobakteri türülerinin çoğu insanda hastalık oluşturmamaktadır. Ayrıca *Mycobacterium bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guerin) insanlarda aşı etkenidir (Angela ve ark., 2006; Cousins ve ark., 2003; Gagneux, 2012; Thoen ve ark., 2014). *Mycobacterium tuberculosis* kompleks türleri % 95-100 değerinde DNA benzerliği göstermektedir (Kubica ve ark., 2003). *Mycobacterium avium* ve *Mycobacterium intracellulare* türleri ise; *Mycobacterium avium-intracellulare* kompleksi oluşmaktadır. *Mycobacterium avium* spp. *avium*,

*Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* ve *Mycobacterium avium* spp. *Sylvaticum*; *Mycobacterium avium*'un alt türleridir. *Mycobacterium avium* spp. *avium*, *Mycobacterium avium* spp. *sylvaticum*; sığırlarda ve insanlarda lenf nodülü enfeksiyonunu, kanatlılarda Tüberküloz enfeksiyonunu, *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*; ruminantlarda kronik granülamatöz enteritis ile karakterize; Johne's Disease (Paratüberküloz), insanlarda Crohn hastalığına sebep olmaktadır (Sayın, 2010).

## 1.2. Sığır Tüberküloz Enfeksiyonu

Memeli Tüberkülozu MTBC üyelerinin sebep olduğu insan ve hayvanlarda görülen kronik bakteriyel bir hastalıktır. *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae* ve *Mycobacterium tuberculosis* kompleks içinde yer alan önemli türlerdir. Bu hastalık dünya çapında bir dağılım göstermektedir ve sadece birkaç ülke Tüberküloz enfeksiyonundan arı olduğu varsayılmaktadır. Özellikle sığırlarda, evcil hayvanlarda ve bazı yabani hayvanlarda bu enfeksiyöz hastalık çok fazla görülmektedir. Bu enfeksiyonun hayvanlardan insanlara bulaşması sonucu, ortaya çıkan "Zoonotik Tüberküloz" bir halk sağlığı problemini oluşturmaktadır (OIE, 2022). Hastalığın zoonotik doğası, insan sağlığı üzerinde dünya çapında ciddi bir etkiye sahiptir. Ayrıca, bu tür hastalıkların neden olduğu önemli ekonomik maliyetlerin yanısıra özellikle gelişmekte olan ülkelerde gerçek hastalık prevalansının kesin olarak tahmin edilememesi, daha etkin tespit ve kontrol önlemlerini gerekli kılmaktadır (Hashem ve ark., 2022).

Tüberküloz hastalığı, insanlık tarihinde çok eski bir hastalık olduğu bilinmektedir. Hastalığa neden olan etkenler ve etkenin bulunduğu konaktaki yangı hücreleri tarafından beyaz-sarı renkli, kalsifiye granülomların oluşması ile tüberkül adı verilen lezyonların ortaya çıkması ile özgü kronik seyirli bir hastalıktır. Etkenin mononükleer hücrelere infiltrasyon yapması ile granülamatöz Tüberküloz lezyonları ortaya çıkmaktadır ve etken bu oluşan granülom yapılarında bulunmakta ve canlı kalabilmektedir. Sığırlarda tüberküller; baş ve göğüs kısmında bulunan lenf

nodüllerinde, akciğerde , karaciğerde , dalakda ve vücutta bulunan boşlukların yüzey kısmında, bazen dişi üreme organında meydana gelmektedir. Tüberküloz enfeksiyonun generalize formunda, çok miktarda vücut boşlukları ve organların yüzey kısmında küçük granülomlar bulunur ve kısmen bağırsak ya da mezenteriyum bölgelerinde bulunmaktadır (Pollock ve ark., 2001; Sayın, 2010). Sığır Tüberküloz enfeksiyonu genellikle subklinik seyreder, klinik bulgular ortaya çıktığı zaman hastalığa özgü klinik septomlar olmadığı için diğer hastalıklardan ayırt edilmesi güçtür. Klinik bulgular; halsizlik, iştahsızlık, aşırı zayıflık, solunum güçlüğü, özellikle hastalığın ilerlemiş dönemlerinde lenf nodüllerinin büyümesi ve öksürük şeklinde ortaya çıkabilir (OIE, 2022).

*M. bovis*, zoonoz bir mikroorganizmadır ve bu etken III. risk grup mikroorganizmalar arasında bulunduğu OIE (Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü) tarafında bildirilmiştir (OIE, 2018). *M. bovis* sebep olduğu Sığır Tüberkülozu (bTB), sığır, manda, koyun, keçi, porsuk, domuz, geyik, Avustralya-Amerika keseli sıçanı gibi birçok evcil ve yabani hayvanlarda ve insanlarda görülen kronik enfeksiyöz bir hastalıktır. *M. bovis*, özellikle ışık görmeyen nemli ortamların olduğu çevre şartlarında, 4-8 hafta boyunca 12-24 °C’de % 80 oranında canlılığını koruyabilmekte, enfekte olmuş işletmelerin bulunduğu topraktan ve çevreden etkenin izolasyonu yapılabilmektedir (Menzies ve Neill, 2000; O’Hagan ve ark., 2016 ).

Orta ve güney Avrupa ülkelerinde bTB enfeksiyonuna sebep olan başlıca etkenler *M. bovis* ve *M. caprae*’dir (Eisenberg ve ark., 2016). Sadece moleküler metotlarla *M. bovis* ve *M. caprae*’nin birbirinden ayırımı yapılmaktadır. *M. bovis* spp. *caprae* etkenini Türkiye’de ilk kez izole ve identifiye edildiği bildirilmiştir (Sayın, 2010). Ortaya çıkan veriler, bulaşmanın sıklığını veya yönünü çıkarmak çok zor olmasına rağmen moleküler tiplendirmeye aynı coğrafi bölgedeki sığırlar ve porsukların genellikle aynı suşlarla enfekte olduğunu göstermektedir (Brooks-Pollock ve Wood, 2015).

### 1.2.1. Epidemiyoloji

Enfekte olmuş sığırlar etkeni; sperma, dışkı idrar, süt, solunum ve vaginal sekresyonlarla saçabilmektedir. Enfeksiyonun bulaşında en etkin rol basilini içeren damlacıkların solunum yolu ile alınmasıdır (Chambers ve ark., 2001). Hayvanlar birbirleriyle iç içe bulunması enfektif aerosolların bulaşmasına olanak sağlarken, enfektif dozuda yüksek olur. Sığırların çevresel kontaminasyonu düşük dozda olduğu için enfekte olması gözardı edilebilir. Yapılan bir çalışmada, oral bulaşmada en az 107 basile ihtiyaç duyulmasına karşın, 1 basil içeren aerosolün 4–7 aylık buzağuları enfekte ettiği ortaya çıkmıştır (Humblet ve ark., 2009). Sığır akciğerini enfekte etmek için bir damlacık içinde taşınan tek 1 basil yeterli olmaktadır. Buzağular haricinde sindirim yolu ile bulaşın önemi yoktur. Bulaşma; kongenital, deri ve genital yollarla da olabilmektedir. Sığırlardan, bit ve pireler aracılığı ile kedi ve köpeklere deriden bulaşmalar olabilmektedir (Cousins, 2001; Menzies ve Neill, 2000). Bazı durumlarda, sığır TB'si nesli tükenmekte olan türler için ciddi bir tehdit olabilir. Sığırlar, bTB'nin ana rezervuarıdır ve dünya çapındaki eradikasyon programları öncelikle bu evcil türlere odaklanır (Mohamed, 2020).

Bir canlıda Tüberküloz enfeksiyonunun başlaması için üç önemli faktörün etkisine bağlıdır. Bunlar; bakterinin virülensi, konakçının sahip olduğu doğal bağışıklığın gücü ve enfektif bakterinin dozudur. Bu üç faktörün birlikte etkisi ile Tüberküloz basilleri alveoller makrofajlar tarafından öldürülür ise enfeksiyon oluşmamaktadır ancak etken makrofajların içinde üredikten sonra makrofaj inaktive olur ve enfeksiyon başlar (Sayın, 2010).

İnsanlarda Sığır Tüberkülozu, hayvanlardaki hastalık yükü ve hayvanlar ile insanlar arasındaki bulaşma riskleri ele alınmadan anlaşılabilir. Hastalığın birincil bulaşma şekli, türe göre ve ülkelerdeki hayvancılık uygulamalarına bağlı olarak değişmektedir. Pastörize edilmemiş süt tüketimi, insanlar için *M. bovis*'in en önemli bulaş kaynağıdır. Hasta hayvanlarla direkt temas edilmesi ve hasta hayvanların enfeksiyöz aerosolleri solunum ile ortaya vermesi sonucu insanların bu aerosolleri inhale etmesiyle bulaş gözlenmektedir. Hasta olan sığırlar tüm vücut sıvıları ile etkeni

bulaştırabilirler. Pastörize edilmemiş süt ürünleri tüketen veya *M. bovis* içeren az pişmiş et ürünlerini tüketen bireylerin yanı sıra enfekte sığırlarla yakın etkileşime giren kişilerde de Zoonotik Tüberküloza yakalanma riski daha yüksektir (Cadmus ve ark., 2019; Oruene ve Ndukwe, 2020).

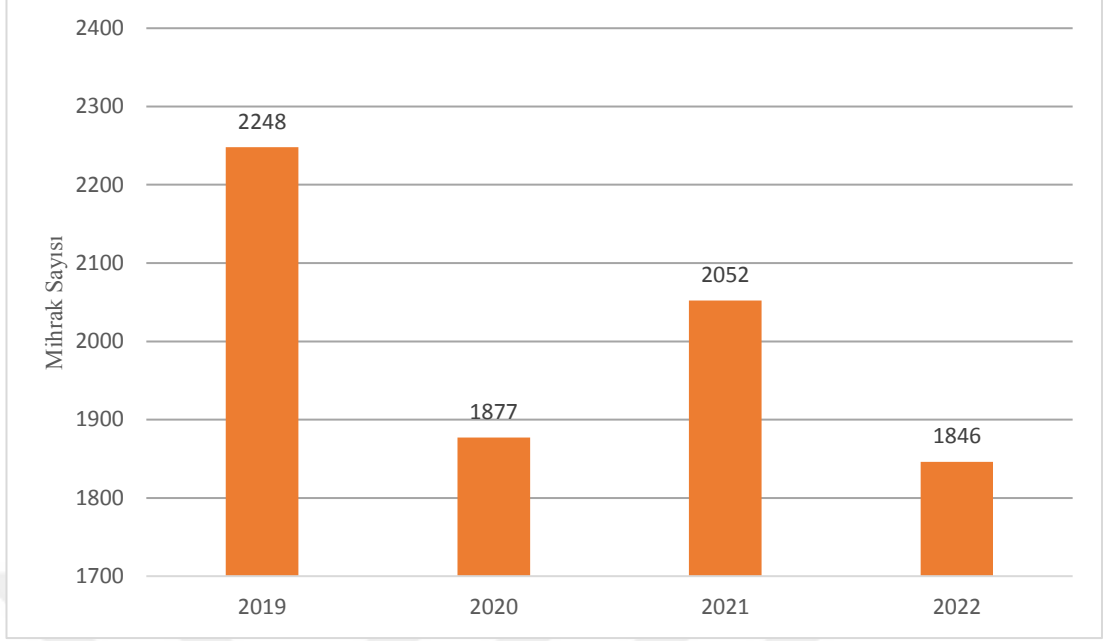
İnsanlarda Tüberküloz (TB) enfeksiyonuna sebep olan *M. bovis* ve *M. tuberculosis* klinik olarak birbirinden ayırt edilememektedir. Bu yüzden *M. bovis*'in insidansı bilinmemekte ve hastalıkla mücadele edilememektedir. *M. bovis*'in bazı suşlarında çoklu antibiyotik direncinin ortaya çıkması, immun yetmezliği olan bireylerde izole edilmesi ve *Human Immunodeficiency Virüsü* (HIV) ile ko-enfeksiyon oluşturması sebebi ile dikkate alınması ve uygun tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir (Aslan ve ark., 2009). *M. tuberculosis*'in aksine, *M. bovis* gelişmekte olan ülkelerde çok fazla zoonoz özelliğe sahip bakteri olduğu ve insanlarda dahil olmak üzere alışılmadık derecede geniş bir konakçı aralığını içerdiği, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından bildirilmiştir. Ayrıca *M. bovis* BCG aşısının atası olup, tek lisanlı aşıdır ve çocuklarda Tüberkülozun yayılmasına karşı korumada altın standarttır (Lulu ve Hussien, 2022).

Tüm dünyada, Tüberküloza karşı tedavi ve kontrol önlemleri alındığı halde bulaşıcı ve ölümcül olmaya devam etmektedir. Her yıl dünyada yaklaşık üç milyon kişi Tüberkülozdan hayatını kaybetmektedir. Hastalık, solunum yolu ile bulaşması nedeniyle toplumda her üç kişiden birinin Tüberküloz etkenleri ile enfekte olduğu bilinmektedir (Karadeli, 2016). Sığır Tüberküloz enfeksiyonunun insanlardaki etkisi konusunda küresel farkındalık, HIV-AIDS'in yayılmasıyla artmıştır. HIV-AIDS hastalarında Sığır Tüberkülozu görülme sıklığı daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır. Bu farkındalığa rağmen Sığır Tüberkülozunun insanlarda görülen Tüberküloz enfeksiyonuna küresel olarak ne oranda katkı yaptığı tam olarak bilinmemektedir ve yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Thoen ve ark., 2014). Sığır Tüberkülozu dünya çapında ihmal edilen sekiz zoonoz hastalıktan biri olarak tanımlanmış ve daha çok dikkate ihtiyaç duyulduğu görülmektedir (Ahir ve ark., 2016). Dünya çapında her yıl milyonlarca insan Tüberküloz enfeksiyonuna yakalandığı ve enfeksiyöz hastalık kaynaklı ölümler arasında ilk 10 ölüm sebeplerinden biri olduğu bildirilmiştir (WHO,

FAO, OIE, THE UNION, 2017; WHO, 2018). 2020 yılında 10,1 milyon insan Tüberküloz ile enfekte olduğu, 2021 yılında ise, % 4,5 artışla TB enfeksiyonuna yakalanan 10,6 milyon insan olduğu ve 1,4 milyon insanın öldüğü tahmin edilmektedir. Ayrıca TB etkenine karşı ilaç direncinin 2020 ve 2021 yıllarında arttığı gözlenmiştir, 2021 yılında 450 000 yeni TB vakasında rifampisine karşı ilaç direnci geliştiği ortaya çıkmıştır (WHO, 2022).

Ülkemizde, Sığır Tüberkülozu ile mücadele Tarım ve Orman Bakanlığı (TOB) tarafından Resmi Gazete’de yayınlanan 02.04.2009 tarih ve 27188 sayılı “Sığır Bovine Tüberkülozu Yönetmeliği” ve “Hayvan Hastalıkları ile Mücadele ve Hayvan Hareketleri Kontrolü Genelgesi” (her yıl yenilenir)’ne göre yürütülmektedir (Resmi Gazete, 2009; TOB Genelge, 2022). 2022 yılında yayınlanan bu genelgeye göre, kesimhanelerde kesim sırasında karkaslarda makroskopik olarak Tüberküloz lezyonları tespit edilen hayvanların ait olduğu işletmeler belirlenerek, işletmelerden sorumlu İl/İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğüne hastalık tespitinin bildirimi yapılır. Tüberküloz pozitif olarak belirlenen hayvanların bulunduğu işletmeler orjin işletme olarak kabul edilir ve bu işletmelerde bulunan tüm sığırlara tüberkülin deri testi yapılır. Tüberküloz enfeksiyonu çıkan işletmelere kordon uygulanır ve bu kordon süresi; enfekte olduğu tespit edilen işletmelere 2 ay ara ile tüberkülin deri testi yapılır ve enfekte işletmelerde bulunan tüm sığırlar son iki testte negatif sonuç vermişse kordon kaldırılır (TOB Genelge, 2022).

Türkiye’de Sığır Tüberkülozu konusunda bilimsel çalışmalar ve vaka bildirimleri yapılmasına rağmen bTB’nin insidansı ve prevalansı konusunda yeterli sayıda güncel araştırma ve kapsamlı bilgi sınırlı sayıdadır (Altun, 2023). Dünya Hayvan Sağlığı Bilgi Sistemi (OIE-WAHIS)’indeki raporlara bakılarak Türkiye’de 2019-2022 yılları arasına görülen Sığır Tüberkülozu mihrak sayıları grafiği Şekil 1.1’de gösterildi.



**Şekil 1. 1.** 2019-2022 yılları arasındaki Sığır Tüberkülozu mihrak sayıları (OIE-WAHIS, 2022).

OIE-WAHIS raporlarına göre Çizelge 1.1’de son dört yılda Türkiye’de Sığır Tüberkülozu enfeksiyonu tesbit edilen mihraklardaki duyarlı hayvan sayısı, tüberkülin deri testi sonucu bTB pozitif hayvan sayısı, ölen hayvan sayısı, tamamen itlaf edilen hayvan sayısı ve mezbahannede şartlı kesim yapılan hayvan sayısı sunuldu.

**Çizelge 1. 1.** Sığır Tüberkülozu enfeksiyonu tesbit edilen mihraklardaki hayvan sayısı (OIE-WAHIS, 2022).

Yıllar	Mihraklardaki duyarlı hayvan sayısı	Tüberkülin deri testi sonucu bTB pozitif hayvan sayısı	Ölen hayvan sayısı	Tamamen itlaf edilen hayvan sayısı	Mezbahannede şartlı kesim yapılan hayvan sayısı
2019	174276	16767	16	3211	13540
2020	145900	19741	15	4540	14916
2021	134965	18579	21	4200	14357
2022 (İlk altı ay)	62485	8217	11	1691	6515

### 1.2.2. Tanı

Sığır Tüberkülozunun hızlı tanısı erken epidemiyolojik ve terapötik girişimlere izin verdiği için dünya çapında hastalığın kontrolü için temel taşlardan biri olarak kabul edilir (Zahran ve ark., 2014). Güvenilir tanı metodları etkili bir hastalık kontrolü veya eradikasyon planının önemli bir parçasıdır. Günümüzde bTB'nin tanısında direkt mikroskopi, kültür, histopatoloji, Tüberkülin Deri Testi (TDT), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), Gama-İnterferon (IFN- $\gamma$ ), Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Floresan Antikor Tekniği (FAT), Komplement Fiksasyon Testi (KFT), Radio-Immuno Testi (RIA), Lenfosit Proliferasyon Testi (LPA), Restriction Endonükleaz Analizi, Dot-Blot, Kromatografi, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Faj tiplendirme, Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit - Variable Number Tandem Repeat (MIRU-VNTR) ve Spoligotiplendirme gibi testler kullanılmaktadır (Çakır, 2021). Hastalığın teşhisi esas olarak, enfeksiyon sonrası gelişen hücresel immün yanıtı ölçen testlere, kültür bazlı bakteriyolojik incelemeye ve moleküler bazlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemlerine bağlıdır (Smith ve ark., 2021; Thomas ve ark., 2021).

Klinik ve postmortem lezyonlarda MTBC türlerinin varlığı, bakteriyoskopi veya doku kesitlerinin incelenmesiyle gösterilebilir ve bakterinin izolasyonu besiyerine ekimi yapılarak doğrulanabilir. Karakteristik Tüberküloz lezyonları en sık akciğerde ve retrofarengeal, bronşiyal ve mediastinal lenf düğümlerinde görülür. Generalize ya da Miliyer Tüberküloz enfeksiyonunda akciğerler, karaciğer, böbrek, gastrointestinal ve merkezi sinir sistemi, dalak ve meme bezleri içerdiği çoklu organ sistemlerinde nodüler lezyonlar ortaya çıkabilir (Şekil 1.2) (OIE, 2022). Kesimhane sürveyansı, sürülerdeki enfeksiyonun tespit edilmesinde önemli bir araçtır ve birçok gelişmiş ülkeden bTB'nin eradike edilmesine katkıda bulunmuştur (Shittu ve ark., 2013).



**Şekil 1. 2.** Postmortem muayenede tespit edilen tüberküller (Çorum, Çankırı).

### **1.2.2.1. Bakteriyoskopi ve Kültür**

Sığır Tüberkülozunun teşhisinde bakteriyolojik yöntem olarak, Ziehl-Neelsen (ZN) boyama yöntemiyle asido-rezistans bakterilerin mikroskopta görülmesi ve etkenin kültürünün yapılmasıdır. ZN boyama yöntemi hızlı, maliyeti düşük ancak sensitivite oranı düşük bir tanı metodudur (Özbey ve ark., 2008). Boyamayla mikobakterilerin farklı türlerinin ayrımı yapılamamaktadır (Sayın, 2010). Mikroorganizmaların kültür edilmesindeki en önemli zorluk mikroorganizmanın üremesinin uzun zaman (6-8 hafta) alması ve Biyogüvenlik Seviyesi 3 (BSL 3)

laboratuvara ihtiyaç duyulması dezavantajlarıdır (Zahran ve ark., 2014). Birtakım dezavantajlara sahip olan bakteriyolojik kültür, hala TB tanısında altın standart metot olarak kabul edilmektedir (Çakır, 2021). Sığır Tüberkülozunun tanısında kültür, % 30- % 95 arasında etkenin varlığını teyit etmektedir. Mikrobiyolojik kültürün sensitivitesi (SE) % 78,1 iken spesifitesi (SP) % 99,1 olarak rapor edilmiştir. Bu rapora göre; kültürün bTB teşhisinde eksik olduğu, yüksek biyogüvenlik seviyesi laboratuvarına ihtiyaç duyması, zaman alıcı olması ve uzman personele ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (Corner ve ark. 2012; Courcoul ve ark., 2014). Etkenin ilk izolasyonu için katı veya sıvı ortama ekim yapılır. Stonebrink, Coletsos base veya Lowenstein-Jensen gibi farklı yumurta bazlı katı besi yerleri kullanılabilir. Middlebrook 7H11 ya da 7H10 gibi katı agar bazlı katı besiyerleri veya kan bazlı agar besiyerleri de kullanılabilir. Sıvı kültür sistemleri bazı laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmaktadır ve bu sistemlerde büyüme florometrik araçlarla ölçülür. Sıvı ortam, daha kısa bir büyüme süresi ve nispeten hızlı mikobakteriyel saptama sunar. Ancak dezavantajları, kontaminasyon oranının daha yüksek olması ve kolonilerin morfolojik özelliklerine göre ilk tanının yapılamamasıdır. Kültürler minimum 6 hafta, tercihen 10-12 hafta 37°C'de CO<sub>2</sub> ile veya CO<sub>2</sub> olmadan inkübe edilir. İnkübasyon periyodu ayrıca katı ve sıvı ortamın kullanımına bağlıdır. Katı besiyerleri kullanıldığında, inkübasyon süresi boyunca haftalık aralıklarla eğimler makroskopik büyüme açısından gözlemlenir. Gözle görülebilir büyüme olduğu zaman, sürme preparatlar hazırlanarak Ziehl-Neelsen boyama yöntemiyle mikroskopik olarak incelenir (OIE, 2022).

Karkasların kesim sonrası muayenesi ve dokulardan mikobakterilerin kültür edilmesi sahadaki teşhisi doğrulanmasını sağlamaktadır. Diğer taraftan, birçok hayvan deri testinde pozitif ancak lezyonlar kesim sırasında karkasda görünmez. Bazı hayvanlar postmortem lezyonlar gibi TB enfeksiyonunun fiziksel belirtilerini göstermesine rağmen deri testine yanıt vermez (Allen ve ark., 2010).

## 1.2.2.2. Hücresel Bağışıklığın Ölçülmesi

### 1.2.2.2.1. Tüberkülin Deri Testi (TDT)

Sığırlarda, çok kapsamlı lezyonlar gelişene kadar Tüberkülozun klinik kanıtı genellikle eksiktir. Bu nedenle, Koch tarafından 1890'da tüberkülin geliştirilmeden önce, tek tek hayvanların teşhisi, sürveyans ve eradikasyon programlarının oluşturulması mümkün değildi. Tüberküloz basilinin konsantre steril bir kültür filtratı olan tüberkülinin intradermal inokülasyonu, gecikmiş aşırı duyarlılık immün tepkisini ölçerek önceki maruziyeti veya aktif enfeksiyonu saptamanın dolaylı bir yoludur (OIE, 2022). Tüberkülin deri testinde Tüberküloz basil proteinleri, antijen olarak kullanılmaktadır. PPD tüberkülin (Prüfiye Protein Derivatı) , HSCM tüberkülinü (ısı ile konsantre edilmiş sentetik besiyeri) ve Old tüberkülininden oluşan üç farklı yapıda bulunmaktadır. Ancak PPD tüberkülin günümüzde kullanılmaktadır. Seibert ve Munday tarafından 1934 yılında protein izole etmişler ve bu protein, Tüberküloz basillerinin kültür filtratını çöktürerek elde edilmiştir ve düşük molekül ağırlıklı bu protein, amonyum sülfat kullanarak çöktürülüp PPD'yi ortaya çıkarmışlardır. İlk duyarlılaşma enfeksiyon geliştikten sonra bölgesel lenf nodüllerinde gelişen duyarlı T-lenfositleri, kan dolaşımında 6-9 haftada ortaya çıkmaktadır. İntradermal PPD enjeksiyonu ile bu duyarlılaşan lenfositlerin tekrar uyarılması neticesinde, aşırı duyarlılık reaksiyonu ortaya çıkar (Sayın, 2010).

Sığır Tüberkülozu tanısı için şu anda mevcut olan testlerin hiçbiri sığırlarda *M.bovis* enfeksiyonunun mükemmel bir şekilde belirlenmesine izin vermemektedir. TB ari sığır popülasyonlarında % 99,5 spesifiteye sahip olan TDT, birincil antemortem tanı aracı olarak kullanılmaktadır (Eisenberg ve ark., 2016). Sığır Tüberkülozu için en yaygın kullanılan tanı araçları *M. bovis*, *M. avium* antijenlerini kullanılarak konağın Gecikmiş Tip Aşırı Duyarlılık (DTH) reaksiyonunun ölçülmesine ve IFN- $\gamma$  üretimine dayanır (Bezos ve ark., 2014). Sığır Tüberkülozu esas olarak hücresel bağışıklığı ölçen, intradermal TDT ve IFN- $\gamma$  tanı testleri kullanılarak ve kesim politikasına dayanan resmi eradikasyon programına tabi tutulur. İntradermal TDT, OIE ve Avrupa

Komisyonu tarafından sığırlarda TB'nin tanısı için birincil tarama testi olarak kabul edilmektedir (Çakır, 2021).

Bovine Tüberkülozun teşhisinde standart metod olarak tüberkülin deri testi uygulanmaktadır. TDT, bTB tanısında indirekt metot olarak kullanılmakta ve sığırlar *M. bovis* etkeni ile temas ettikten sonraki 3-8 hafta arasında enfeksiyonun başlangıcında Tüberküloza yakalanmış hayvanları tesbit edebilir. Tüberküloz enfekte hayvanlarda, intradermal tüberkülin enjeksiyonunu içeren bu test uygulama alanında, uygulamadan iki ya da üç gün sonra şişlik ve sertleşme gösterirler (Good ve ark., 2018). Ancak bu testin sensitivite ve spesifite değerleri eksik olabilir (Carneiro ve ark., 2021; Duignan ve ark., 2019; Goodchild ve ark., 2015; Islam ve ark., 2020; Srinivasan ve ark., 2019; Xin ve ark., 2013). Üstelik bu test, uygulama esnasındaki zorluklar, sonuçların yorumlanması, işletmeye iki kez ziyaret etme zorunluluğu, düşük derecede standardizasyon, kusurlu test doğruluğu, yoğun emek ve zaman kaybı gibi birçok sınırlamalara sahiptir (Hashem ve ark., 2022).

#### **1.2.2.2.2. Gama İnterferon (IFN- $\gamma$ ) Testi**

TDT'nin birçok dezavantaja sahip olması, IFN- $\gamma$  testinin gelişmesine yol açtı ve çok fazla ülkede Sığır Tüberkülozu eradikasyon programlarında TDT ile birlikte kullanıldı (Öztürk ve ark., 2010b). IFN- $\gamma$ , *M. bovis* antijenleri tarafından uyarıldıktan sonra enfekte olan hayvanın T-lenfositleri tarafından üretilen bir sitokindir (Praud ve ark., 2015). Bu sitokin, yardımcı (helper) T-1 hücresinin (Th1) farklılaşmasında ve makrofaj aktivasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Stabel, 2006). IFN- $\gamma$  testi, 1980 yılından beri Avusturalya'da kullanılmaktadır ve 2000 yılından sonra Avrupa ülkelerinde de kullanılmaya başladı. Litaretürlere göre bu test, karşılaştırmalı intradermal tüberkülin testinden (CITT) daha yüksek bir sensitiviteye sahiptir ve onun kadar spesifiktir ancak bazı çalışmalarda, IFN- $\gamma$  testinin, CITT'e göre spesifitesi daha düşük bulunmuştur. IFN- $\gamma$  testi, deri testi ile aynı biyolojik prensibe sahiptir ancak bTB enfeksiyonunu daha erken safhada teşhis edebilir ve duyarsızlık olmaksızın deri testinden hemen sonra uygulanabilir. IFN- $\gamma$  testinin çalışma prensibi, enfekte hayvanın

kanını farklı antijenlere maruz bırakarak (Avian, Bovine PPD ve rekombinant antijenler) T-lenfositleri duyarlı hale getirip, hücrelerden IFN- $\gamma$  sitokini salgılamasını sağlamak ve sandviç ELISA'da monoklonal anti-bovine IFN- $\gamma$  antikorlar ile salınan interferon gama düzeyini ölçmektedir (Praud ve ark., 2015). Ayrıca bu test, insan IFN- $\gamma$  karşı üretilen monoklonal antikorlar kullanılarak İnsan Tüberkülozunun teşhisinde ve Sığırlarda Paratüberküloz hastalığının teşhisinde kullanılmış ve kullanım alanı genişletilmiştir (Fan ve ark., 2012; Mccallan ve ark., 2021).

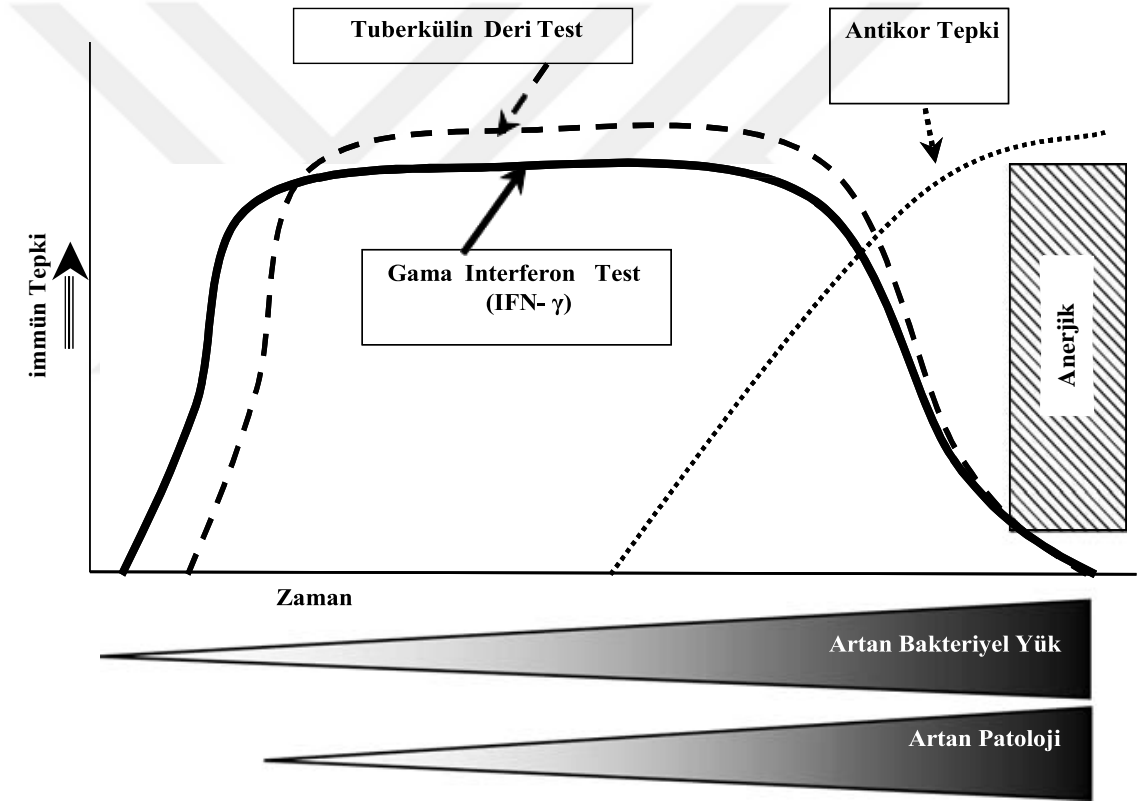
IFN- $\gamma$  testi, TDT ile birlikte paralel bir şekilde uygulanabilir. Her iki test birlikte uygulanır ise; enfekte hayvanlar diğer hayvanlara enfeksiyon kaynağı olmadan ve çevreyi kontamine etmeden önce, çok daha fazla sayıda enfekte hayvanın teşhisi yapılabilir. Bu test; Avrupa Birliği (EU) ülkeleri, Birleşik Krallık (UK), Amerika Birleşik Devletleri (USA), Yeni Zelanda ve Avusturaya'yı içeren çok sayıda ulusal programda kullanımı onaylanmıştır (OIE, 2022).

IFN- $\gamma$  testinin en büyük dezavantajı, onun maliyeti ve teknik kısıtlamaları: kan örnekleri hayvandan alınıp laboratuvarında kan kültürü yapılmaya kadar geçen sürenin 8-12 saati aşmaması gerekir ve 20-25 °C sıcaklığında laboratuvara ulaştırılması gereklidir (Gormley ve ark., 2004; Praud ve ark., 2015). Ayrıca bu test, uygulanan ürünün özelliklerine, uygulanan laboratuvara, üretim serisine ve uyarıcı antijen olarak kullanılan PPD'nin antijenik yapısına, değerlendirmede kullanılan altın standart testte göre; testin sensitivitesi % 73-100, spesifitesi ise; % 85-99,6 saptanmıştır (De La Rua-Domanech ve ark., 2006).

### **1.2.2.3. Humoral Bağışıklığın Ölçülmesi**

Sığır TB, kronik bir hastalıktır ve konağın bağışıklık tepkisi ağırlıklı olarak hücresel immun yanıtıdan (CMI) antikor temelli humoral bağışıklığa doğru geçiş yapar (Pollock and Neill, 2002; Ritacco ve ark., 1991; Vordermeier ve ark., 2004; Welsh ve ark., 2005). Bunu gösteren grafik Şekil 1.3.'de görülmektedir. Grafiğin sağ

tarafını temsil eden hayvanlar, enfeksiyon ileri ve generalize aşamasında olduğunu gösterir ancak CMI tepkisinin yetersizliği TDT'ye karşı immün yanıt oluşmamasına sebep olmaktadır. Bu kısımda olan hayvanlara anejik sığırlar denilmektedir ve bu hayvanlar ağır hasta olması muhtemeldir ve enfeksiyonun en yüksek bulaştırıcı seviyesindedirler. Bu hayvanlar sürü içinde hastalığın kalıcı olmasının sebeplerinden biri olabildiği gibi, sürüde çok ciddi ölümlere sebep olabilirler. Anejik sığırlar, ELISA gibi serolojik testler ile belirlenebilir. Bu tür testler, sığır TB'sini saptamak için en az yirmi yıldır geliştirilmektedir ancak serolojik testler, IFN- $\gamma$  testi ve deri testi ile karşılaştırdığımızda düşük sensitiviteye sahip olup, enfeksiyonun başlangıcında enfekte hayvanları saptamada yetersiz kalmaktadır (De La Rua-Domenech ve ark., 2006).



Şekil 1. 3. Konağın immün tepkisini gösteren grafik (De La Rua-Domenech ve ark., 2006).

Serolojik testler, hücresel bağışıklığı ölçen testlere yardımcı teşhis olarak kullanılması ile çok daha fazla enfekte hayvanın belirlenmesini sağlar ayrıca bu testler, evcil ve yaban hayattaki hayvanlarda bulunan Tüberküloz enfeksiyonunu kontrol etmeye yardımcı olur (OIE, 2022).

#### 1.2.2.4. Moleküler Metotlar

Tür tayini ve izolasyon, hastalığın kontrolünde çok önemlidir ancak sığıır popülasyonunda bulunan mikobakteri türlerinin virulans faktörleri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (Lulu ve Hussen, 2022). Real-Time PZR ölçümleri, taze sığıır doku örneklerinde yüksek sensitivite ve spesifite tahminleriyle MTBC'yi direkt olarak belirlemiştir. Ayrıca PZR ile 24-48 saat arasında doğrulayıcı sonuçlara ulaşılabilir ve DNA'nın canlılığına bakılmaksızın çok küçük miktardaki DNA'ları belirleyebilir (Sanchez-Carvajal ve ark., 2021).

MTBC üyelerinin moleküler tiplendirilmesi için MIRU-VNTR analizi uluslararası standart tekniktir (Rodriguez-Campos ve ark., 2012). PZR temelli karakterizasyon teknikleri olan MIRU-VNTR tiplendirme ve Spoligotiplendirme daha hızlı, daha basit ve daha uygun maliyetli olmak üzere çeşitli avantajlarından dolayı kullanılmaktadır (Medeiros ve ark., 2010). Spoligotiplendirme, RFLP(IS6110) ve MIRU-VNTR suş tiplerini tanımlamak için paralel olarak kullanılmaktadır (Humblet ve ark., 2010).

### 1.3. Sığıır Paratüberküloz Enfeksiyonu

Sığıır Paratüberkülozu (PTB) veya Johne's Disease, dünya çapında evcil ve yabani ruminantları etkileyen, *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (*Map*) etkeninin sebep olduğu bir hastalıktır. PTB, dünyanın birçok bölgesinde endemik olarak görülen, hayvancılık ve ilgili endüstrilerde önemli ekonomik kayıplara neden olan, kronik ilerleyici granülomatöz bir enteritis ile karakterize, oldukça bulaşıcı bir hastalıktır (Moyano ve ark., 2021). *Map* enfeksiyonu, tedaviye cevap vermeyen kronik bir diyare göstermesi enfeksiyonun spesifik klinik belirtisidir (Cruz-Estupinan ve ark., 2022). Günümüzde inaktive edilmiş suşlardan elde edilen ticari aşılar mevcuttur. Bu aşılar dışkı yoluyla mikobakteri atılımını ve sığıırlarda görülen klinik septom oranının azalmasında etkilidir ancak aşılar *Map* enfeksiyonu oluşumunu engellemede başarısızdırlar ve Sığıır Tüberkülozunun teşhisine müdahale

edebilmektedir (Groenendaal ve ark., 2015; Phanse ve ark., 2020; Shippy ve ark., 2017). Almanya'nın Oldenburg bölgesinde 1895 yılında ilk kez tespit edilen PTB, sığır, keçi, koyun gibi evcil ruminantlar ile geyik, lama gibi vahşi ruminantlarda *Map* enfeksiyonu görülebilmektedir. Hastalık, ruminantlar haricinde; tilkiler, gelincik ve tavşanlarda da ortaya çıkmıştır. *Map*, pastörizasyona, asitliğe ve dış ortama karşı dirençli olan iki ana genotipe sahiptir. Tip I diğer bir ifadeyle S-tipi genellikle keçi ve koyunları enfekte ederken, tip II yani C-tipi sığırları enfekte etmektedir (Günaydın ve Güven Gökmen, 2021).

Ruminantlarda enfeksiyon erken, subklinik ve klinik dönemi içeren farklı evrelerden oluştuğu erken veya subklinik evrede klinik bulgu görülmediği ancak subklinik dönemin sonu ile klinik dönemde devam eden halsizlik, kas kaybı, ishal, süt veriminde düşüş gibi belirtiler ortaya çıkar (Eamens ve ark., 2015; Whittington ve ark., 2017). Paratüberkülozda klinik bulgular, çok yavaş ilerleyen zayıflık ve başlangıçta aralıklı olan diyare enfeksiyon ilerledikçe sürekli hale gelmesidir (OIE, 2021).

Paratüberküloz enfeksiyonu sürecinde ilk lezyonlar, ince bağırsak duvarında ve mezenterik lenf düğümlerinde görülür ve enfeksiyon ilerledikçe ileum, jejunum, çekum, kolon ve mezenterik lenf düğümlerinde daha büyük lezyonlar ortaya çıkar. *Map* etkeni, lezyonlarda mevcuttur ve enfeksiyon ilerledikçe tüm vücuda yayılır. Bağırsak lezyonları protein kaçağından sorumludur ve protein emilim bozukluğu sendromuna sebep olur ve bu yüzden kaslarda aşırı zayıflık ortaya çıkar. Klinik bulgular genellikle ilk olarak genç erişkinlerde görülür ancak bu hastalık 1-2 yaş üzerindeki herhangi bir yaştaki hayvanlarda da ortaya çıkabilir ve süt sığırlarında sıklıkla 3-5 yaş aralığındaki hayvanlarda görülmektedir (OIE, 2021).

### **1.3.1. Epidemiyoloji**

Paratüberküloz, kompleks bir epidemiyolojiye sahiptir ve şu rapor edilmiştir; erken yaşlarda enfekte olan hayvanlarda enfeksiyonun başlangıcından birkaç yıla kadar klinik belirtiler gelişmez (Nielsen ve Toft, 2008). *Map* enfeksiyonunun

karakteristik klinik belirtisi tedaviye cevap vermeyen kronik diyaredir ve bu da aşırı zayıflamaya neden olur, sonunda mezbahane kesimi ya da ölümlerle sonuçlanır (Sweeney, 2011).

*Map* etkeni, subklinik evrede süt ve dışkı ile duyarlı hayvanlara bulaşması oldukça önemlidir (Moghadam ve ark., 2010). Hastalığın primer kaynağı; klinik olarak hasta ve asemptomatik hayvanlardır. En yaygın enfeksiyon yolu, kontamine süt, kolostrum veya dışkının yutulmasıdır (Gilaroni ve ark., 2012; Lievaart-peterson ve ark., 2019). *Map*'ın girişine intestinal M hücreleri aracılık eder ve tercihen ileum peyer plaklarında baskın olarak bulunan konakçı makrofajların fagozomlarında veya erken endozomlarında bulunur (Moyano ve ark., 2021). Klinik belirtiler hastalığın ileri evrelerinde ortaya çıkması, hastalığın teşhisini zorlaştıran bir durumdur ve bunun neticesinde patojen etkenin yayılımı kolaylaşır (Van den esker ve Koets, 2019). *Map* özellikle sığırlarda kronik granülomatöz enterite neden olmasına rağmen, ayrıca keçi, koyun ve geyik gibi diğer konakçıları da etkileyebilir (Fecteau, 2018). PTB'ye bağlı ekonomik kayıpların sebepleri; ölümler, hayvanların erken eliminasyonu, diğer bulaşıcı hastalıklara karşı artan duyarlılık, süt, et ve üreme verimindeki azalmalardır (Barratt ve ark., 2018; Camanes ve ark., 2018; Garcia ve Shalloo, 2015).

OIE tarafından PTB'nin hayvan ticareti için endişe verici bir hastalık olarak listelenmiş olup, bu hastalığın tüm yaştaki hayvanları etkilediği ve farklı klinik safhalar gösterdiği bildirilmiştir (Elmagzoub ve ark., 2020). PTB'nin subklinik dönemi uzun bir inkübasyon süresidir. Bu dönemde, klinik olarak herhangi bir belirti hayvanlarda görünmemesine rağmen *Map*'ı dışkı, süt, kolostrum yoluyla devamlı bulunduğu çevreye saçılım yapmaktadır. Bu dönemde hastalık önemli ekonomik kayıpların olduğu ve özellikle bu dönemde hastalığın yayılmasını engellemek önem arz etmektedir (Antognoli ve ark., 2007; Yıldırım ve Civelek, 2013).

*Map* etkeni, insanlarda Crohn hastalığıyla ilişkili olduğu ve bu hastalık kronik bağırsak depresyonuyla karakterize otoimmün bir hastalık olması sebebiyle PTB'nin zoonoz karakterde bir hastalık olduğu öne sürülüyor ancak etken insan patojeni olarak tamamen kabul edilmemektedir, yani Ruminant Paratüberkülozu zoonoz bir hastalık

olarak tanımlanmamaktadır (Garcia ve Shalloo, 2015; Garvey, 2018). Son zamanlarda *Map*; sarkoidoz, Blau sendromu, tip 1 diyabet, Hashimoto tiroiditi ve multiple skleroz gibi diğer hastalıklarlada ilişkilendirilmiştir (Dow, 2012; Frau ve ark., 2013; Recht ve ark., 2020; Scanu ve ark., 2007; Sechi ve Dow, 2015; Sisto ve ark., 2010; Waddell ve ark., 2015). *Map*'ın insanlara geçiş yolu olarak insan tüketiminde kullanılan kontamine olmuş süt ve et ürünleri, bebek maması ve su gibi gıdalar olduğu ve *Map*'ın yüksek sıcaklık ve kısa zamanlı pastörizasyona dirençli olduğu görülmüştür (Fechner ve ark., 2019; Gerrard ve ark., 2018; Mazzone ve ark., 2018).

Enfeksiyonun başlangıcından ilk birkaç hafta içinde, *Map* ince bağırsak duvarında çoğalmaya başlar ve hayvanlardaki doğal dirence bağlı olarak; enfeksiyon ortadan kaldırılır ya da hayvanlar enfekte olarak sağlıklı taşıyıcı olabilir. Bu hayvanlar arasındaki oran bilinmemektedir. Taşıyıcı hayvanlarda *Map*'ın çoğalma evresinden sonra lezyonlar geniş alanlara yayılır, bağırsak metabolizması bozarak hastalığın klinik belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olur. Subklinik taşıyıcılar, dışkıları içinde *Map*'ı çok fazla atarlar. Çoğu durumda, klinik belirtiler ortaya çıktıkça daha fazla sayıda organizma atılır (OIE, 2021). Hastalığın klinik süreci; aralıklı ishal, ilerleyen kilo kaybı, iştahsızlık ve ölüm ile sonuçlanır (Fecteau, 2018; Stabel ve ark., 2007). Enfeksiyonun ilerlemesi, doğal ve hücresele bağışıklığın sınırlama etkisi, konakçının genetik yapısına ve çevresel faktörlere bağlıdır. Bu yüzden PTB, şartlı bir hastalık olarak tanımlanabilir (Koets ve ark., 2015; Koets ve Gröhn, 2015).

*Map* nemli ve gölgeli toprakta 55 hafta, suda ve dışkıda çok uzun süre canlılığını koruyabilmektedir. Enfeksiyonun yayılımına sebep olan bulaş yollarından en sık görüleni kontamine çevreden etkenin sindirim sistemine geçiştir. Etken plasental yolla yavruya geçerek enfeksiyon oluşturabilmektedir. Ayrıca enfeksiyonun önemli bulaş yollarından biri de, dışkının gübre olarak kullanılarak arazileri kontamine etmesidir. Etken tükürük ve semen de izole edilmesine rağmen bulaş oranı bilinmemektedir. Enfekte hayvanın sütünün ya da dışkı ile kontamine olan sütün buzağılar tarafından tüketilmesi etkenin yayılmasında önemli bir bulaş yoludur (Mcaloon ve ark., 2019). Bulaş riski çok yüksek olan buzağuların altı aylığa kadar enfekte olma riski çok yüksektir, daha sonra yaş ilerledikçe bulaş riski düşmektedir

(Rathnarah ve ark., 2017). Etkenin yayılımı daha çok meme başı, kolostrum ve süt aracılığıyla olmaktadır (Yıldırım ve Civelek, 2013). Bu yüzden subklinik evrede Paratüberküloz enfeksiyonunun seroprevalansının belirlenmesi sürü sağlığı ve yönetimi için önem arz etmektedir (Nielsen ve Troft, 2009; Öztürk ve ark., 2010a). Subklinik enfekte hayvanlar hiçbir klinik belirti göstermezken, mastitis ya da infertilite gibi olgulardan etkilenebilirler. Süt verimi azalır ancak normal sınırlar içinden hayati belirtiler gösterirler. Hastalığın ilerlemiş halinde, aşırı zayıflık en açık görülen anormalliktir ve sıklıkla buna intermandibular ödem eşlik eder, bu ödem diyare geliştikten sonra ortadan kaybolma eğilimindedir (Pourmahdi Borujeni ve ark., 2021).

Hastalık dünya çapında çok ciddi ekonomik kayıplara sebep olmaktadır; Amerika da 198 milyon , Almanya da 75 milyon dolar, Fransa da 56 milyon dolar, Yeni Zellanda da 54 milyon dolar, Canada da 17-28 milyon dolar yıllık ekonomik kayıp oluşturmaktadır (Rasmussen ve ark., 2021). Global manzarada Paratüberkülozun kıtalar ve ülkelerde yayılımı ve prevalansı dikkate alındığında Avrupa'da sürüprevalansının % 0-68 aralığında tespit edilirken, seroprevalansın ise; % 0-24 arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir (Agrawal ve ark., 2021). Türkiye'de Paratüberküloz hastalığının prevalansı Doğu Anadolu, Ege ve İç Anadolu illerinde, Trakya ve Karadeniz bölgelerinde % 0-41,6 arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir (Berberoğlu ve Civelek, 2016; Karakaş, 2017; Makav ve Gökçe, 2013; Tütüncü ve ark., 2018).

### **1.3.2. Tanı**

Paratüberkülozun tanısında kullanılan yöntemler, direkt ve indirekt olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Direkt tanı yöntemleri; histopatoloji, nekropsi kültür, bakteriyoskopi ve PZR'den oluşurken, indirekt tanı yöntemleri ise; hücresel (TDT ve IFN- $\gamma$ ) ve humoral (ELISA) immun tepkiyi ölçen testlerden oluşmaktadır (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2021; Şababoğlu, 2019). Hayvanlarda PTB enfeksiyonunu tespit etmekte kullanılan tanı testleri pek tatmin edici olmasa da; sürveyans ve prevalans

oranlarını, popülasyonda düşük enfeksiyon riski oluşturma, eradikasyon, hasta hayvanlarda ekonomik kaybı düşürme, klinik hastalığın konfirmasyonu gibi belirli amaçlara yönelik kullanılırsa fayda sağlayabilir (Günaydın ve Güven Gökmen, 2021; OIE, 2021).

Henüz hiçbir ülke enfeksiyonu ortadan kaldıramadığı ve PTB'yi eradikasyon planları konusunda uluslararası bir anlaşma olmadığı için, birkaç yeni kontrol programının etkinliği henüz kanıtlanmamıştır (Corneli ve ark., 2021). PTB'yi kontrol altında tutmak için birkaç ülke, PTB ile enfekte olmuş hayvanların ayrılmasından veya ortadan kaldırılmasından oluşan sürü yönetim programlarını temel strateji olarak uygulamaktadır (Mcaloon ve ark., 2019). Ancak PTB kontrol programlarının başarısı kullanılan tanı testlerinin performansına bağlıdır (Moyano ve ark., 2021).

*Map*'in tanısında hiçbir test %100 sensitivite ve spesifite göstermediği için, pozitif reaktörün sürüden uzaklaştırılması ile hastalığın kontrolü sağlanabilmektedir, bu da uzun yıllar boyunca altı aylık ya da yıllık tekrar eden testlerle pozitif reaktörlerin sürüden elimine edilmesi ile sağlanır. Serolojik testlerle ya da dışkı ile etken atılımı yapan hayvanları belirleyen testlerle, özellikle yeni doğum yapmış ve dışkı ile atılım yapan sığırın buzağısının uzaklaştırılması hastalığın kontrolünde önem arz etmektedir (OIE, 2021). Enfekte hayvanların çoğu, belirlenemeyen *Map* taşıyıcısı olarak kalır çünkü onlar klinik belirti göstermezler, mikrobiyolojik ve immünolojik tanı testleri onları tanımlamaya yeterli sensitiviteye sahip değildir. Bunun sonucunda *Map*'a karşı doğal direnç oluşabilir ve enfeksiyonda klinik belirtiler ortaya çıkmadan latent formu ile sınırlı kalır. Sığır PTB'sine karşı doğal direnç, genlerle ilişkili olan belirli immün polimorfizmi ve kalıp tanıma reseptörleri ile oluştuğunu gösteren çok fazla kanıt vardır. İki kohort holstein sığır ırkının (Amerika ve İtalya) genom çapında ilişkilendirme çalışmalarının meta-analizi bu veriyi desteklemektedir. Ancak *Map* tekrar reaktivasyon olur ya da konakçının immün sistemi zayıflarsa, lezyonları fokal formda tutmaya çalışan direnç, diffuse form geçer böylelikle ölümle sonuçlanan klinik enfeksiyon ortaya çıkar (Vazquez ve ark., 2013).

### **1.3.2.1. Direkt Tanı Yöntemleri**

#### **1.3.2.1.1. Nekropsi**

Paratüberkülozun, bağırsaklarda ortaya çıkan kalınlaşmaları yüzeysel inceleme ile teşhis edilemez. Bu nedenle, nekropside duodenum ile rektum arasındaki bağırsak mukozası ortaya çıkarılmalıdır. Klinik belirtiler ile bağırsak lezyonlarının boyutu arasında her zaman bir korelasyon yoktur. Nekropside, bağırsaklar ve daha çok bağırsağın ileum kısmının sonunun büyüyerek kıvrımlı hal alması, hastalığın patolojik belirtisidir. Ayrıca mezenteriyal lenf nodüllerinin ekseri ödemli olması ve büyümesinin yanı sıra lenf damarlarının şerit şeklinde kalınlaşma göstermesidir (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2021).

#### **1.3.2.1.2. Bakteriyoskopi**

Dışkı ya da bağırsak mukozasından hazırlanan preparatlar Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile boyanarak, mikroskopik olarak incelenir. Eğer ARB'ler kümeler halinde (en az üç ya da daha fazla) bulunursa, Paratüberkülozun olası tanısı olabilir. Bakteri kümeleri mevcut değilse ve tek bir bakteri görünürse hastalığın varlığından söz etmek mümkün değildir. Bu testin dezavantajı mikobakteri türleri arasında ayrımın yapılamaması ve tek bir dışkı örneğinin mikroskopik incelemesinde vakaların yalnızca küçük bir kısmının doğrulanabilir olmasıdır (OIE, 2021). ZN boyama yöntemi ile dışkı preparatların mikroskopik incelenmesinde hastalığın sensitivite ve spesifite değerleri düşüktür ve bu teşhis metodu klinik vakalarla sınırlıdır (Eamens ve ark., 2015). Dışkıdan direkt bakteriyoskopi ile tanı yöntemi ekonomik, hızlı ve kolay olması avantaj sağlarken, dışkıyla *Map* saçılımı hastalığın evrelerine bağlı olarak etkenin atılımında farklılıklar ortaya çıkması yani etkenin aralıklı ya da aralıksız atılım olması tanıya yanlış sonuçlara yol açacaktır (Gilardoni ve ark., 2012; Nielsen ve Toft, 2008).

### 1.3.2.1.3. Bakteriyolojik Kùltür

Hayvanlardan *Map*'in izolasyonu, enfekte olmuş hayvanların kesin teşhisini sağlar. Bakteriyolojik kùltür, yanlış pozitif sonuç vermeyen yani spesifitesi % 100 olan tek tanı metodu olmasının yanında zor ve zaman alıcıdır ve etkenin kontamine olmuş çevre vasıtasıyla enfekte olmayan hayvanlara potansiyel geçiş olgusu nedeniyle yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir. Canlı hayvanların Paratüberküloz teşhisinde dışkı kùltürü altın standart metot olarak kullanılsa da etkenin saçılımının düzensiz olması, spesifik besiyeri ihtiyacı, kontaminasyon riski ve inkübasyon süresinin uzun olması gibi dezavantajlara sahiptir. Ayrıca hastalığın ilerlemiş safhasında olan çoğu hayvanın teşhisi yapılabilir ancak enfeksiyonun erken döneminde sadece birkaç hayvana enfeksiyon tanısı konulabilir (Begg ve Whittington, 2010; Borum ve ark., 2014; OIE, 2021). Klinik enfekte sığırlarda dışkı kùltürünün sensitivitesi yaklaşık % 70 iken, subklinik enfekte sığırlarda sensitivite sadece %23-29'dur (Kawaji ve ark., 2020).

### 1.3.2.1.4. Moleküler Teşhis

Son yıllarda, real-time PZR yöntemleri farklı örneklerden (kan, süt, dışkı, doku ve çevre örnekleri) *Map*'i saptamak için kapsamlı bir şekilde geliştirilmiştir. Moleküler teşhis metotları hızlıdır ve *Map* gibi zor üreyen ve yavaş büyüyen mikroorganizmaların tespiti kolaylaştırmıştır ancak bu teşhis metotları bakterilerin nükleik asit miktarı ve kalitesinden büyük ölçüde etkilenir. Bu yüzden, istenilen sonuca ulaşmak için DNA'nın ekstraksiyon aşamasında yüksek kaliteli bir DNA örneği ve maksimum sayıda bakteriyel DNA elde etmek gerekir (Chaubey ve ark., 2016; OIE, 2021).

### 1.3.2.2. İndirekt Tanı Yöntemleri

#### 1.3.2.2.1. Hücresel İmmun Yanıtı Ölçen Testler

PTB enfeksiyonunun başlangıç safhasında CMI belirlenebilir ve subklinik enfekte hayvanda CMI aynı kalır ancak hastalık ilerledikçe ve klinik belirtiler ortaya çıktıkça CMI zayıflar ya da olmayabilir. Serum antikorları CMI'den sonra saptanabilir ve ayrıca enfeksiyonu atlatmış hayvanlarda da bulunabilir. Serum antikorlarının kalıcılığı daha fazladır ve lezyonlar vücuda yayıldıkça daha yüksek titrede bulunur yani vücutta antijen miktarının yansımaları göstermiştir (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2021). Periferik kan mononükleer hücrelerinden, DTH deri testi ile bu hücrelere özgü antijenlerle uyarma neticesinde salgılanan IFN- $\gamma$  ve salgılanan bu IFN- $\gamma$ 'nin seviyesini ölçen IFN- $\gamma$  testinin genellikle kullanıldığı belirtilmiştir (Nielsen, 2010; Stevenson, 2010). Minimal düzeyde enfekte olan hayvanlar sıklıkla serolojik testlerde tepki vermezler, ancak CMI'yi ölçen testlere olumlu tepki verebilmektedir. Enfekte popülasyonlarda antikor testlerine kıyasla CMI testlerinde çok daha fazla sayıda hayvanın tepki vermesi beklenir, çünkü CMI maruziyetin göstergesi olarak, antikorlar enfeksiyonun ilerlemesini göstermektedir (OIE, 2021).

##### 1.3.2.2.1.1. Gecikmiş Tip Aşırı Duyarlılık (DTH) Testi

DTH için deri testi, CMI'nin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. DTH'yi ortaya çıkaran PPD avian ve johnin deri testleri birbirine yakın sensitivite ve spesifite değeri gösterdiği için birinin yerine diğerinin kullanılabilmesi ifade edilmiştir. Deri kalınlığı, intradermal 0,1 ml PPD antijen ile inokülasyonundan 72 saat sonra ve inokülasyon yapılmadan önce ölçülmesi ve inokülasyon yerindeki deri kalınlaşmasının 2 mm geçmiş olması halinde enfeksiyonun varlığı söz konusu olduğu için hayvan pozitif kabul edilmiştir. Ancak deri testi sonuçlarının yorumlanması, yorumlama kriterleri ile ilgili anlaşma olmaması nedeniyle karmaşıktır. Sığır PTB teşhisi yapmak için johnin PPD kullanılan bir çalışmada, deri kalınlığı eşik değeri  $\geq 2$  mm büyük ise spesifitesi % 88,8, eşik değerleri;  $\geq 3$ ,  $\geq 4$  olarak değerlendirildiğinde ise; sırasıyla spesifite

değerleri % 91,3 ve % 93,5 bulunmuştur. Bu eşik değerlerinin sensitivite üzerindeki etkisi belirlenememiştir. Deri testinin değerini artırmak için daha fazla araştırma gereklidir (OIE, 2021).

#### **1.3.2.2.1.2. Gama İnterferon (IFN- $\gamma$ ) Testi**

Doğal ya da deneysel enfekte hayvanlarda, özellikle enfeksiyonun erken ya da subklinik döneminde etkin olan IFN- $\gamma$ 'nın yardımcı T lenfositler (Th1) yoluyla gelişen immun yanıtta anasitokin olduğu ifade edilmiştir (Stabel ve Robbe-Austerman, 2011). Sığırlarda Tüberküloz ve Paratüberkülozun tanısında hücresele immun yanıtı saptayan in-vitro analizlerden IFN- $\gamma$  seviyesini ölçen testler son zamanlarda kullanılmaya başlanmıştır. PTB tanısında IFN- $\gamma$  sitokininin üretimi en erken tespit edilebilen immun yanıtlardan biri olduğu için enfekte hayvanları subklinik dönemde belirleyen IFN- $\gamma$  testinin tanı yöntemleri arasında en iyi yöntem olduğu ifade edilmiştir (Nielsen, 2010; Vazquez ve ark., 2013). Kan plazmasının, spesifik antijenlerle (bovine PPD, avian PPD ya da johnin PPD) ile 18-36 saat uyarımı neticesinde duyarlı lenfositler tarafından üretilen IFN- $\gamma$  seviyesinin belirlenmesi IFN- $\gamma$  testinin ana unsurunu oluşturmaktadır (OIE, 2021). Literatürlere göre, testin spesifitesi % 67 ile % 94 arasında iken sensitivitesi ise; % 13 ile % 85 arasında değişkenlik gösterir. Bu değişkenlik PPD'nin miktarına ve türüne göre değişir ayrıca testler için benimsenen yorumlama kriterleri de büyük ölçüde etkilemektedir (Corneli ve ark., 2021; OIE, 2021).

PTB teşhisi için kullanılan IFN- $\gamma$  testi, sığır TB teşhisi için kullanılan ticari teşhis kiti ile aynıdır. Gerekli yöntem ve test malzemeleri, ticari kite eşlik eden talimatlarda tam olarak açıklanmıştır. Ancak bu test Paratüberküloz tanısı için üretici tarafından validasyonu yapılmamıştır. Bu yüzden elde edilen OD değerlerinin yorumlanması çok güçtür çünkü yorumlama kriterleri ve kan lenfositlerini uyarmak için kullanılan antijenlerin türleri ve miktarları konusunda bir anlaşma yoktur (OIE, 2021). IFN- $\gamma$  testinde, kan örnekleri avian PPD, bovine PPD ve nil (PBS) steril kontrol (PBS) antijenleri tarafından uyarıldıktan sonra yapılan sandviç ELISA

sonuçlarındaki optik dansite (OD) değerleri çeşitli kriterler kullanılarak hesaplanmıştır (Kalis ve ark., 2003). Bu kriterler arasında PPD avian-PBS  $> 0,05$  kriteri daha fazla sayıda subklinik enfekte hayvanı belirleyebildiği ifade edilmiştir (Jungersen ve ark., 2002). Avian PPD değerinin bovine PPD değerinden daha büyük çıkması ve PPD avian - PBS  $\geq 0,05$  olursa hayvanlar Paratüberküloz enfeksiyonu bakımından pozitif olarak belirlendiği sığırlar üzerinde yapılan bir çalışma ile ifade edilmiştir. Yine bu çalışmada IFN- $\gamma$  testi sonucu pozitif belirlenen çok fazla sığırın dışkısında *Map* etkeni belirlenemediği (%63,9) gibi önemli derecede doku tahribatının olmadığı (%86,1) tespit edildiğinden bu değerlendirme ölçütünün genç sığırlarda enfeksiyonun tanısında ve enfeksiyonun erken dönemlerinde tanı testi olarak kullanılabilceği ileri sürülmüştür (Vazquez ve ark., 2013).

#### **1.3.2.2.2. Humoral İmmun Yanıtı Ölçen Testler**

Serolojik test olarak PTB'nin sığırlarda teşhisinde yaygın bir şekilde ELISA kullanılmaktadır. ELISA'ya göre daha düşük sensitivite ve spesifite gösteren Agar Jel İmmunodifüzyon testi (AGID) ile Komplement Fiksasyon Testi (KFT) ve sığırlarda PTB'nin teşhisinde artık önerilmemektedir (OIE, 2021).

##### **1.3.2.2.2.1. Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

PTB enfeksiyonunun indirekt tanı metotlarından ELISA, sıklıkla kullanılmakta ve hastalığa sürveyans programı uygulayan ülkelerde, seroprevalansı belirlemek için temel teşhis metodu olarak kullanılmaktadır. ELISA'nın avantajı; ucuz maliyet, hızlı sonuç ve çok fazla alanda kullanılabilir olmasıdır (De Lacerda Roberto ve ark., 2021).

ELISA, mevcut testler arasında sığırlarda *Map*'a karşı oluşmuş antikorları belirleyen en yüksek sensitiviteye ve spesifiteye sahiptir. ELISA'nın sensitivitesi hastalığın klinik aşamasında KFT ile karşılaştırılabilir ancak subklinik enfekte taşıyıcı hayvanlarda sensitivitesi KFT'den daha yüksektir. ELISA'nın spesifitesi,

*Mycobacterium phlei* ile spesifik olmayan antikorların bağlanması ile artırıldı (OIE, 2021). Enfeksiyon ilerledikçe, vücuttaki antikor miktarı gittikçe artar ve ELISA ile kolaylıkla belirlenir ancak onlar herhangi bir koruyucu etkiye sahip değildir (Corneli ve ark., 2021).

Serolojik testler arasında özellikle ELISA, düşük maliyetli, kolay uygulanabilir ve hazır otomatikleştirilmiş ELISA reader okuyucular ile yüksek sayıda örnek test edebilir. *Map*'a karşı oluşan antikorları belirleyen ELISA, serum ve süt (bireysel ya da süt tanklarında) örneklerine uygulanabilir (Britton ve ark., 2016). ELISA'nın sensitivitesi hastalığın safhasına, dışkıda *Map*'in görülme sıklığına veya miktarına, hayvanların yaşına göre değişkenlik gösterir. Ayrıca ELISA, katı ortamda dışkı kültürü aracılığıyla *Map* ile enfekte olarak tanımlanan sığırlar (yaklaşık %30-40) ELISA'ya pozitiflik vermiştir (Moyano ve ark., 2021). ELISA'nın spesifitesi % 40 ile % 100 arasında değişmekte olup, bu değişim sayısız faktöre bağlıdır. Bu faktörler; testte kullanılan antijene, öncesinden maruz kalınan çevresel mikobakterilere, diğer mikobakterilerle oluşan ko-enfeksiyona ve Sığır Tüberkülozu teşhisinde kullanılan TDT'ye önceden kalınan maruziyet gibi faktörlerden oluşmaktadır (Blanco vazquez ve ark., 2020). ELISA, *Map* enfeksiyonunun sublinik aşamasında ve sonrasında süt ve serumdaki antikorları tespit etmek için yaygın ve uygun olarak kullanılan serolojik bir testtir (Garvey, 2018; Radostits ve ark., 2007).

Bu tez çalışmasında amaç, Sığır Tüberkülozunun antemortem tanısında kullanılan yöntemlerden faydalanarak, hayvanların Paratüberküloz enfeksiyonu yönünden enfekte olup olmadıklarını belirlemektir. Ayrıca Türkiye'de endemik olarak görülen Sığır Tüberküloz hastalığının antemortem tanı yöntemlerinin karşılaştırılıp, Gama İnterferon testinin sensitivite ve spesifite değerleri belirlenerek Sığır Tüberküloz hastalığının eradikasyon çalışmalarına katkı sağlayacak verilerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereç

#### 2.1.1. Örneklenen Hayvanlar

Yapılan bu çalışmada kullanılan örnekler için “Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu” onayına gerek bulunmadığına ilişkin “Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Raporu” Ek-1’de yer almaktadır.

Bu çalışma, Çankırı/Çerkeş, Çorum/Merkez, Ankara/Sincan, Eskişehir /Odunpazarı ve Konya/Ereğli ilçelerinde bulunan Tüberküloz şüpheli toplam 5 süt sığır işletmesinden bulunan 423 adet sığır üzerinde gerçekleştirildi. İlçelerde bulunan işletme sayıları ve hayvan sayıları Çizelge 2.1’de, sığırların yaş ve cinsiyet dağılımı ise; Çizelge 2.2’de sunuldu. Bu işletmelerde bulunan sığır ırkları; Simental, Holstein SA, Montofon, Charolis Melezi, Limousin Melezi, Simental Melezi, Holstein SA Melezi ve Montofon Melezinden oluşmaktadır.

**Çizelge 2. 1.** İllerdeki işletme sayıları ve hayvan sayıları.

İller	İşletme Sayısı	Hayvan Sayısı
Çankırı/Çerkeş	1	144
Çorum/Merkez	1	51
Ankara/Sincan	1	31
Eskişehir/Odunpazarı	1	47
Konya/Ereğli	1	150
Toplam	5	423

**Çizelge 2.2.** Çalışmada kullanılan sığırların yaş ve cinsiyet dağılımı.

Hayvan	Yaş (Yıl)						Cinsiyet	
	0-1	1	2	3	4	≥5	Erkek	Dişi
Sığır Sayısı	11	76	96	65	53	122	70	353
Toplam	423						423	

- **İşletme 1;** Çankırı/Çerkeş’de bulunan 144 sığırdan kan ve dışkı örnekleri alınarak, tüberkülin deri testi yapıldı.
- **İşletme 2;** Çorum’da bulunan 51 sığırdan kan ve dışkı örnekleri alınarak, tüberkülin deri testi yapıldı.
- **İşletme 3;** Ankara/Sincan’da bulunan 31 sığırdan kan ve dışkı örnekleri alınarak, tüberkülin deri testi yapıldı.
- **İşletme 4;** Eskişehir/Odunpazarı’nda bulunan 47 sığırdan kan ve dışkı örnekleri alınarak, tüberkülin deri testi yapıldı.
- **İşletme 5;** Konya/Ereğli’de bulunan 150 sığırdan kan ve dışkı örnekleri alınarak, tüberkülin deri testi yapıldı.

### 2.1.2. Kan ve Dışkı Örnekleri

Sığırlara Tüberkülin deri testi PPD avian ve PPD bovine uygulanmadan önce kuyruk bölgesinde bulunan *Vena coccygea*’dan gama interferon testi için her bir hayvandan Lithium heparin içeren (9 ml, Vacusera, İzmir, Türkiye) vakumlu tüplere 8 ml kan örneği alındı. Bu süreçte *Mycobacterium paratuberculosis* antikor testi için her bir hayvandan pıhtılaşma aktivatörü (9 ml, Vacusera, İzmir, Türkiye) içeren vakumlu tüplere 8 ml kan alındı. Lityum heparinli kan tüplerine alınan örnekler test zamanına kadar oda sıcaklığında (22 °C) muhafaza edilerek, 12 saat içerisinde kan kültürleri yapıldı. Pıhtılaşma aktivatörü barındıran kan tüplerine alınan örnekler 3000 rpm’de 5 dk. santrifüj (Hettich 32 R, Germany) yapıldı ve tüplerde serumlar ortaya çıktıktan sonra eppendorf tüplerine aktarılarak test zamanına kadar -20 C’de derin dondurucuda saklandı. Ayrıca dışkı örnekleri her hayvandan Paratüberküloz tanısı için alındı. Rektumdan taze dışkı örnekleri plastik eldiven ile alınarak steril plastik kaplara

aktarıldı (Şekil 2.1). Her sığırdan alınan bu dışkı örnekleri +4°C'de laboratuvara ulaştırıldı. Steril distile su kullanılarak taze dışkıdan direkt smear hazırlandı. Alevde kuruma sağlandıktan sonra ZN boyama yöntemi ile boyanan preparatlar mikroskopta 100x objektif kullanılarak (Nikon ECLİPSE Ci, Japon) incelendi (Borum ve ark., 2014; Paolicchi ve ark., 2003; Shahmoradi ve ark., 2008).



Şekil 2. 1. Hayvanlardan dışkı ve kan örneklerinin alınması (Eskişehir, Konya).

### 2.1.3. Ziehl-Neelsen (ZN) Boyama

ZN boyama yöntemi, Asido-Resistans bakterileri (ARB) belirleyebilmek için kullanıldı. Bu boyama yöntemi için ihtiyaç duyulan solüsyonlar aşağıda belirtildiği gibi oluşturuldu (Arda, 2006; Eamens ve ark., 2015).

- **Fenollü Karbol Fuksin**

Etanol (%95)	100 ml,
Bazik fuksin	3 gr,
Fenol	5 gr,
Distile su	100 ml kullanılarak iki çözelti hazırlandı.

İlk çözelti, bir havan içerisinde bazik fuksin konuldu ve üzerine az az alkol dökülerek bazik fuksin ezildi. Kristal formda bulunan fenol ısıtılarak (45–50 °C) erimesi sağlandı ve üstüne ilave edilen distile su ile homojen karışım elde edilerek çözelti 2 oluşturuldu. 10 ml çözelti 1'den, 1,90 ml çözelti 2'den belirtilen oranlarda karıştırılarak çalışma çözeltisi oluşturuldu ve koyu renkli kapaklı şişelere aktarılıp 24 saat bekletildi. Daha sonra hazırlanan bu çözelti filtre edildikten sonra kullanıma hazır hale geldi.

- **Asit-alkol (%3 w/v)**

Etanol (%95)	97 ml,
HCl (%37,5)	3 ml oranlarında karışım sağlanarak hazırlandı.

- **Metilen Mavisi**

Distile su	100 ml,
------------	---------

Metilen mavisi 0,3 gr bir havanda ezildikten sonra üzerine yavaş yavaş distile su dökülerek metilen mavisinin erimesi sağlandı. Çözelti filtre edildikten sonra koyu renkli ve kapaklı şişelere konuldu.

#### 2.1.4. Avian ve Bovine Tüberkulin (PPD)

Tarım ve Orman Bakanlığı bünyesinde bulunan Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsünde üretilen aktif protein miktarı ml de 1 mg Bovine (Bo) PPD ve Avian (Av) PPD tanı testlerinde kullanıldı (Şekil 2.2).



Şekil 2. 2. Avian ve Bovine PPD.

#### 2.1.5. Gama İnterferon (IFN- $\gamma$ ) Test Kiti

Paratüberküloz ve Tüberküloz enfeksiyonu sonucu ortaya çıkan hücresel immün yanıtı; IFN- $\gamma$  seviyesi oranındaki yükselme baz alınarak hastalıklara tanı koymak için ticari bir kit olan BOVIGAM (Prionics AG, Australia, Product ID: 63326, Lot No: 6332616101) kullanıldı. Testte kullanılan kitin malzemeleri; Anti IFN- $\gamma$  Antikorları ile Kaplı Mikropleyt (30x1), Sığır IFN- $\gamma$  Pozitif Kontrolü (3x2 ml), Sığır IFN- $\gamma$  Negatif Kontrolü (3x2 ml), Plazma Sulandırma Tamponu (*Green diluent*) (1x175 ml), Yıkama Solüsyonu (2x500 ml), Konjugat (2x2 ml), Konjugat Sulandırma Tamponu

(Blue diluent) (2x175 ml), Enzim Substrat Tamponu (2x175 ml), Kromojen Solüsyonu (2x2 ml) ve Enzim Durdurma Solüsyonundan (1x175 ml) oluşmaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2. 3. Gama İnterferon ELISA Kiti.

### 2.1.5.1. IFN- $\gamma$ uyarıcı antijen

- 1) **Bovine Tuberculin PPD (3000):** Son konsantrasyonu 300 IU/ml. (BOVIGAM, Prionics AG, Spain, Lot:102697BGA)
- 2) **Avian Tuberculin PPD (2500):** Son konsantrasyonu 250 IU/ml.(BOVIGAM, Prionics AG, Spain, Lot:102698BGA),
- 3) **Fosfat Buffer Solüsyonu (PBS):** Negatif uyarıcı (Nil kontrol) antijen olarak kullanıldı. Ayrıca PPD antijenlerinin (Bovine ve Avian) sulandırılması yapılırken kullanıldı. PBS ; 8,5 g NaCl, 0,32 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 1000 ml distile sudan oluşmaktadır. Bu solüsyon pH 7,2'ye sabitlendi ve 121 °C'de 20 dk. otoklav ile sterilizasyonu yapıldı.

### 2.1.6. *Mycobacterium paratuberculosis* Antikor Test Kiti

Paratüberküloz enfeksiyonunda ortaya çıkan antikorları tespit etmek için yapılan ELISA’da ticari kit (IDEXX, France, LOT SN 20063) kullanıldı. Bu kit; Mikropleyt, Pozitif ve Negatif Kontrol Serumları (1 x 0,5 ml), Konsantre Konjugat (1 x 0,75 ml), Sulandırma Buffer N.12 (1 x 100 ml), Sulandırma Buffer N.1 (1 x 120 ml), TMB Substrate N.9 (1 x 60 ml), Stop Solüsyonu N.3 (1 x 120 ml) ve Yıkama Solüsyonundan (1 x 100 ml) oluşmaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2. 4. *Mycobacterium paratuberculosis* Antikör ELISA Kiti.

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Tüberküloz Enfeksiyonu Antemortem Tanı Yöntemleri

#### 2.2.1.1. Tüberkülin (PPD) Deri Testi (TDT)

Sığırlara CITT uygulandı ve sonuçları değerlendirildi. Bu uygulama ve sonuçların değerlendirilmesi OIE, TOB'un Sığır Bovine Tüberküloz Yönetmeliği'ne göre yapıldı (OIE, 2022; Resmi Gazete, 2009). PPD deri testi boynun orta üçte birlik kısmında 0,1 ml dozunda üstte avian PPD ve altta bovine PPD olmak üzere ve iki enjeksiyon arası uzaklık 12-13 cm uzaklıkta olacak şekilde intradermal enjeksiyon yapıldı. Bu iki bölge enjeksiyon yapılmadan önce kıllar traş edildi ve deri kalınlığı kumpasla ölçülerek kayıt tutuldu. Enjeksiyon bölgesinde bezelye büyüklüğünde bir şişlik olması, enjeksiyonun intradermal yapıldığının göstergesiydi ve enjeksiyon yapılan her iki bölge 72 saat sonra deri kalınlığı tekrar kumpasla ölçülerek kayıt altına alındı (Şekil 2.5).

##### 2.2.1.1.1. PPD Reaksiyonlarının Değerlendirilmesi

Reaksiyonlar, PPD intradermal enjeksiyonlarının uygulamasından 72 saat sonra enjeksiyon yapılan bölgelerin deri kıvrımı kalınlığındaki artış miktarı ve klinik belirtilere bakılarak değerlendirilir. Değerlendirme neticesinde;

**a) Negatif sonuç (-):** Enjeksiyon yapılan bölgedeki deri kıvrımı kalınlığının ölçümü yapıldığından 2 mm geçmiyor ve lenf kanalları ya da lenf yumrularının yangısı oluşmamış, bölgede sınırlı bir şişkinlik, eksüdasyon, nekroz, yaygın ya da diffüz ödem, ağrı yoksa negatif reaksiyon olarak değerlendirilir.

**b) Şüpheli sonuç (±):** Enjeksiyon yapılan bölgedeki deri kıvrımı kalınlığının ölçümü yapıldığından 2 mm ile 4 mm arasında olması ve lenf kanalları ya da lenf yumrularının yangısı oluşmamış, eksüdasyon, nekroz, yaygın ya da diffüz ödem, ağrı yoksa şüpheli reaksiyon olarak değerlendirilir.

c) **Pozitif sonuç (+)** : Enjeksiyon yapılan bölgedeki deri kıvrımının kalınlığının ölçümü yapıldığından 4 mm ya da 4 mm'den daha fazla olması ve lenf kanalları ya da lenf yumrularının yangısı oluşmuş, eksüdasyon, nekroz, yaygın ya da diffüz ödem, ağrı var ise pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir (Resmi Gazete, 2009).

#### **2.2.1.1.2. Karşılaştırmalı İntradermal PPD Bovine ve Avian Reaksiyonlarının Değerlendirilmesi**

a) **Pozitif sonuç (+)**: Uygulama yapılan yerde lenf kanalları ya da lenf yumrularının yangısı oluşmuş, eksüdasyon, nekroz, yaygın ya da diffüz ödem, ağrı gibi klinik belirtilerin tespit edilmesi ya da bovine PPD enjeksiyonu yapılan uygulama yerinde 4 mm ve üzerinde deri kıvrımı kalınlığı oluşması ve ayrıca bovine PPD, avian PPD enjeksiyonu yapılan bölgede bulunan deri kıvrımı 4 mm'den daha fazla kalınlaşma göstermesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

b) **Şüpheli sonuç (±)**: Bovine PPD enjeksiyonu yapılan uygulama yerinde, 2 mm'den fazla deri kıvrımı kalınlığı varsa ve avian PPD enjeksiyonu uygulama yerinden 1-4 mm daha fazla deri kıvrımı kalınlığı oluşmuşsa ya da pozitif sonuçta belirtilen klinik septomlar yoksa şüpheli reaksiyon olarak değerlendirildi.

c) **Negatif sonuç (-)**: Bovine PPD enjeksiyonu yapılan uygulama yerinde 2 mm'den fazla deri kıvrımı kalınlığı yoksa veya pozitif ya da şüpheli avian PPD reaksiyonuna eşit ya da daha az deri kıvrımı kalınlaşmasına sahip bovine PPD reaksiyonu tespit edildiğinde veya pozitif sonuçta belirtilen klinik septomlar yoksa negatif reaksiyon olarak değerlendirildi.

CITT'e şüpheli sonuç gösteren sığırlar en az 42 gün sonra tekrar bovine ve avian intradermal PPD enjeksiyonu yapıldı. İkinci test sonucu negatif olmayan sığırların test sonucu pozitif kabul edildi (Çizelge 2.3) (Resmi Gazete, 2009).

**Çizelge 2. 3.** Karşılaştırmalı İntradermal Tüberkulin test sonuçlarının değerlendirilmesi.

PPD Bovine Uygulama Yerindeki Reaksiyon	PPD Avian Uygulama Yerindeki Reaksiyon	Karşılaştırma	Sonuç
+	+, ±, -	İki deri kalınlaşma farkı 4 mm den fazla ve Bovine PPD $\geq 4$ mm	Pozitif (+)
+	+, ±, -	İki deri kalınlaşma farkı 1-4 mm arasında ( $1\text{mm} \leq \text{kalınlaşma} \leq 4\text{mm}$ ) ve Bovine PPD $\geq 4$ mm ise	Şüpheli (±)
±	+, ±, -	İki deri kalınlaşma farkı 1-4 mm arasında ( $1\text{mm} \leq \text{kalınlaşma} \leq 4\text{mm}$ ) ve Bovine PPD $2\text{ mm} < \text{kalınlaşma} < 4\text{ mm}$ ise	Şüpheli (±)
+	+	İki deri kalınlaşma farkının eşit ya da Avianın fazla olması ve Bovine PPD, Avian PPD $\geq 4$ mm olması	Negatif (-)
±	±	İki deri kalınlaşma farkının eşit ya da Avianın fazla olması ve Bovine PPD, Avian PPD $2\text{mm} < \text{kalınlaşma} < 4\text{ mm}$ olması	Negatif (-)
±	+	Avian PPD $> 4$ mm fazla olması ve Bovine PPD $2\text{mm} < \text{kalınlaşma} < 4\text{mm}$ arasında olması	Negatif (-)
-	+	Avian PPD $\geq 4$ mm ve Bovine PPD $\leq 2\text{mm}$ ise	Negatif (-)
-	-	Bovine PPD ve Avian PPD $\leq 2\text{mm}$ ise	Negatif (-)



**Şekil 2. 5. A. PPD uygulaması yapılacak bölgelerin traş edilmesi, B. Kumpas, C. Kumpasla ölçülmesi, D. PPD'nin deri içine enjekte edilmesi (Çankırı).**

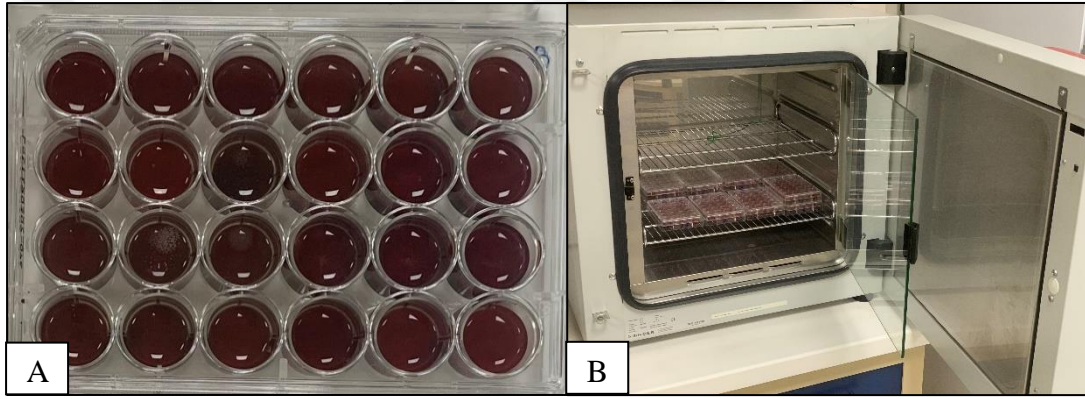
### 2.2.1.2. Gama İnterferon (IFN- $\gamma$ ) Testi

Üretici firma tarafından bildirilen protokole göre sandviç ELISA yapıldı.

#### 2.2.1.2.1. Kan Kültürünün Hazırlanması

Her bir sığıra PPD deri testi uygulanmadan önce kuyruk bölgesinde bulunan *Vena coccygea*'dan Lithium heparinli tüplere 8 ml venöz kan alındı ve tüpler yavaşça alt üst edilerek heparin kan ile karıştırıldı. 12 saat süre içerisinde oda sıcaklığında

(22±3°C) laboratuvara getirilen kan örnekleri 24 kuyucuklu hücre kültürü pleytinde (Isolab, multiwell plates, lot:076, 50) tam kan kültürleri yapıldı. Kan tüpleri teste başlanmadan önce 10 kez alt üst edildi. Her bir hayvandan alınan kan örnekleri 24 kuyucuklu doku kültürü pleytinde bulunan her bir hayvana ait olan 3 kuyucuğa 1,5 ml tek kullanımlık pipet ucu ile aseptik koşullar altında dağıtıldı. Birinci sırada bulunan kuyucuktaki kan örneğinin üzerine 100 µl nil kontrol antijeni (PBS), ikinci kuyucukta bulunan kan örneğinin üzerine 100 µl PPD bovine antijeni, üçüncü kuyucukta bulunan kan örneğinin üzerine 100 µl PPD avian antijeni eklenerek mikropleyt karıştırıcıda 1 dk. süreyle homojen karışım sağlandı. Daha sonra mikropleytler 37 °C’de, %5 CO<sub>2</sub>’li etüvde, 16-24 saat (Binder, Germany) inkübasyona bırakıldı (Şekil 2.6).



**Şekil 2. 6.** A. Kan örnekleri üzerine antijenlerin ilave edildiği 24 kuyucuklu hücre kültürü pleyti, B. Hücre kültürü pleytlerinin 37 °C’de %5 CO<sub>2</sub>’li etüvde 16-24 saat inkübasyonu.

#### 2.2.1.2.2. Plazma Örneklerinin Alınması

İnkübasyonun ardından, her bir kan plazması için steril bir pipet ve pipet ucu ile her kuyucuktan 500 µl plazma örneği alındı ve boş steril 96 kuyucuklu mikropleyte aseptik koşullarda dağıtıldı. 1 numaralı hayvan pleytin nil kontrol (PBS) antijeni ile A1 kuyucuğuna, bovine PPD antijeni ile A2 kuyucuğuna, avian PPD antijeni ile A3 kuyucuğuna aktive olan plazma örnekleri aktarıldı. Kan plazma örnekleri sırasıyla bu şekilde steril mikropleyte aktarıldı ancak anti IFN-γ antikorları ile kaplı ELISA pleytine aktarımdan sonra kaplı pleytlerin C4, C5, C6 kuyucuklarına pozitif kontroller, G4, G5, G6 kuyucuklarına ise negatif kontroller konulacağı için boş

bırakıldı. Alınan plazma örneklerinin 12 kanallı pipet aracılığıyla kaplı pleyte sırayla aktarım gerçekleştirildi.

### 2.2.1.2.3. Sandviç ELISA

Konsantre konjugat haricindeki tüm reaktifler testte başlamadan önce oda sıcaklığına ( $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) getirildi. Üretici firmanın kit protokolüne göre test yapıldı. Antikor kaplı mikropleytlerde bulunan kuyucuklara 50  $\mu\text{l}$  plazma sulandırma tamponu (*Green diluent*) eklendi ve sonra Şekil 2.7’de belirtilen sıra ve düzen içerisinde bu kuyucuklara ilk önce 50  $\mu\text{l}$  test örnekleri eklendi daha sonra pozitif ve negatif kontrol örnekleri ilave edildi.

Sıra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1Nil	1Bo	1Av	2Nil	2Bo	2Av	3Nil	3Bo	3Av	4Nil	4Bo	4Av
B	5Nil	5Bo	5Av	6Nil	6Bo	6Av	7Nil	7Bo	7Av	8Nil	8Bo	8Av
C	9Nil	9Bo	9Av	PK	PK	PK	10Nil	10Bo	10Av	11Nil	11Bo	11Av
D	12Nil	12Bo	12Av	13Nil	13Bo	13Av	14Nil	14Bo	14Av	15Nil	15Bo	15A
E	16Nil	16Bo	16Av	17Nil	17Bo	17Av	18Nil	18Bo	18Av	19Nil	19Bo	19Av
F	20Nil	20Bo	20Av	21Nil	21Bo	21Av	22Nil	22Bo	22Av	23Nil	23Bo	23Av
G	24Nil	24Bo	24Av	NK	NK	NK	25Nil	25Bo	25Av	26Nil	26Bo	26Av
H	27Nil	27Bo	27Av	28Nil	28Bo	28Av	29Nil	29Bo	29Av	30Nil	30Bo	30Av

**Şekil 2. 7.** Plazma örneklerinin mikropleytlere IFN- $\gamma$  Sandviç ELISA testinde dağıtılması. Nil: PBS, Bo: PPD Bovine, Av: PPD Avian ile uyarılan plazma örnekleri.

Uyarılmış kan plazmaları, kaplı pleytlere her örnek iki kez eklendi ve eklenme sırası şu şekilde gerçekleştirildi: A ve B’ye A sırasındaki örnekler , C ve D’ye B sırası, E ve F’ye C sırası, G ve H kuyucuklarına ise D sırasındaki plazma örneklerinin aktarımı yapıldı yani her örnek iki kez test edildi. Negatif ve pozitif kontrol örnekleri en son konuldu. Kaplı pleytlere aktarma sırasında negatif ve pozitif kontrol örnekler

dâhil tüm örnekler 5 kez pipetaj yapılarak karışım sağlandı. Daha sonra her pleytin kapağı kapatıldı ve 1 dk. süre ile mikropleyt karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında (24 °C) 60±5 dk. süresince inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda pleytler 6 defa ELISA mikropleyt yıkama cihazında (MINDRAY, MV-12A, Microplate Washer) kuyucuklar yıkanarak kurutma kağıdında kurutuldu. Sonra tüm kuyucuklara 100 µl taze hazırlanan konjugat solüsyonu ilave edilerek oda sıcaklığında 60 dk. inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama ve kurutma tekrar yapıldı. Pleytlere taze hazırlanan 100 µl substrat solüsyonu kuyucuklara eklendi ve oda sıcaklığında 30 dk. direkt ışıktan kaçınılan bir ortamda pleytler kapak ile kapatılarak inkübe edildi. Süre bitiminde her kuyucuğa enzim stop solüsyonu 50 µl ilave edildi ve mikropleyt karıştırıcıda pleytler hafifçe karıştırıldı. Stop solüsyonu eklenip reaksiyonun durması sağlandıktan 5 dk. gibi kısa bir süre sonra pleytler, ELISA okuyucuda (Therma Scientific Multiskan FC) 450 nm’de okundu.

#### **2.2.1.2.4. Testin Değerlendirilmesi**

Negatif ve pozitif kontrol örneklerinin OD değerlerinin ortalaması baz alındı ve PK OD değerlerinin ortalaması 0,70’den büyük, NK OD değerlerinin ortalaması 0,130’dan küçük olursa test geçerli olarak kabul edildi. Örneklerde ise;

**Negatif:** OD Bo PPD – OD Nil (PBS) antijen < 0,1 ve  
OD Bo PPD – OD Av PPD < 0,1

**Pozitif:** OD Bo PPD – OD Nil (PBS) antijen ≥ 0,1 ve  
OD Bo PPD – OD Av PPD ≥ 0,1 olarak değerlendirildi.

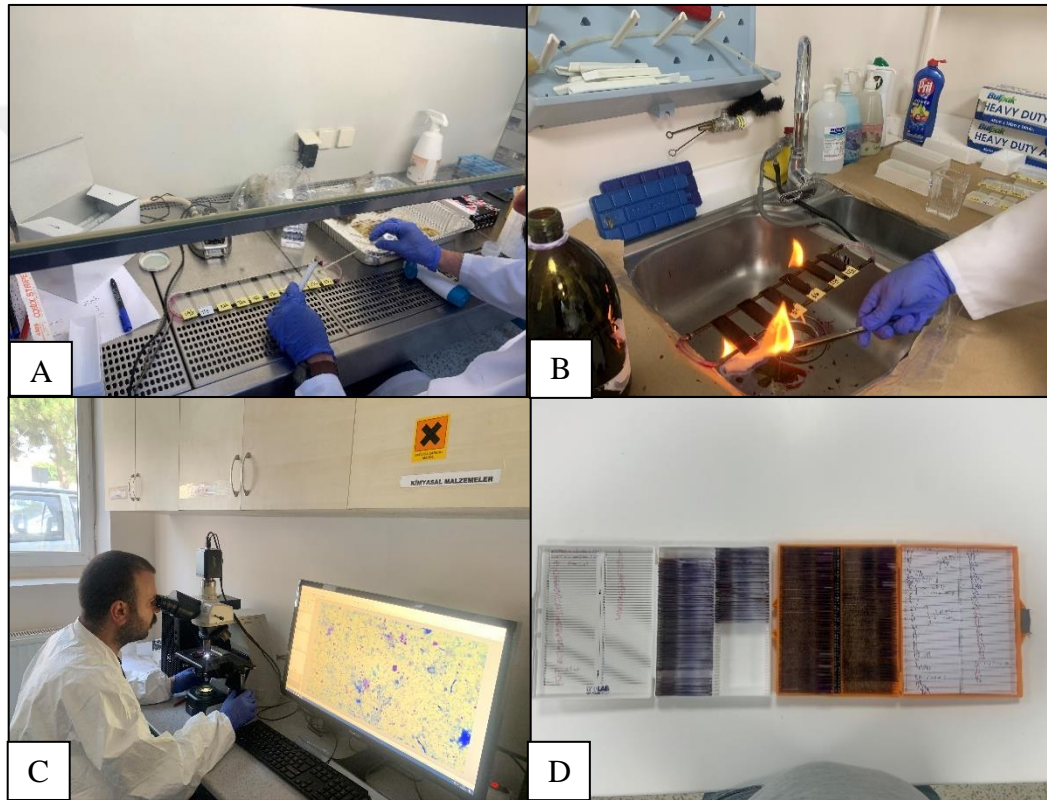
## 2.2.2. Paratüberküloz Enfeksiyonu Antemortem Tanı Yöntemleri

### 2.2.2.1. Bakteriyoskopi

Her sığırdan alınan yaklaşık 40 gram dışkı örneği steril distile su ile homojenize edildikten sonra her bir dışkının üç ayrı bölgesinden 2 adet direkt smear preparat hazırlandı ve fekal bakteriyoskopi tanısı için ZN boyama metodu ile boyama yapıldı. Bu amaçla hazırlanan smear preparatlar oda sıcaklığında kısa bir süre bekletilerek kurumaya sağlandıktan sonra en az 2 kez alevden geçirilerek tespit edildi. Daha sonra lamın üzerine karbol fuksin solüsyonu pastör pipeti ile lamın üzerine kaplayacak halde ilave edildi ve alttan 3 dk. aralıklarla preparatlara iki ya da üç kez hafifçe preparatların aşırı ısınarak kabarcık çıkarmasından ve yanmasından kaçınarak ısıtıldı. Süre bitiminde preparatlar çeşme suyu ile yıkandı ve preparatlar asit-alkolde (%3 w/v) renksizleştirme yapıldı ve çeşme suyu ile tekrar yıkandı. Yıkama işleminin ardından pastör pipeti ile preparatları kaplayacak şekilde ve zemin mavi renge dönüşüncüye kadar metilen mavisi ile boyandı ve tekrar çeşme suyu ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. İncelenmeye hazır hale gelen preparatlar 100x objektifte preparata immersiyon yağı damlatılarak mikroskop sahasında ARB'ler tarandı (Arda, 2006; Fujiki, 2001). ARB'ler mavi zeminde kısa-kalın, kırmızı-pembe renkte kokobasil tarzında kümeler halinde görüntülendi. En az 100 mikroskop sahası tarandı ve sonuçlar kaydedildi. Bu sonuçlar Çizelge 2.4'de belirtildiği gibi aside dirençli bakteri skorlama (ARB scorin) kriterlerine göre değerlendirildi (Şekil 2.8) (Fujiki, 2001).

**Çizelge 2. 4.** Asido Resistants Basil (ARB) skortlama kriteri (Fujiki, 2001).

Kriter	Değerlendirme
Mikroskop sahasında asidorezistans bakteri yok	Negatif
Mikroskop sahasında 1-9 adet asidorezistans bakteri var	Şüpheli
Mikroskop sahasında 10-99 adet asidorezistans bakteri var	Pozitif



**Şekil 2. 8.** A. Sürme preparatların hazırlanması, B. ZN ile boyanması, C. Mikroskobik sahada incelenmesi, D. Preparatların muhafaza edilmesi.

### **2.2.2.2. *Mycobacterium paratuberculosis* Antikor Testi**

Üretici firma tarafından bildirilen protokole göre indirekt ELISA yapıldı.

#### **2.2.2.2.1. Testin Uygulanışı**

Testte başlamadan önce test kiti oda sıcaklığına (18-26°C) getirildi ve test, kitin üretici firma tarafından belirlenen kit protokolü dikkate alınarak yapıldı. Kitte bulunan pozitif ve negatif kontroller ile sığır kan serumu örnekleri *M. phlei* barındıran seyretici tampon sayesinde çapraz reaksiyon gösteren antikorları elimine etmek için boş steril mikropleytte her bir örnek ve kontroller 1:20 oranında seyreltici tampon ile karıştırıldı ve 15 dakikadan 2 saate kadar olan bir zaman dilimi arasında 18-26°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda her bir kuyucukta bulunan serum örneklerinden, pozitif ve negatif kontrollerden çok kanallı pipet aracılığıyla 100 µl alınarak *Map* antijeni ile kaplı mikropleytlere aynı sıra ve düzen içerisinde konuldu. Antijen kaplı her pleytin A1 kuyucuğuna negatif kontrol, B1 ve C1 kuyucuğuna ise pozitif kontroller eklendi. Daha sonra pleytler 18-26°C'de 45±5 dk. inkübasyona bırakıldı. Süre bitiminde pleytler yıkama cihazıyla (MINDRAY, MV-12A, Microplate Washer) her bir kuyucuk 3 defa 300 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yıkama bitiminde pleytler kurutma kağıdı ile kurutuldu. Her bir kuyucuğa 1:100 oranında kısa süreli protokol ile sulandırılan konjugat eklendi ve pleytler 18-26°C'de 30±3 dk. inkübasyona bırakıldı. Daha sonra yıkama cihazı ile pleytler yıkandı ve kurutma kağıdı ile pleytler kurutuldu. Daha sonra pleytlerin her bir kuyucuğuna 100 µl enzim substratı eklendi ve 10±3 dk. 18-26°C'de direkt ışıktan kaçınılan bir ortamda inkübasyona bırakıldı. Süre bitiminde pleytlere enzim durdurma solüsyonu ilave edildi ve mikropleyt karıştırıcıda hafifçe karıştırıldı. Pleytler ELISA okuyucuda (Thermo Scientific Multiskan FC) 450 nm'de okundu.

#### 2.2.2.2. Testin Değerlendirilmesi

Kit protokolünün belirttiği şekilde pozitif kontrollerin (ODPK) ortalama OD değeri ve negatif kontrolün (ODNK) OD değeri hesaplandı.  $ODPK \geq 0,350$  ve  $ODPK_x / ODNK \geq 3,00$  olur ise test geçerli kabul edildi.

Her örnek için pozitiflik yüzdesi (% S / P ) ;

$$\% S/P = 100 \times \frac{ODS - ODNK}{ODPK_x - ODNK} \text{ formülü ile hesaplandı.}$$

Bu sonuca göre her bir sığır kan serumu örneğinin % S/P değeri;

% S/P  $\geq$  % 55 olur ise; pozitif

%  $45 < S/P < 55$  olur ise; şüpheli,

% S/P  $\leq$  % 45 olur ise; negatif olarak değerlendirildi.

#### 2.2.2.3. IFN- $\gamma$ Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bu çalışmada Tüberküloz enfeksiyonunun tanısını yapmak için uygulanan IFN- $\gamma$  ELISA sonuçlarında ortaya çıkan avian PPD'nin OD değerleri hesaplandı. OD değerlerinin *Map* enfeksiyonu yönünden değerlendirilmesi ise; Vazquez ve ark. (2013), tarafından bildirilmiş olan hesaplama kriterine göre yapıldı. Bu kriter dikkate alındığında; her bir örneğin avian PPD OD değeri, nil (PBS) OD değerinden çıkarıldığında farkın 0,05'e eşit veya bu değerden daha yüksek çıkması ve avian PPD OD değerinin bovine PPD OD değerinden daha yüksek bir değere sahip olması durumunda sığır, Paratüberküloz enfeksiyonu yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

$OdAV > OdBO$  ve  $OdAV - OdNİL \geq 0,05$  PTB enfeksiyonu yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

#### **2.2.2.4. Karşılaştırmalı İntradermal PPD Reaksiyonlarının Değerlendirilmesi**

Resmi Gazete’de yayımlanan 16458 sayılı ve 9.11.1978 tarihli Sığır Tüberkülozu Yönetmeliği göre Karşılaştırmalı İntradermal Tüberkulin Testi uygulanan sığırlarda 72 saat sonra uygulanan bölgelerdeki deri kıvrımı kalınlaşması;

- 1) 3 mm'ye kadar (3 mm hariç) olursa negatif reaksiyon,
- 2) 3-4 mm. (4 mm hariç) arasında ise şüpheli reaksiyon,
- 3) 4mm. veya daha fazla ise pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir. PPD avian ve PPD bovine tüberkulin uygulama bölgelerindeki deri kalınlaşmalarından yola çıkarak PTB enfeksiyonu şüpheli bulunan hayvanlar aşağıdaki kriterlere göre belirlenmiştir.

- Her iki tüberkulinde pozitif reaksiyon alındığında; avian tüberkulinin deri kalınlaşması bovine tüberkulininden fazla ise hayvan Paratüberküloz enfeksiyonu yönünden şüpheli olarak değerlendirilir.
- Avian tüberküline pozitif, bovine tüberküline şüpheli reaksiyon tespit edildiğinde; hayvan Paratüberküloz enfeksiyonu yönünden şüpheli olarak değerlendirilir.
- Her iki tüberkulinde şüpheli reaksiyon tespit edildiğinde; avian tüberkulinin deri kalınlaşması bovine tüberkulininden fazla ise hayvan Paratüberküloz enfeksiyonu yönünden şüpheli olarak değerlendirilir.
- Avian tüberküline pozitif, bovine tüberküline negatif reaksiyon tespit edildiğinde; hayvan Paratüberküloz enfeksiyonu yönünden şüpheli olarak değerlendirilir.
- Avian tüberküline şüpheli, bovine tüberküline negatif reaksiyon tespit edildiğinde; hayvan Paratüberküloz enfeksiyonu yönünden şüpheli olarak değerlendirilir (Çizelge 2.5) (Resmi Gazete, 1978).

**Çizelge 2. 5.** Karşılaştırmalı İntradermal PPD deri test sonuçlarının PTB enfeksiyonu yönünden değerlendirilmesi.

PPD Avian ve Bovine Deri Testlerinin Karşılaştırılması	PTB Enfeksiyonu Yönünden Değerlendirilmesi
Bovine $\geq 4$ mm, Avian $\geq 4$ mm ve Avian $>$ Bovine	Şüpheli
Bovine $3 \text{ mm} \leq$ kalınlaşma $< 4$ mm ve Avian $\geq 4$ mm	Şüpheli
Bovine $3 \text{ mm} <$ kalınlaşma $< 4$ mm, Avian $3 \text{ mm} <$ kalınlaşma $< 4$ mm ve Avian $>$ Bovine	Şüpheli
Bovine $3 \text{ mm} <$ kalınlaşma ve Avian $\geq 4$ mm	Şüpheli
Bovine $3 \text{ mm} <$ kalınlaşma ve Avian $3 \text{ mm} \leq$ kalınlaşma $< 4$ mm	Şüpheli

Paratüberküloz bakımından şüpheli kabul edilen hayvanlar son intradermal PPD uygulanmasından itibaren iki aylık izolasyona alındıktan sonra, kan örnekleri alınarak Paratüberküloz enfeksiyonu yönünden incelenmesi için laboratuvara gönderilir. Kan örnekleri alındıktan sonra, son yapılan avian ve bovine PPD'lerinin uygulandığı boyun bölgesinin diğer bölgesine intradermal PPD johnin uygulanır. Serolojik testlerden herhangi birinden pozitif sonuç alınması ya da PPD johnin uygulaması sonucu pozitif reaksiyon olması durumunda hayvan PTB enfeksiyonu yönünden pozitif olarak değerlendirilir (Resmi Gazete, 1978).

### 2.2.3. Bir Teşhis Metodunun Spesifitesi ve Sensitivitesinin Belirlenmesi

Bir teşhis metodunun sensitivitesi bu metotla elde edilen pozitif değerlerin gerçek pozitif değerlere bölünmesiyle elde edilir. Bir testin spesifitesi ise, bu test ile bulunan negatif değerlerin gerçek negatiflere bölünmesiyle hesaplanır (Çizelge 2.6) (Erganiş, 1993).

**Çizelge 2. 6.** Bir teşhis metodunun spesifitesi ve sensitivitesi.

Test Sonucu	Gerçek Durum		Toplam
	Hasta	Hasta Değil	
Pozitif	a	b	a+b
Negatif	c	d	b+d
Toplam	a+c	b+d	a+b+c+d

$$\% \text{ Sensitivite} = 100 \times a/(a+c)$$

$$\% \text{ Spesifite} = 100 \times d/(b+d)$$

### 3. BULGULAR

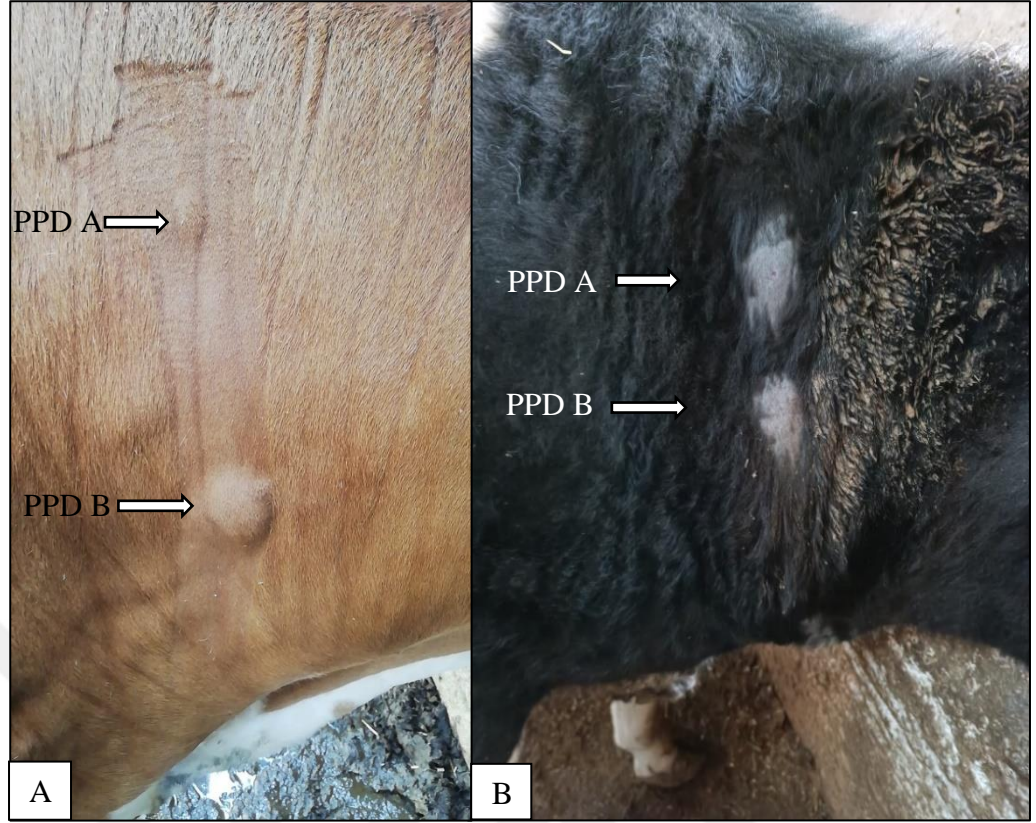
#### 3.1. Tüberküloz Enfeksiyonu Antemortem Tanı Sonuçları

##### 3.1.1. PPD Deri Testi

İntradermal bovine PPD ve avian PPD testi uygulanan toplam 423 adet sığır Çizelge 2.3'e göre PPD uygulanan bölgedeki deri kalınlaşmaları kumpas ile ölçülüp değerlendirildi. Bu değerlendirme neticesinde 86 (%20,33) sığır PPD deri testine pozitif sonuç verdiği için Tüberküloz teşhisi konulurken, 337 (%79,67) sığır negatif sonuç verdi (Çizelge 3.1). İlk PPD deri testi uygulamasında Çizelge 2.3'e göre şüpheli çıkan sığırlar 60 gün sonraki ikinci PPD deri testi uygulaması sonucuna göre negatif ya da pozitif olarak sonuç verdi ve ilk uygulama sonuçlarına eklenildi (Şekil 3.1).

**Çizelge 3. 1.** Karşılaştırmalı İntradermal Tüberkülin test sonuçları.

<u>İşletme No</u>	<u>İntradermal Tüberkülin Testi</u>		<u>Toplam</u>
	<u>Pozitif (%)</u>	<u>Negatif (%)</u>	
1	34 (%23,61)	110 (%76,39)	144
2	31 (%60,78)	20 (%39,22)	51
3	11 (%35,48)	20 (%64,52)	31
4	0 (%0)	47 (%100)	47
5	10 (%6,67)	140 (%93,33)	150
<b>Toplam</b>	86 (%20,33)	337 (%79,67)	423



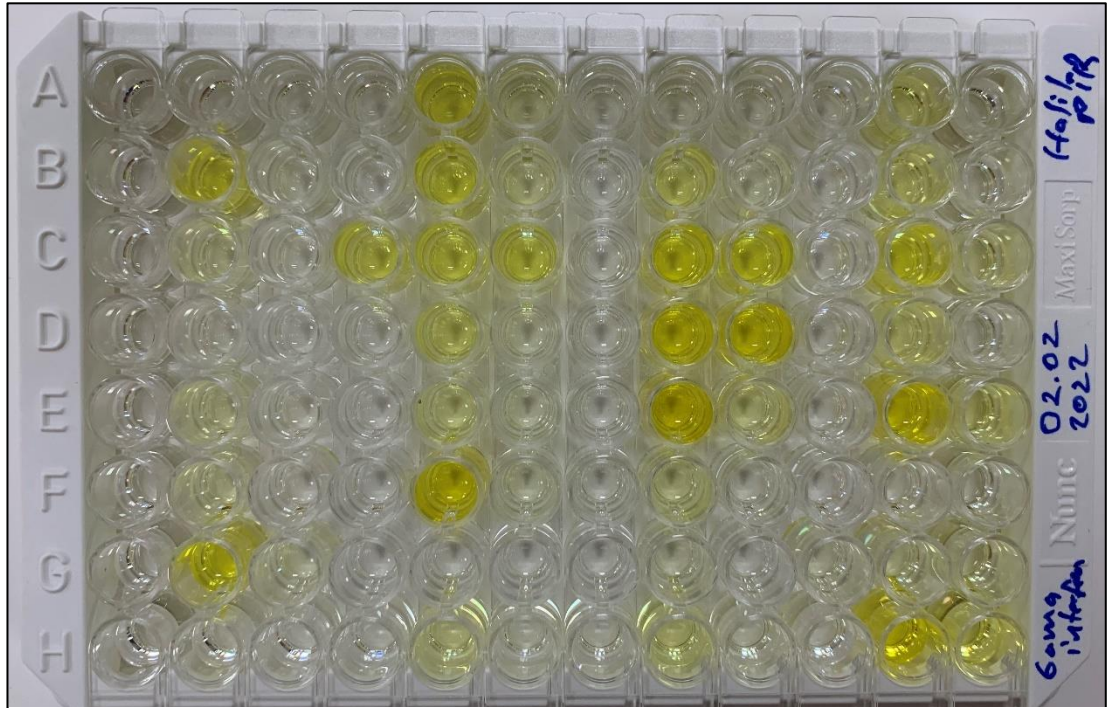
**Şekil 3.1.** A. Bovine PPD pozitif reaksiyon, B. Avian PPD ve Bovine PPD pozitif reaksiyon (Çorum, Konya).

### 3.1.2. Gama İnterferon ELISA (IFN- $\gamma$ )

423 adet kan plazmasının bovine PPD, avian PPD ve nil (PBS) antijenleri ile uyarıldıktan sonra IFN- $\gamma$  değerlerini belirlemek için sandviç ELISA yapıldı. Her bir kan plazmasındaki IFN- $\gamma$  seviyesinin OD değerleri kaydedilerek kit protokolüne göre Tüberküloz enfeksiyonu tanısı için hesaplanarak değerlendirildi (Şekil 3.2). Bu değerlendirme sonucuna göre; 423 adet sığırdan 84 (%19,86)'ü Tüberküloz pozitif bulundu. Tüberküloz tanısı için aynı hayvanlara CITT'de uygulandığı için, bu iki teşhis metodunu karşılaştırdığımızda 12 sığır PPD deri testine pozitif sonuç verirken, IFN- $\gamma$  testine negatif sonuç vermiştir. Diğer taraftan 10 sığır IFN- $\gamma$  testine pozitif sonuç verirken, PPD deri testine negatif sonuç vermiştir (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.2.** IFN- $\gamma$  testi ve İntradermal Tüberkülin test sonuçları.

İşletme Numarası	Hayvan Sayısı	İntradermal Tüberkülin Testi		IFN- $\gamma$ Testi	
		Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
1	144	34	110	28	116
2	51	31	20	27	24
3	31	11	20	13	18
4	47	0	47	8	39
5	150	10	140	8	142
Total	423	86	337	84	339



**Şekil 3.2.** Sığır plazma örneklerinin IFN- $\gamma$  ELISA sonucu (Ankara).

Bu çalışmada Tüberküloz şüphesi olan sığır sürülerinde IFN- $\gamma$  testini Tüberkülin deri testi ile karşılaştırıldığında; IFN- $\gamma$  testinin sensitivitesi % 86, spesifitesi ise % 97 bulundu (Çizelge 3.3). Sensitivite ve spesifite değerleri Çizelge 2.6'da belirlenen yöntem uygulanarak hesaplandı.

**Çizelge 3.3.** IFN- $\gamma$  testinin sensitivitesi ve spesifitesi.

IFN- $\gamma$ Test Sonuçları	İntradermal Tüberkülin Testi		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	74	10	84
Negatif	12	327	339
Toplam	86	337	423

*Sensitivite: % 86*

*Spesifite: % 97*

### 3.2. Paratüberküloz Enfeksiyonu Antemortem Tanı Sonuçları

#### 3.2.1. Antikor ELISA

Paratüberküloz enfeksiyonunun teşhisi için 423 adet sığırdan elde edilen kan serumlarına ELISA yapıldı ve ELISA sonuçlarına göre OD değerleri kit protokolü dikkate alınarak değerlendirildi (Şekil 3.3). Bu değerlendirme neticesinde; 423 adet sığır kan serumunda *Map*'a karşı gelişen antikorlar yönünden 44 (% 10,4)'ü pozitif, 10 (%2,37)'u şüpheli ve 369 (%87,23)'u negatif bulundu. Örnek alınan 5 süt sığır işletmesinin hepsinde Paratüberküloz yönünden pozitiflik saptandı (Çizelge 3.4).

15.04.2022

## Plate Listing

Assay	MptsSPOUS											
Date	15.04.2022											
Template	09.09.2016-001											
Tech	1											
Plate-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A - Well</b>	Neg	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0,044	0,173	0,128	0,146	0,150	0,178	0,130	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S/P %	12,958	8,438	10,246	10,648	13,461	8,639	-4,420	-4,420	-4,420	-4,420	-4,420	-4,420
Result	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<b>B - Well</b>	Pos	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0,971	0,265	0,102	0,939	0,559	0,111	0,110	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,001
S/P %	22,200	5,826	89,905	51,733	6,730	6,630	-4,420	-4,420	-4,420	-4,420	-4,420	-4,520
Result	Neg	Neg	Pos	Sus	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<b>C - Well</b>	Pos	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	1,108	0,127	0,284	0,250	0,158	0,157	0,243	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S/P %	8,338	24,108	20,693	11,452	11,351	19,990	-4,420	-4,420	-4,420	-4,420	-4,420	-4,420
Result	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<b>D - Well</b>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0,108	0,207	0,204	0,098	0,117	0,161	0,044	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S/P %	6,429	16,374	16,072	5,424	7,333	11,753	0,000	-4,420	-4,420	-4,420	-4,420	-4,420
Result	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<b>E - Well</b>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0,222	0,099	0,226	0,237	0,131	2,380	0,043	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S/P %	17,880	5,525	18,282	19,387	8,739	234,656	-0,100	-4,420	-4,420	-4,420	-4,420	-4,420
Result	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<b>F - Well</b>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0,116	0,865	0,306	0,085	0,147	3,235	0,042	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,001
S/P %	7,233	82,471	26,318	4,119	10,347	320,542	-0,201	-4,420	-4,420	-4,420	-4,420	-4,520
Result	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<b>G - Well</b>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0,126	0,569	0,663	0,890	0,125	0,162	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S/P %	8,237	52,737	62,180	84,982	8,137	11,853	-0,402	-4,420	-4,420	-4,420	-4,420	-4,420
Result	Neg	Sus	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<b>H - Well</b>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
O.D.	0,086	3,103	0,066	0,108	0,131	0,427	0,041	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S/P %	4,219	307,283	2,210	6,429	8,739	38,473	-0,301	-4,420	-4,420	-4,420	-4,420	-4,420
Result	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

Şekil 3.3. Sığır kan serumu örneklerinin Antikor ELISA sonucu (Çorum).

Çizelge 3.4. Sığır işletmelerindeki hayvanların Antikor ELISA sonuçları.

İşletme No	Antikor ELISA			Toplam
	Pozitif (%)	Şüpheli (%)	Negatif (%)	
1	15 (%10,42)	1 (%0,7)	128 (%88,88)	144
2	7 (%13,72)	2 (%3,93)	42 (%82,35)	51
3	7 (%22,58)	2 (%6,45)	22 (%70,97)	31
4	1 (%2,13)	-	46 (%97,87)	47
5	14 (%9,33)	5 (%3,33)	131 (%87,34)	150
<b>Toplam</b>	<b>44 (%10,4)</b>	<b>10 (%2,37)</b>	<b>369 (%87,23)</b>	<b>423</b>

### 3.2.2. IFN- $\gamma$ ELISA

Tüberküloz şüpheli sığır işletmelerinde bulunan 423 adet hayvana gama interferon testi ile Tüberküloz enfeksiyonu yönünden tarama yapıldıktan sonra elde edilen OD değerleri ile yaptığımız hesaplama neticesinde eğer; avian PPD OD değeri, nil (PBS) OD değerinden çıkarıldığında farkın 0,05'e eşit veya bu değerden daha yüksek çıkması ve avian PPD OD değerinin bovine PPD OD değerinden daha yüksek bir değere sahip olması durumunda Sığır Paratüberküloz enfeksiyonu bakımından pozitif olarak değerlendirildi (Çizelge 3.5).

**Çizelge 3.5.** PTB IFN- $\gamma$  ELISA sonuçları.

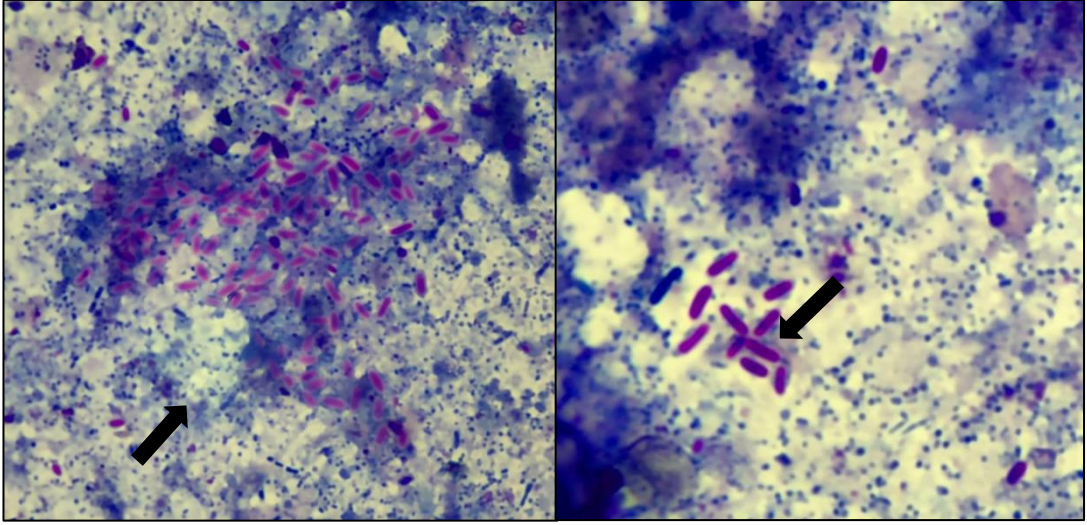
İşletme No	IFN- $\gamma$ ELISA		Toplam
	Pozitif (%)	Negatif (%)	
1	8 (%5,55)	136 (%94,45)	144
2	-	51 (%100)	51
3	1 (%3,23)	30 (%96,77)	31
4	3 (%6,38)	44 (%93,62)	47
5	9 (%6)	141 (%94)	150
<b>Toplam</b>	21 (%4,96)	402 (%95,04)	423

### 3.2.3. Bakteriyoskopi

Paratüberküloz enfeksiyonunun tanısı için 5 işletmeden toplam 423 adet sığırdan alınan dışkı örnekleri ile direkt smear preparatlar hazırlandı ve ZN boyama yöntemiyle boyandıktan sonra 100x objektifte ARB yönünden mikroskopta tarandı (Şekil 3.4). Sonuçlar Çizelge 2.4'deki ARB skorlama tablosuna göre değerlendirildi (Çizelge 3.6).

**Çizelge 3.6.** *Map*'ın ZN boyama yöntemiyle dışkı bakısı sonuçları.

İşletme No	Dışkı Bakısı Sonuçları			Toplam
	Pozitif (%)	Şüpheli (%)	Negatif (%)	
1	5 (%3,47)	7 (%4,86)	132 (%91,67)	144
2	-	7 (%13,73)	44 (%86,27)	51
3	6 (%19,35)	-	25 (%80,65)	31
4	-	-	47 (%100)	47
5	12 (%8)	5 (%3,33)	133 (%88,67)	150
<b>Toplam</b>	23 (%5,44)	19 (%4,49)	381 (%90,07)	423



**Şekil 3.4.** ZN boyama yöntemi ile dışkı örneklerindeki ARB'lerin mikroskopik görüntüsü (Kısa, kırmızı-pembe renkte, kalın ve iç içe girmiş kokobasil görünüm).

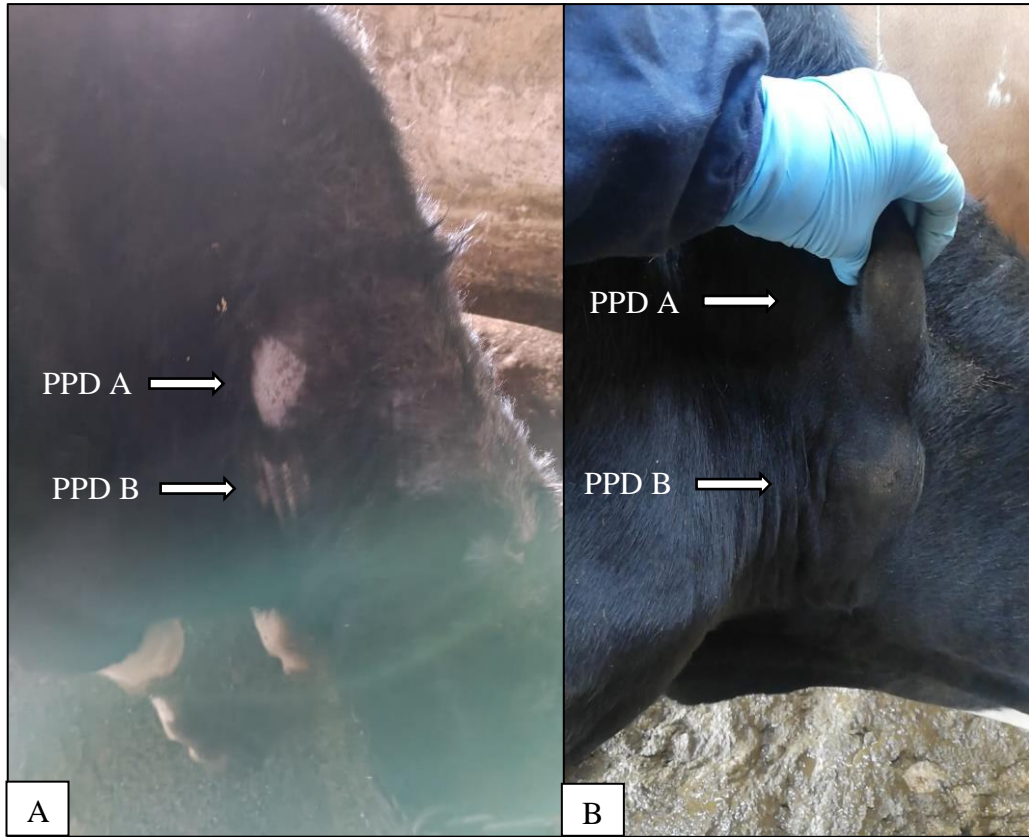
#### 3.2.4. İntradermal PPD Avian Sonuçları

Karşılaştırmalı intradermal PPD testi uygulanan işletmelerde 72 saat sonra PPD avian uygulanan bölge PTB enfeksiyonu yönünden değerlendirildi ve Çizelge 2.5'e göre sonuçlandırıldı (Şekil 3.5) (Çizelge 3.7).

- **İşletme 1;** İşletmede bulunan 144 sığırdan 4'ü PTB enfeksiyonu yönünden şüpheli bulundu. Bu 4 sığırdan hiçbiri antikor ELISA'ya pozitiflik vermezken, 2'si fekal bakteriyoskopide pozitif ve 1'i IFN- $\gamma$  ELISA'da pozitif sonuç verdi. PTB şüpheli hayvanlar arasında 1 sığırdan IFN- $\gamma$  ELISA'da ve fekal bakteriyoskopide pozitiflik belirlendi.
- **İşletme 2;** İşletmede bulunan 51 sığırdan 3'ü PTB enfeksiyonu yönünden şüpheli bulundu. Bu 3 sığırdan 1'i antikor ELISA'ya pozitiflik, 3'ü fekal bakteriyoskopide şüpheli bulunurken, 3 sığırdan hiçbiri IFN- $\gamma$  ELISA'da pozitiflik vermedi.
- **İşletme 3;** İşletmede bulunan 31 sığırdan 4'ü PTB enfeksiyonu yönünden şüpheli bulundu. Bu 4 sığırdan 2'si hem antikor ELISA'ya hem de fekal bakteriyoskopide pozitif bulunurken, PTB şüpheli 4 sığırdan hiçbiri IFN- $\gamma$

ELISA'ya pozitiflik vermedi. Antikor ELISA ve fekal bakteriyoskopide pozitif bulunan 2 sığır aynı hayvan olarak tespit edildi.

- **İşletme 4;** İşletmede bulunan 47 sığırdan hiçbiri intradermal avian PPD sonuçlarına göre PTB enfeksiyonu bakımından şüpheli bulunmadı.
- **İşletme 5;** İşletmede bulunan 150 sığırdan 3'ü PTB enfeksiyonu bakımından şüpheli bulundu. Bu 3 sığırdan 2'si antikor ELISA, fekal bakteriyoskopi ve IFN- $\gamma$  ELISA sonuçlarına göre pozitiflik bulundu ve bu üç testte pozitiflik veren 2 sığır aynı hayvan olarak tespit edildi.



**Şekil 3.5. A.** Avian PPD pozitif reaksiyon, **B.** Avian PPD ve Bovine PPD pozitif reaksiyon (Çorum, Konya).

**Çizelge 3. 7.** Avian PPD sonuçlarına göre *Map* enfeksiyonu bakımından şüpheli bulunan 14 sığırın PTB tanı testleri sonuçları.

Sığır No	Antikor ELISA	Dışkı Bakteriyoskopi	IFN- $\gamma$ ELISA
13	-	-	-
78	-	+	-
83	-	+	+
33	-	-	-
B8	-	$\pm$	-
B9	-	$\pm$	-
B18	+	$\pm$	-
17	+	+	-
31	+	+	-
29	-	-	-
K14	-	-	-
101	-	-	-
133	+	+	+
82	+	+	+

Pozitif (+), Negatif (-), Şüpheli ( $\pm$ ).

### 3.2.5. Tanı Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Tanı testleri içinde sığırlarda en yüksek oranda pozitiflik antikor ELISA'da (%10,4) saptandı. Bunu sırasıyla ZN boyama yöntemiyle fekal bakteriyoskopi (%5,44) ve IFN- $\gamma$  ELISA (%4,96) yöntemleri takip etti. Sürü (işletme) olarak değerlendirilme yapıldığında; en yüksek pozitiflik değeri Antikor ELISA (%100) gösterdi ve bu oranı takip eden testler sırasıyla; IFN- $\gamma$  ELISA (%80) ve ZN boyama (%60) yöntemleri izledi (Çizelge 3.8). 5 süt sığır işletmesinde bulunan 423 adet sığıra yapılan antikor ELISA, fekal bakteriyoskopi ve IFN- $\gamma$  ELISA sonuçlarına göre bu testlerin birinden veya ikisinden ya da üçünden pozitiflik alındı. Antikor ELISA, fekal bakteriyoskopi ve IFN- $\gamma$  ELISA sonuçlarından sadece birinde sırasıyla 27 (%6,39), 7 (%1,66) ve 10 (%2,36) hayvanda pozitiflik görüldü. Antikor ELISA ve fekal bakteriyoskopide 11 (%2,6), antikor ELISA ve IFN- $\gamma$  ELISA'da 6 (%1,42), fekal bakteriyoskopi ve IFN- $\gamma$  ELISA'da 5 (%1,18) hayvanda pozitif sonuç elde edildi. Antikor ELISA, fekal bakteriyoskopi ve IFN- $\gamma$  ELISA sonuçlarından her birine pozitif sonuç veren 4 (%0,95) hayvan tespit edildi (Çizelge 3.9).

**Çizelge 3.8.** *Map* enfeksiyonunun antemortem tanı yöntemleri sonuçlarının karşılaştırılması.

İşletme No	Antikor ELISA			Dışkı Bakteriyoskopi			IFN- $\gamma$ ELISA		Hayvan Sayısı
	Pozitif %	Şüpheli %	Negatif %	Pozitif %	Şüpheli %	Negatif %	Pozitif %	Negatif %	
1	15 (%10,42)	1 (%0,7)	128 (%88,88)	5 (%3,47)	7 (%4,86)	132 (%91,67)	8 (%5,55)	136 (%94,45)	144
2	7 (%13,72)	2 (%3,93)	42 (%82,35)	-	7 (%13,73)	44 (%86,27)	-	51 (%100)	51
3	7 (%22,58)	2 (%6,45)	22 (%70,97)	6 (%19,35)	-	25 (%80,65)	1 (%3,23)	30 (%96,77)	31
4	1 (%2,13)	-	46 (%97,87)	-	-	47 (%100)	3 (%6,38)	44 (%93,62)	47
5	14 (%9,33)	5 (%3,33)	131 (%87,34)	12 (%8)	5 (%3,33)	133 (%88,67)	9 (%6)	141 (%94)	150
<b>Toplam</b>									<b>423</b>

**Çizelge 3.9.** *Map* enfeksiyonu antemortem tanı yöntemlerinin pozitif sonuçlarının karşılaştırılması.

İşletme No	Analiz	Antikor ELISA	Dışkı Bakteriyoskopi	IFN- $\gamma$ ELISA
1	Antikor ELISA	9	2	4
	Dışkı Bakteriyoskopi	2	1	2
	IFN- $\gamma$ ELISA	4	2	2
2	Antikor ELISA	7	0	0
	Dışkı Bakteriyoskopi	0	0	0
	IFN- $\gamma$ ELISA	0	0	0
3	Antikor ELISA	3	4	0
	Dışkı Bakteriyoskopi	4	2	0
	IFN- $\gamma$ ELISA	0	0	1
4	Antikor ELISA	1	0	0
	Dışkı Bakteriyoskopi	0	0	0
	IFN- $\gamma$ ELISA	0	0	3
5	Antikor ELISA	7	5	2
	Dışkı Bakteriyoskopi	5	4	3
	IFN- $\gamma$ ELISA	2	3	4
Toplam	Antikor ELISA	27	11	6
	Dışkı Bakteriyoskopi	11	7	5
	IFN- $\gamma$ ELISA	6	5	10

## 4. TARTIŞMA

Türkiye’de Sığır Tüberkülozunun teşhisinde standart teşhis metodu olarak TDT uygulanmaktadır. Eradikasyon programlarına rağmen Tüberküloz, Türkiye’de sığır işletmelerinde hala yüksek prevalansta seyreden bir enfeksiyon olarak önemini korumaktadır. Bu yüzden Tüberküloz enfekte sığırların tanısında sensitivitesi ve spesifitesi daha yüksek testlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışma; Çankırı/Çerkeş, Çorum/Merkez, Ankara/Sincan, Eskişehir/Odunpazarı ve Konya/Ereğli’de bulunan Tüberküloz şüpheli toplam 5 süt sığır işletmesindeki 423 adet sığıra Tüberküloz enfeksiyonu antemortem tanı yöntemlerinden IFN- $\gamma$  testi ve CITT yapıldı. IFN- $\gamma$  testine 84 adet sığır pozitif sonuç verirken, CITT’e 86 adet sığır pozitif sonuç verdi. CITT ve IFN- $\gamma$  testinin prevalansları sırasıyla; % 20,33 ve % 19,86 bulundu. IFN- $\gamma$  testinin sensitivitesi ve spesifitesini belirlemek için altın standart metod olarak PPD deri testi kullanıldı ve Çizelge 3.3’de hesaplanarak sensitivitesi % 86 , spesifitesi % 97 tespit edildi. Lahuerta-Marín ve ark. (2015), yapmış oldukları çalışmada IFN- $\gamma$  testinin sensitivitesini % 88-94, spesifitesini % 85-98 bulmuşlardır. Sayın (2010), yapmış olduğu çalışmada IFN- $\gamma$  testinin sensitivite ve spesifite değerlerini sırasıyla % 91,5 ve % 93,4 bulmuştur. Öztürk ve ark. (2010b), yapmış oldukları çalışmada Sığır Tüberkülozunun teşhisinde altın standart metod olarak PPD deri testi kullanılmış IFN- $\gamma$  testinin sensitivite ve spesifitesini, sırasıyla %90 ve %97 olduğunu tespit etmişlerdir. Gormley ve ark. (2006), IFN- $\gamma$  testinin sensitivite değerinin (%90–93), PPD deri testinin sensitivite değerinden (%70-75) daha yüksek değerde tespit ettiklerini ve deri testinin spesifite değerini %99,9, IFN- $\gamma$  testinin spesifite değerini ise %95 olarak rapor etmişlerdir. Hashem ve ark. (2022), yapmış oldukları çalışmada Sığır Tüberkülozunun teşhisinde altın standart metod olarak PPD deri testi kullanılmış IFN- $\gamma$  testinin sensitivite ve spesifite değerleri sırasıyla % 98 ve % 71,4 bulmuşlardır. Bu tez çalışmasında elde edilen sensitivite ve spesifite değerleri; Gormley ve ark. (2006), Hashem ve ark. (2022), Lahuerta-Marín ve ark. (2015), Öztürk ve ark. (2010b) ve Sayın (2010)

tarafından yapılan çalışmalardaki sensitivite ve spesifite değerleri ile uyumlu olduğu görüldü.

Sayın ve Erganiş (2010), yapmış oldukları çalışmada Bovine Tberklini deri içine enjekte edildiğinde canlı, çevresel mikobakteriler, çapraz reaksiyon veren bakteriler (*Nocardia*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium*), yakın zamanda uygulanan PPD deri testi, *M. avium* spp. *paratuberculosis* ile enfeksiyon ve *M. bovis* BCG aşılması ile daha önceden duyarlı hale getirilmiş ise enjeksiyondan sonraki 48-72. saatte deride şişlik, kızarıklık, ağrı gibi yangı belirtileri ortaya çıkması ile PPD deri testinde yanlış pozitif sonuçlar alınabildiğini belirtmişlerdir. Alveraz ve ark. (2009), yapmış oldukları çalışmada IFN- $\gamma$  testinin, Sığır Tüberkülozunun teşhisinde maksimum enfekte hayvan sayısını tespit etmek için tüberkülin testlerine yardımcı bir test olarak uygulandığını ancak Tüberküloz tanı testlerinin performansını etkileyen olası faktörler arasında, İşpanya ve diğer Avrupa lkelerinde yaygın bir hastalık olan Paratüberküloz, Tüberküloz enfeksiyonu ile birlikte seyrettiği zaman yanlış pozitif reaksiyonların nedeni olabileceğini, Tüberküloz ve Paratüberküloz enfekte sürülerde gama interferon testinin sensitivitesi % 50 görülürken, sadece Tüberküloz enfekte olmuş sürüler IFN- $\gamma$  testinin sensitivitesini % 78 olarak tespit etmişlerdir. Ahir ve ark. (2016) ve Praud ve ark. (2015), yapmış oldukları çalışmalarda bazı hayvanların CITT'e pozitif reaksiyon gösterirken IFN- $\gamma$  testine negatif sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada, 5 işletmeden toplam 423 adet sığırdan 86 (%20,33)'sı PPD deri testine pozitif sonuç verirken 84' (%19,86) IFN- $\gamma$  testine pozitif sonuç verdi. Her iki testi karşılaştırdığımızda 12 sığır PPD deri testi pozitif sonuç verirken, IFN- $\gamma$  testine negatif sonuç vermiştir. Bu hayvanların postmortem incelemelerinde, lenf nodüllerinde ve hayvanın tüm dokularında herhangi bir lezyona rastlanmadı. Bu yüzden, bu çalışmada PPD deri testi sonucunun yanlış pozitiflik söz konusu olabileceği ve bunun sebebinin PPD uygulama hataları, nonpatojenik mikobakteri kaynaklı olabileceği ya da çalışma yapılan bu 5 işletme *Map* enfeksiyonu sürüprevalansının % 100 olduğu ve tüm işletmelerde *Map* enfeksiyonun varlığı söz konusu olduğundan IFN- $\gamma$  testinin sensitivitesini düşürebileceği kanısına varıldı.

*M. bovis* ile deneysel ve doğal olarak enfekte olmuş sığırlar üzerinde yapılan araştırmalar, CMI immün yanıt sonucu ortaya çıkan IFN- $\gamma$ 'yı enfeksiyondan sonraki 2 hafta kadar erken bir sürede tesbit edilebileceği ve genellikle enfekte hayvanlar TDT ile tespit edilmeden önce IFN- $\gamma$  testi ile tespit etme yeteneğini göstermiştir (Smith ve ark., 2021). Ahir ve ark. (2016) ve Gormley ve ark. (2004), yapmış oldukları çalışmada hayvanların IFN- $\gamma$  testi sonucu pozitif ve PPD deri testi sonucu negatif olan sığırların daha sonra PPD deri testi sonucunun pozitif olacağını ve diğer sığırlar için artan bir risk oluşturacağını ve *M. bovis* enfekte sığırların IFN- $\gamma$  testi ile erken teşhis edildikten sonra bu hayvanların enfekte sürüden uzaklaştırılması gerektiğini bildirmişlerdir. Enfeksiyonun başlangıç evresinde olması, immun sistemin baskılanmasına sebep olan generalize enfeksiyon (anerji), nakil stresi, doğum, kortikosteroidler gibi ilaçların kullanılması, viral enfeksiyonlar, deri testinin uygulanması ve sonuçların değerlendirilmesinde, bovine ya da avian PPD'nin üretiminde ya da testi sahada uygulayıncaya kadar geçen süre boyunca PPD'nin korunma şartlarında ortaya çıkan hatalar sebebi ile intradermal tüberkülin testinde yanlış negatif sonuçlar görülebilmektedir (Sayın ve Erganiş, 2010). Bu çalışmada, 10 sığır IFN- $\gamma$  testine pozitif sonuç verirken, PPD deri testine negatif sonuç verdi ve Ahir ve ark. (2016), Gormley ve ark. (2004), Sayın ve Erganiş (2010) ve Smith ve ark. (2021) yapmış oldukları çalışmalarla benzer sonuçlar elde edilmiş ve bu durumun ortaya çıkmasının aynı sebeplerden kaynaklanabileceği düşünürmüştür.

CITT tek başına kullanıldığında yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuç verebilir ancak IFN- $\gamma$  testi, intradermal PPD testine yardımcı bir test olarak kullanıldığı zaman maksimum sayıda Tüberküloz enfekte hayvanı belirleyebilir (Lahuerta-Marin ve ark., 2015; Wood ve Jones, 2001). Ahir ve ark. (2016), Tüberküloz enfeksiyonu şüpheli işletmelerde bulunan 158 sığır ve 42 mandaya, Tüberküloz enfekte hayvanları teşhis etmek için CITT uygulanmış ve IFN- $\gamma$  testi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre işletmelerde bulunan hayvanların PPD deri testinde % 14,5 ve IFN- $\gamma$  testinde % 11,5 oranında pozitiflik verdiği rapor edilmiştir. Ancak her iki testte Tüberküloz pozitif çıkan hayvanlar birleştirildiğinde % 22,5 oranında Tüberküloz pozitif hayvanın olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada ise; 5 işletmede bulunan toplam 423 adet sığıra CITT ve IFN- $\gamma$  testi yapıldı ve sırasıyla pozitiflik oranları; % 20,33 ve % 19,86 bulundu.

Her iki testte pozitif veren hayvanları birleştirdiğimizde ise; % 22,7 oranında Tüberküloz pozitiflik elde edildi. Her iki test sonucu birleştirildiği zaman daha fazla Tüberküloz enfekte pozitif hayvan tespit edilebileceği kanısına varıldı.

PTB enfeksiyonunu teşhis etmek için, bu çalışmada antikor ELISA, IFN- $\gamma$  ELISA ve ZN boyama yöntemiyle fekal bakteriyoskopi tanı yöntemleri birlikte kullanıldı. Ayrıca Tüberküloz teşhisi için kullanılan CITT sonuçlarından yola çıkararak, izelge 2.5'e göre PPD avian tüberküline pozitif reaksiyon veren hayvanlar Paratüberküloz yönünden şüpheli kabul edildi ve bu hayvanlara da antikor ELISA, IFN- $\gamma$  ELISA ve fekal bakteriyoskopi yapıldı. Yapılan bu çalışmada, testlerde pozitiflik veren hayvanların büyük bir kısmının vücut kondisyonları iyi olan melez ve saf sığır ırklardan oluştuğu görüldü. *Map* enfeksiyonunun kronik doğası ve uzun inkübasyon suresi, enfekte olmuş hayvanların hastalığın aşıkar semptomlarını göstermeden önce yıllarca sağlıklı bir görünüş resmeder (Mortier ve ark., 2015) ve bu durum bu çalışmanın bulgularını açıklayabilir. Dışkıdan direkt bakteriyoskopi ile PTB teşhisi, *Map* saçılım miktarının farklı oranlarda olması ya da etkenin düzenli veya aralıklı atılım olması teşhiste yanılmalara sebep olacaktır (Borum ve ark., 2014; Gilardoni ve ark., 2012; Nielsen ve Toft, 2008). ELISA pozitif bulunan hayvanlar, *Map* saçıcı olabilir veya olmayabilir; antikorlar, etkenin dışkı ile saçılma başlamadan önce veya yıllar sonra retiler (Nielsen, 2010). Bu çalışmada, ankırı/erkeş, Çorum/Merkez, Ankara/ Sincan, Eskişehir/Odunpazarı ve Konya/Ereğli ilçelerinde bulunan Tüberküloz şüpheli toplam 5 süt sığır işletmesindeki 423 adet sığırdan alınan kan serumu örneklerinden ELISA ile yapılan Paratüberküloz taramasında 44' (%10,4) pozitif, 10'u (%2,37) şüpheli ve 369'u (%87,23) negatif bulundu. İşletmelerin hepsinde antikor ELISA ile pozitiflik saptandı. ELISA sonuçlarına göre seroprevalans % 10,4 bulunurken, srprevalans % 100 olarak tespit edildi. ZN boyama yöntemi ile dışkı bakısı sonuçlarına göre 23 sığır pozitif, 19 sığır şüpheli ve 381 sığır negatif olarak değerlendirildi. Dışkıda ZN boyama yöntemine göre prevalansı % 5,44 bulundu. Bu sonuçlara göre dışkı da Ziehl Neelsen boyama yöntemi ile 23 (%5,44) hayvanda pozitiflik saptanırken, ELISA ile 44 (%10,4) hayvanda pozitiflik saptandı ve 423 adet sığırdan 11 (%2,6)'i antikor ELISA ve fekal bakteriyoskopide pozitif sonuç alındı. Antikor ELISA prevalansının fekal

bakteriyoskopi prevalansından yüksek olması ve fekal bakteriyoskopide negatif ya da şüpheli vakaların antikor ELISA’da pozitif çıkması, diğer araştırmacıların da (Borum ve ark., 2014; Gilardoni ve ark., 2012; Nielsen ve Toft, 2008; Nielsen, 2010) bildirdiği gibi dışkı ile *Map*’ın saçılımının dönemler halinde olması ve numune alındığında bu saçılımın olmamasından kaynaklanıyor olabileceği düşünüldü.

ELISA uluslararası alanda güvenilir bir test olarak kabul edilmekte ve genellikle Paratüberküloz seroprevalans çalışmalarında ELISA uygulanmaktadır. PTB enfeksiyonunun varlığı Türkiye genelinde bilinmesine rağmen enfeksiyonu ve prevalansını inceleyen çalışma sayısı sınırlıdır. Uşak ilinde Yıldırım ve Civelek (2013), tarafından süt ve dışkı örnekleriyle yapılan bir çalışmada Ziehl-Neelsen (ZN) boyama, Outer PZR, Nested PZR ve bakteriyolojik kültür yöntemleri uygulanmış ve prevalans dışkı örneklerinde sırasıyla % 17, % 9,5, % 20 ve % 4, süt örneklerinde ise sırasıyla % 15,5, % 5,5, % 17,5 ve % 2,5 olarak tespit etmişlerdir. Tütüncü ve ark. (2018), Amasya ve Samsun illerinde yapmış oldukları çalışmada 2 yaşından büyük, Hostein-Friesian sığır ırklarından oluşan ve kronik diyare bulgusu gösteren 15 işletmede toplam 859 süt sığırından elde ettikleri kan serumu örneklerinde ELISA’nın seroprevalansını % 10, sürüprevalansını ise % 46,7 olarak bildirmişlerdir. Makav ve Gökçe (2013), Kars bölgesinde yapmış oldukları çalışmada seroprevalansı ELISA ile % 3,5 sürüprevalansını % 41,6 olarak bildirmişlerdir. Öztürk ve ark. (2010a), Burdur bölgesinde ELISA ile yapmış oldukları çalışmada prevalans % 6,2 bulmuşlardır. Borum ve ark. (2014), Afyon ve civarındaki çiftliklerden 4-8 yaş arasındaki 305 Holstein Fresian süt sığırı kullanarak yapmış oldukları çalışmada süt sığırlarında Paratüberkülozun prevalansını, kan serumu örneklerinde; ELISA ile % 31,8, dışkı örneklerinde; Ziehl-Neelsen boyama ile % 4,59 oranında pozitiflik tespit etmişlerdir. Karatay ve ark. (2020), Ardahan bölgesinde 22 süt sığırı işletmesinden toplam 400 sığırdan alınan kan serumu örneklerinden yapılan antikor ELISA ile prevalansı % 4,25 olarak tespit etmişlerdir.

PTB'nin küresel dağılımı bilgisi, kontrol programlarının oluşturulması için önemlidir. PTB prevalansı, başta sığır PTB’si olmak üzere farklı ülkelerden bildirilmiştir. Karayipler ve Latin Amerika’da % 75,8’e varan sürü düzeyinde yaygınlık

olduğu rapor edilmiştir (Fernandez-Silva ve ark., 2014). Avrupa ve Kuzey Amerika'da sürüprevalansının % 50'den büyük olduğu ve Asya'da da % 20,35-41,7 olduğu bildirilmiştir (Imada ve ark., 2020; Lee ve Jung, 2009; Sun ve ark., 2015). Kolombiya ülkesinin Boyoca bölgesinde Cruz-Estupinan ve ark. (2022), yapmış olduğu bir çalışmada farklı ırk ve yaş gruplarında 882 sığırdan elde ettikleri kan serumu örneklerinde ELISA'nın seroprevalansını % 3,1 olarak tespit etmişlerdir. Sudan'da Elmagzoub ve ark. (2020), süt sığırlarıyla yapmış oldukları çalışmada ELISA'da seroprevalansı % 6,3, sürüprevalansını % 18,9 ve Macaristan'da Ozsvari ve ark. (2020), yapmış olduğu çalışmada ELISA'da seroprevalansı % 5,5 olarak bildirmişlerdir. Hollanda'da Weber ve ark. (2009), süt sığırı işletmelerinde ve Irak'da AL Anbagi ve Salman (2022), manda çiftliklerinde yapmış oldukları çalışmada ZN boyama yöntemiyle dışkı bakışı sonuçlarına göre prevalansın % 27 olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, dışkı bakışı sonuçlarına göre prevalansı % 5,44 bulunurken, antikör ELISA seroprevalansı % 10,4 sürüprevalans ise; % 100 olarak tespit edildi. PTB'nin küresel prevalansının yüksek çıktığı yapılan çalışmalarda görüldü. Bu çalışmada elde edilen PTB prevalans oranları, küresel olarak belirtilenlere (AL Anbagi ve Salman, 2022; Cruz-Estupinan ve ark., 2022; Elmagzoub ve ark., 2020; Fernandez-Silva ve ark., 2014; Imada ve ark., 2020; Lee ve Jung, 2009; Ozsvari ve ark., 2020; Sun ve ark., 2015; Weber ve ark., 2009) kıyasla benzer görünmektedir. Türkiye'nin farklı bölgelerinde yapılan çalışmalardan (Borum ve ark., 2014; Karatay ve ark., 2020; Makav ve Gökçe, 2013; Öztürk ve ark., 2010a; Tütüncü ve ark., 2018; Yıldırım ve Civelek, 2013) da anlaşılacağı gibi bu çalışmada elde edilen sonuçlarla uyumlu görünmektedir. Genel olarak çeşitli araştırmalar tarafından elde edilen prevalans sonuçları arasındaki varyasyon; enfeksiyonun evresi, hayvan yaşı, organizmanın saçılım miktarı, laktasyon dönemi, antikör konsantrasyonu ve farklı ELISA kitleri arasında değişen sensitivite ve spesifite değerlerinden kaynaklanmaktadır (Barkema ve ark., 2010; Mortier ve ark., 2015; Nielsen, 2010; Nielsen ve ark., 2002).

ELISA 2 yaş üzerindeki hayvanlarda daha spesifik ve duyarlıdır (Borum ve ark., 2014; Makav ve Gökçe, 2013; Öztürk ve ark., 2010). Paratüberküloz enfeksiyonunda hayvan, etkeni erken dönemde almasına rağmen dışkı ile etrafa saçılması ve klinik belirtilerin ortaya çıkması çoğunlukla 2 yaşından sonra görülür. Hayvan uzun bir

subklinik dönemden geçer ve etkeni çevreye yavaşça yayar. Bu süre etkenin çevreye yayılması açısından önemlidir (Dieguez ve ark., 2009; Nielsen ve Toft, 2008). Bu çalışmada, Antikor ELISA'ya pozitiflik veren 44 sığırdan 31 (%70,46)'i 2 yaşın üzerinde olduğu 13 (%29,54) 'ünün ise; 2 yaşın altında olduğu tespit edildi ve fekal bakteriyoskopi sonuçlarına göre pozitiflik veren 23 hayvandan 19'u (%82,61) 2 yaşın üzerinde olduğu 4 (%17,39)'ünün ise; 2 yaşın altında olduğu tespit edildi. Bu çalışmada elde edilen prevalans değerlerinden antikor ELISA ve fekal bakteriyoskopi sonuçlarının üzerine hayvanların yaşlarının etkisi olduğu görüldü.

PTB'nin kontrol ve eradikasyon programı çok zordur çünkü hastalık uzun bir inkübasyona sahip ve hastalığı erken safhada teşhisi için kullanılan testlerin sensitivitesi düşüktür. *Map* maruziyetinin başlangıcında T-lenfositlerinin immün tepkisiyle gama interferon (IFN- $\gamma$ ), interleukin-1 (IL-1), IL-6 ve IL-2 gibi proinflamatuvar sitokinlerin açığa çıkmasına yol açar (Coussens ve ark., 2004). Bu yüzden, IFN- $\gamma$  salınımının ölçülmesi enfeksiyonun erken safhası içinde *Map* ile enfekte hayvanların teşhisinde çok önemli bir teşhis metodudur (Stabel ve ark., 2007). PTB enfeksiyonunun tanısında IFN- $\gamma$  üretiminin, en erken tespit edilebilen immün yanıtlardan birisi olduğu bildirilmiştir (Nielsen, 2010). Bu yüzden subklinik enfekte hayvanların tespit edilmesinde IFN- $\gamma$  testinin en iyi seçenek olduğu ifade edilmiştir (Vazquez ve ark., 2013). Ancak IFN- $\gamma$  değerlerine dayalı teşhis testlerin spesifitesi 16 aylıktan küçük sığırlar için düşüktür, üstelik IFN- $\gamma$  pozitif olarak tanımlanan sığırların enfekte sürü içinde hastalık sürecini değerlendirmek için ELISA ya da dışkıdaki *Map* etkenlerin saptayan ilave testlerle desteklenmesi gerekir (Corneli ve ark., 2021). Irak'da AL Anbagi ve Salman (2022), manda çiftliklerinde yapmış oldukları çalışmada IFN- $\gamma$  ELISA sonuçlarına göre prevalansın % 18 olduğu bildirilmiştir. Vazquez ve ark. (2013), IFN- $\gamma$  ELISA ile yapmış oldukları çalışmada pozitif bulunan sığırların % 36,1'inde kültür ya da real-time PZR ile dokularda *Map* tespit etmişlerdir. Şababoğlu (2019), Burdur ili'nde koyunlar üzerinde IFN- $\gamma$  ELISA ile *Map* enfeksiyonunun tanısı için yapmış olduğu çalışmada 150 koyundan 33 (%22)'ünde pozitiflik saptanmıştır. Bu çalışmada da Vazquez ve ark. (2013), tarafından bildirilen kriter kullanıldı ve 423 adet sığırdan 21 (%4,96)'inde pozitiflik saptandı. Alvarez ve ark. (2009), yapmış oldukları çalışmada Tüberküloz ve Paratüberküloz

enfeksiyonlarının aynı sürüde bulunmasının IFN- $\gamma$  ELISA'nın sensitivitesini yaklaşık % 20 düşürebileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmaya katılan 5 işletmede de her iki enfeksiyona da pozitif sonuç veren hayvanların olması nedeniyle elde ettiğimiz IFN- $\gamma$  ELISA'nın prevalansının düşük olmasının bu sebepten kaynaklanıyor olabileceği düşünüldü. Ayrıca, 5 işletmede bulunan toplam 423 adet sığırdan 21'i IFN- $\gamma$  ELISA pozitif sonuç verirken, 402'si negatif sonuç verdi. Bu 21 sığırdan hiçbirinin klinik belirti göstermemesi ve dışkı bakışı sonuçlarına göre sadece 5 (%23,81) adet sığırın IFN- $\gamma$  ELISA'da pozitif belirlenmesi ve 16 (%76,19)'ünün negatif tespit edilmesi, diğer araştırmacıların (Nielsen, 2010, Stabel ve ark., 2007; Vazquez ve ark., 2013) da bildirdiği gibi bu hayvanlar, enfeksiyonun erken veya subklinik dönemde olabilecekleri düşünüldü.

PPD johnin, *Map* enfeksiyonu tanısında ilk kullanılan intradermal testlerden biridir. PTB enfeksiyonunun tanısında spesifik olan PPD johninin, üretiminde kullanılan suşların PPD avian ile antijenik yakınlığı sebebiyle teşhiste birbirinin yerine kullanılabilecekleri bildirilmiştir (Patersson, 1959; Pearson ve ark., 1962). Vural ve ark. (1995), Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü (TİGEM)'ne bağlı sığır işletmelerinde yapmış oldukları çalışmada 4923 sığıra uygulanan intradermal avian PPD ve bovine PPD test sonuçları; aviana karşı 73 pozitif ve 19 şüpheli reaksiyon tespit edilmiş, aviana reaksiyon alınan sığırlara uygulanan intradermal PPD johnine karşı ise; 52 pozitif reaksiyon ve 6 şüpheli reaksiyon gözlenmiştir. PPD Avian ve PPD johnin suşları arasında antijenik benzerlik bulunsa da alınan reaksiyonlara göre azda olsa fark görülebildiği ifade edilmiştir. Bu yüzden daha duyarlı sonuç alabilmek için PPD aviana reaksiyon veren hayvanların PPD johnin uygulaması yapılmıştır. Bu çalışmada da, intradermal PPD aviana pozitif reaksiyon veren hayvanlar PTB enfeksiyonu yönünden şüpheli kabul edildi ve bu hayvanlara antikor ELISA, fekal bakteriyoskopi, IFN- $\gamma$  ELISA yapıldı. Çizelge 2.5'e göre PTB enfeksiyonu yönünden, 5 süt sığır işletmesinde bulunan 423 adet sığırın PPD avian sonuçlarına göre 14 (%3,31)'ü şüpheli bulundu. Bu 14 sığırlardan 5 (%35,71)'i antikor ELISA'da, 6 (%42,86)'sı fekal bakteriyoskopide, 3 (%21,43)'ü IFN- $\gamma$  ELISA'da PTB enfeksiyonu yönünden pozitif bulundu. PTB enfeksiyonu bakımından şüpheli bulunan 14 sığırdan 2 (%14,29)'si antikor ELISA'ya, fekal bakteriyoskopi ve IFN- $\gamma$  ELISA'ya pozitif

sonuç verirken, 2 (%14,29)'si antikor ELISA'ya ve fekal bakteriyoskopide pozitif sonuç verdi ve 1 adet (%7,14) sığır, fekal bakteriyoskopi ve IFN- $\gamma$  ELISA'da pozitiflik tespit edildi. Elde edilen bu sonuçlara göre Tüberküloz şüpheli işletmelerde Tüberküloz enfeksiyonu tanısı için uygulanan PPD bovine ve PPD avian intradermal tüberkülin uygulamalarından, PPD aviana karşı reaksiyon gösteren hayvanların PTB yönünden enfekte olabileceği ya da sığırlarda bulunan atipik (kuş tipi) ARB'lerden kaynaklanan reaksiyon olabileceği kanısına varıldı.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, Çankırı/Çerkeş ilçesinden 1, Çorum/Merkez ilçesinden 1, Ankara/Sincan ilçesinden 1, Eskişehir/Odunpazarı ilçesinden 1 ve Konya/Ereğli ilçesinden 1 işletme olmak üzere Tüberküloz şüpheli toplam 5 süt sığır işletmesinde bulunan 423 adet sığıra Tüberküloz enfeksiyonu tanısı için karşılaştırmalı intradermal tüberkülin (PPD bovine ve PPD avian) testi ve Gama İnterferon ELISA (IFN- $\gamma$ ) yapıldı. Paratüberküloz enfeksiyonu tanısı için aynı hayvanlara antikor ELISA, IFN- $\gamma$  ELISA ve ZN boyama yöntemiyle fekal bakteriyoskopi yapıldı. Ayrıca Tüberküloz teşhisi için kullanılan CITT sonuçlarına göre PPD avian tüberküline pozitif reaksiyon veren hayvanlar Paratüberküloz yönünden şüpheli kabul edildi ve bu hayvanlara da antikor ELISA, IFN- $\gamma$  ELISA ve fekal bakteriyoskopi yapıldı. Yapılan tüm bu test sonuçları değerlendirmeye alındı.

Değerlendirme sonucunda;

1. Sığır Tüberkülozu antemortem teşhisinde IFN- $\gamma$  testinin sonuçlarının CITT sonuçlarıyla benzerlik göstermesi nedeniyle bazı işletmelerde bu testin tercih edilebileceği ancak kan örneklerinin 12 saati aşmadan oda sıcaklığında (20-25°C) laboratuvara ulaştırılması, yüksek kit maliyeti, testin yapılacağı laboratuvarın alt yapısı ve deneyimli personele duyulan ihtiyaç gibi sebeplerden rutinde sınırlı bir kullanımı olacağı,
2. CITT'in düşük maliyetli olması ve saha şartlarında uygulanabilirliği bakımından antemortem Sığır Tüberkülozu enfeksiyonunun teşhisinde önemini koruduğu,
3. Sığır Tüberkülozu antemortem teşhisinde CITT'in, IFN- $\gamma$  testiyle birlikte uygulanması çok sayıda Tüberküloz enfekte hayvanı tespit edebileceği,
4. Bu çalışmada bTB'nin prevalansının yüksek çıkması ve bu yüzden sörvey çalışması yapılması gerektiği ve bu sörvey çalışmasının sonuçlarına göre ülkesel ya da bölgesel olarak eradikasyon ve kontrol projelerinin yapılmasına ivedilikle ihtiyaç duyulduğu,

5. *Map* enfeksiyonunun prevalansının hem bireysel hem de sürü bazında yüksek olduğu ve bu hastalığın hayvancılık üzerine çok ciddi ekonomik kaybı dikkate alındığında, *Map* enfeksiyonu her nerede ortaya çıkarsa sürü içinde enfeksiyonun bulaşmasını en aza indirmek için çok acil kontrol önlemlerinin alınması gerektiği, ulusal düzeyde bir çalışma yapılmasına ihtiyaç duyulduğu ve yapılacak bu çalışmayla hastalığa yönelik etkili ulusal kontrol stratejilerinin geliştirilmesi gerektiği,

6. Tüberküloz enfeksiyonunun tanısı için yapılan karşılaştırmalı intradermal Tüberkülin testinde intradermal PPD aviana pozitif reaksiyon veren hayvanların Paratüberküloz tanısı için kullanılan diğer testlerle desteklenerek nonspesifik reaksiyonların ortaya çıkarılmasında ya da PTB enfekte hayvanların tespit edilmesinde belirleyici rol oynadığı,

7. Ülkemizde TOB'un Sığır Tüberküloz hastalığı mücadele programında Tüberküloz şüpheli enfekte sürülere CITT uygulanmakta ve bu testte, PPD bovine pozitif reaksiyon veren hayvanlar Tüberküloz pozitif kabul edilirken, PPD avian pozitif reaksiyon veren hayvanlar değerlendirilmeye alınmamaktadır. PPD aviana pozitif reaksiyon veren hayvanların Paratüberküloz enfeksiyonu yönünden şüpheli kabul edilip, PTB tanısı için ilave testler yapılması gerektiği,

8. Sığırlarda *Map* enfeksiyonunun teşhisinde farklı tanı metotlarının kombinasyonu ile daha çok enfekte hayvanın teşhisinin yapılabileceği,

9. Tüberküloz ve Paratüberküloz enfeksiyonlarının aynı sürüde bulunmasının tanı testlerinin sensitivite ve spesifite değerlerini etkileyebileceği söylenebilir.

## ÖZET

### Sığır Tüberküloz ve Paratüberküloz Enfeksiyonlarının Antemortem Tanı Yöntemleriyle Ayrımı

Bu tez çalışmasında, Tüberküloz şüpheli işletmelerde bulunan hayvanlara, Sığır Tüberkülozunun antemortem tanı ve ayırımında kullanılan tüberkülin deri testleri (PPD bovine ve avian) sonuçlarından yola çıkılarak, Paratüberküloz enfeksiyonu teşhisi koymak için serolojik olarak incelendi ve fekal bakteriyoskopi yapıldı. Ayrıca Türkiye’de endemik olarak görülen Sığır Tüberküloz hastalığının antemortem tanı yöntemleri karşılaştırılıp, gama interferon testinin sensitivite ve spesifite değerleri belirlenerek Sığır Tüberküloz hastalığının eradikasyon çalışmalarına katkı sağlayacak verilerin elde edilmesi amaçlandı. Bu kapsamda;, Çankırı/Çerkeş ilçesinden 1, Çorum/Merkez ilçesinden 1, Ankara/Sincan ilçesinden 1, Eskişehir/Odunpazarı ilçesinden 1 ve Konya/Ereğli ilçesinden 1 işletme olmak üzere Tüberküloz şüpheli toplam 5 sığır işletmesinde bulunan 423 adet sığıra intradermal tüberkülin testi uygulandı ve bu test altın standart metot olarak belirlenerek, IFN- $\gamma$  testinin sensitivitesi % 86, spesifitesi % 97 olarak belirlendi. Paratüberküloz enfeksiyonunun tanısı için bu hayvanlara antikor ELISA , fekal bakteriyoskopi ve IFN- $\gamma$  ELISA yapıldı ve bu testlerin prevalansları sırasıyla % 10,4, % 5,44 ve % 4,96 bulundu ve sığırlardan 4 (%0,95)’ü *Map* enfeksiyonu tanı yöntemlerinin her birine pozitif sonuç verdi. Ayrıca intradermal PPD aviana pozitif reaksiyon veren 14 sığır PTB enfeksiyonu yönünden şüpheli kabul edildi ve bu sığırlardan 5 (%35,71)’i antikor ELISA’da, 6 (%42,86)’sı fekal bakteriyoskopide, 3 (%21,43)’ü IFN- $\gamma$  ELISA’da PTB enfeksiyonu yönünden pozitif sonuç verirken, 2 sığırın (%14,29) tüm test sonuçlarında pozitiflik görüldü. Sonuç olarak; Sığır Tüberkülozu antemortem tanısında, intradermal tüberkülin test sonuçlarına benzer sonuçlar veren IFN- $\gamma$  testinde kullanılabilmesi ve Tüberküloz şüpheli sürülerde her iki testin birlikte yapılması çok daha fazla Tüberküloz enfekte hayvanı tespit edebileceği ancak saha taramalarında kullanımının sınırlı olacağı kanısına varıldı. Tüberküloz enfeksiyonunun tanısı için yapılan karşılaştırmalı intradermal tüberkülin testinde PPD aviana pozitif reaksiyon veren hayvanların Paratüberküloz tanısı için kullanılan diğer testlerle desteklenerek nonspesifik reaksiyonların ortaya çıkarılmasında ya da PTB enfekte hayvanların tespit edilmesinde belirleyici rol oynadığı görüldü.

**Anahtar Sözcükler:** ELISA, Gama-İnterferon, *Mycobacterium bovis*, Paratüberküloz, Sığır

## SUMMARY

### **Differentiation of Bovine Tuberculosis and Paratuberculosis Infections with Antemortem Diagnostic Methods**

In this thesis, based on the results of tuberculin skin tests (PPD bovine and avian) used in the antemortem diagnosis and differentiation of Bovine Tuberculosis, the animals in the enterprises with suspected Tuberculosis were serologically examined to diagnose Paratuberculosis infection and fecal bacterioscopy was performed. In addition, it was aimed to obtain data that will contribute to the eradication studies of Bovine Tuberculosis disease by comparing the antemortem diagnostic methods of bovine tuberculosis disease, which is endemic in Türkiye and by determining the sensitivity and specificity values of the gamma interferon test. In this context; Intradermal tuberculin test was applied to 423 cattle in 5 dairy cattle farms with suspected tuberculosis, 1 from Çankırı/Çerkeş district, 1 from Çorum/Merkez district, 1 from Ankara/Sincan district, 1 from Eskişehir/Odunpazarı district and 1 from Konya/Ereğli district and this test was determined as the gold standard method, and the sensitivity of the IFN- $\gamma$  test was 86 % and the specificity was 97 %. Antibody ELISA, fecal bacterioscopy examination and IFN- $\gamma$  ELISA were performed on these animals for the diagnosis of Paratuberculosis infection and the prevalences of these tests were found to be 10.4 %, 5.44 % and 4.96 %, respectively and 4 (0.95%) of the cattle gave positive results for each of the *Map* infection diagnostic methods. In addition, 14 cattle with a positive reaction to intradermal PPD avian were considered suspicious for PTB infection and in terms of PTB infection, while 5 (35.71%) of these cattle gave positive results in the antibody ELISA , 6 (42.86%) in the fecal bacterioscopy examination, and 3 (21.43%) in the IFN- $\gamma$  ELISA , all test results were positive in 2 cattle (14.29%). In conclusion; It was concluded that the IFN- $\gamma$  test, which gives similar results to the results of the intradermal tuberculin test, can be used in the antemortem diagnosis of Bovine Tuberculosis and that both tests can be performed together in herds with suspected Tuberculosis, and that much more Tuberculosis infected animals can be detected, but its use in field screenings will be limited. In the comparative intradermal tuberculin test performed for the diagnosis of Tuberculosis infection, it was seen that animals that reacted positively to PPD aviana played a decisive role in detecting nonspecific reactions or detecting PTB infected animals, supported by other tests used for the diagnosis of Paratuberculosis.

**Keywords:** Cattle, ELISA, Gamma-Interferon, *Mycobacterium bovis*, Paratuberculosis

## KAYNAKLAR

- AGRAWAL A, VARSHNEY R, KIRTHIKA P, GUPTA R, SULABH S, VARSHNEY R, CHAKRAVARTI S, THANKAPPAN S (2021). Global scenario of paratuberculosis: a threat to livestock sector. *Biol. Rhythm Res.* **52**(6):957-972.
- AHIR P, FILIA G, MAHAJAN V, LEISHANGTHEM G, RAI ST, SINGH A (2016). Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Lactating Cattle and Buffaloes by Comparative Intradermal Tuberculin Test and Bovine Gamma-Interferon Immunoassay. *J Anim Res.* **6**:1069.
- AKAY Ö (1997). Aside dirençli bakteriler. *Özel Mikrobiyoloji*. Ed.:Arda M, 4. baskı. Ankara: Medisan Yayın Evi. S.:179-198.
- AL ANBAGI NA, SALMAN SS (2022). Prevalence of paratuberculosis determined by serum interferon, interleukin ELISA and feces in buffalo (Iraq). *Prevalence*, **26**(1):79-85.
- ALLEN AR, MINOZZI G, GLASS EJ, SKUCE RA, MCDOWELL SWJ, WOOLLIAMS JA, BISHOP SC (2010). Bovine Tuberculosis: the genetic basis of host susceptibility. *Proc. R. Soc. B*, **277**, 2737–2745.
- ALTUN D (2023). İnsan ve hayvan kaynaklı *Mycobacterium bovis* suşlarının spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR yöntemleri ile epidemiyolojik analizinin yapılması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- ALVAREZ J, DE JUAN L, BEZOS J, ROMERO B, SAEZ JL, MARQUES S, DOMINGUEZ C, MINGUEZ O, FERNANDEZ-MARDOMINGO B, MATEOS A, DOMINGUEZ L, ARANAZ A (2009). Effect of paratuberculosis on the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma detection assay. *Vet. Microbiol.*, **135**(3-4):389-393.
- ANGELA DP, GIUSEPPINA C, TONY FV, BIJO B, FATMIRA S, GIUSEPPINA T (2006). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in milk using Polymerase Chain Reaction (PCR). *Food Control*. **17**:776-780.
- ANTOGNOLI MC, HIRST HL, GARRY FB, SALMAN MD (2007). Immune Response to and Faecal Shedding of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* in Young Dairy Calves, and the Association Between Test Results in the Calves and the Infection Status of their Dams. *Zoonoses Public Hlth* . **54**:152-159.
- ARDA M (2006). *Temel Mikrobiyoloji*. 3. Baskı, Ankara: Medisan Yayınevi, s: 283-289.
- ARDA M, MİNBAŞ A, LELOĞLU N, AYDIN N, AKAY Ö (1992). Özel Mikrobiyoloji, Asido-Rezistans Mikroorganizma İnfeksiyonları, 1. Baskı, Atatürk Üniversitesi Basımevi, Erzurum ,s:279-311.

- ASLAN G, KUYUCU N, ÇALIKOĞLU M, ERSÖZ G, ÜLGER M, GÜNAL S, EMEKDAŞ G (2009). *Mycobacterium bovis*'in etken olduğu Tüberküloz olguları. *ANKEM*. **23**:182–187.
- AYELE WL, NEILL SD, ZINSSTAG J, WEISS MG, PAVLIK I (2004). Bovine tuberculosis: An old disease but a new threat to Africa. *IJTLD*, **8**(8):924-937.
- BARHEMA HW, HESSELINK JW, MCKENNA S, BENEDICTUS G, GROENENDAAL H (2010). Global prevalence and economics of infection with *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in ruminants. In *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*; CABI Publishing: Wallingford, Oxfordshire, UK, 2010; pp. 10–21.
- BARRATT AS, ARNOULT MH, AHMADI BV, RICH KM, GUNN GJ, STOTT AW (2018). A framework for estimating society's economic welfare following the introduction of an animal disease: the case of Johne's disease, *PLoS One*, **13**(6):Article ID e0198436.
- BEGG D, WHITTINGTON R (2010). Paratuberculosis in sheep. In: Behr MA, Collins DM. (Eds), *Paratuberculosis: organism, disease, control*. Oxfordshire Wallingford, UK: CAB International, p: 157-168.
- BERBEROĞLU M, CİVELEK T (2016). Seroprevalence of subclinical paratuberculosis in dairy cattle in Manisa region of Turkey. *Kocatepe Vet J*. **9**(3):194-9.
- BEZOS J, CASAL C, ROMERO B, SCHROEDER B, HARDEGGER R, RAEBER AJ, LOPEZ L, RUEDA P, DOMINGUEZ L (2014). Current ante-mortem techniques for diagnosis of Bovine Tuberculosis. *Res. Vet. Sci*. **97**:S44–S52.
- BRITTON LE, CASSIDY JP, O'DONOVAN J, GORDON SV, MARKEY B (2016). Potential application of emerging diagnostic techniques to the diagnosis of bovine Johne's disease (Paratuberculosis). *Vet. J.*, **209**:32-39.
- BLANCO VAZQUEZ C, ALONSO-HEARN M, JUSTE RA, CANIVE M, IGLESIA, T, IGLESIAS N, AMADO J, VICENTE F, BALSEIRO A, CASAIS, R. (2020). Detection of latent forms of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infection using host biomarker-based ELISAs greatly improves paratuberculosis diagnostic sensitivity. *PLoS One*, **15**(9):e0236336.
- BORRELL S, GAGNEUX S (2009). Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, **13**(12):1456–1466.
- BORUM AE, ÇATIK S, MECİTOĞLU Z, DEMİR G, ÜLGEN M, ŞENTÜRK S (2014). ELISA ve fekal bakteriyoskopi ile sığırlarda Paratüberküloz prevalansının belirlenmesi. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg.*, **25**(1):1-5.
- BROOKS-POLLOCK E, WOOD JLN (2015). Eliminating bovine tuberculosis in cattle and badgers: insight from a dynamic model. *Proc. R. Soc. B* **282**:20150374.

- CADMUS S, AKINSEYE VO, VAN SOOLINGEN D (2019). *Mycobacterium bovis* in humans and *M. tuberculosis* in animals in Nigeria: an overview from 1975-2014. *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, **23**(11):1162–1170.
- CAMANES G, JOLY A, FOURICHON C, BEN ROMDHANE R, EZANNO P (2018). Control measures to prevent the increase of paratuberculosis prevalence in dairy cattle herds: an individual-based modelling approach, *Vet. Res.*, **49**(1):60.
- CARNEIRO PAM, DE MOURA SOUSA E, VIANA RB, MONTEIRO BM, DO SOCORRO LIMA KZAM A, DE SOUZA DC, FILHO JDR, COELHO AS, JORDAO RS, TAVARES MRM, KANEENE JB (2021). Study on supplemental test to improve the detection of bovine tuberculosis in individual animals and herds. *BMC Vet. Res.*, **17**(1): 1-8.
- CHAMBERS MA, WILLIAMS A, GAVIER-WIDEN D, WHELAN A, HUGHES C, HALL G, LEVER MS, MARSH PD, HEWINSON RG (2001). A guinea pig model low dose *Mycobacterium bovis* aerogenic infection. *Vet. Microbiol.* **80**:213-226.
- CHAUBEY KK, GUPTA RD, GUPTA S, SINGH SV, BHATIA AK, JAYARAMAN S, KUMAR N, GOEL A, RATHORE AS, SOHAL JS, STEPHEN BJ, SINGH M, GOYAL M, DHAMA K, DERAKHSHANDEH A (2016). Trends and advances in the diagnosis and control of paratuberculosis in domestic livestock. *Vet. Q.*, **36**:203-227.
- CORNELI S, DI PAOLO A, VITALE N, TORRICELLI M, PETRUCCI L, SEBASTIANI C, CIULLO M, CURCIO L, BIAGETTI M, PAPA P, COSTARELLI S, CAGIOLA M, DONDO A AND MAZZONE P (2021) Early Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Infected Cattle: Use of Experimental Johnins and Innovative Interferon-Gamma Test Interpretative Criteria. *Front. Vet. Sci.* **8**:638890.
- CORNER, GORMLEY E, PFEIFFER DU (2012). Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: conditions for maximising the number of positive cultures. *Vet Microbiol.* **156**:162–171.
- COROS A, DECONNO E, DERBYSHIRE KM (2008). IS6110, a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific insertion sequence, is also present in the genome of *Mycobacterium smegmatis*, suggestive of lateral gene transfer among mycobacterial species. *J Bacteriol.* **190**(9):3408-3410.
- COSTA P, BOTELHO A, COUTO I, VIVEIROS M, INACIO J (2014). Standing of nucleic acid testing strategies in veterinary diagnosis laboratories to uncover *Mycobacterium tuberculosis* complex members. *Front. Mol. Biosci.*, **1**:16.
- COUSINS DV (2001). *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev Sci Tech.* **20**:71-85.

- COUSINS DV, BASTIDA R, CATALDI A, QUSE V, REDROBE S, DOW S, DUIGNAN P, MURRAY A, DUPONT C, AHMED N, COLLINS DM, BUTLER WR, DAWSON D, RODRIGUEZ D, LOUREIRO J, ROMANO MI, ALITO A, ZUMARRAGA M, BERNARDELLI A (2003). Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *IJSEM*, **53**(Pt5):1305-1314.
- COUSSENS PM, VERMAN N, COUSSENS M A, ELFTMAN MD, MCNULTY AM (2004). Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. *Infect. Immun.*, **72**(3):1409-1422.
- COURCOUL A, MOYEN JL, BRUGERE L, FAYE S, HENAULT S, GARES H, BOSCHIROLI ML (2014). Estimation of sensitivity and specificity of bacteriology, histopathology and PCR for the confirmatory diagnosis of bovine tuberculosis using latent class analysis. *PLoS One*, **9**(3):e90334.
- CRUZ-ESTUPINAN SE, LANCHEROS BUITRAGO DJ, BULLA-CASTANEDA DM, GARCIA CORREDOR DJ, PULIDO-MEDELLIN MO (2022). Serological diagnosis and risk factors associated with bovine paratuberculosis in the municipality of Tuta, Colombia. *Iran. J. Vet. Sci. Technol.*, **14**(2):38-46.
- ÇAKIR Ş (2021). Sığır Tüberkülozünün Enfeksiyon Dinamiklerine Dayalı Epidemiyolojik Model Geliştirme. Doktora Tezi. Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- DE LA RUA-DOMENECH R, GOODCHILD AT, VORDERMEIER HM, HEWINSON RG, CHRISTIANSEN KH, CLIFTON-HADLEY RS (2006). Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests,  $\gamma$ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques, *Res. Vet. Sci.*, **81**(2):190-210.
- DE LACERDA ROBERTO JP, LIMEIRA CH, DA COSTA BARNABE NN, SOARES RR, SILVA MLCR, DE BARROS GOMES AA, DOS SANTOS HIGINO SS, DE AZEVEDO SS, ALVES CJ (2021). Antibody detection and molecular analysis for *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (MAP) in goat milk: Systematic review and meta-analysis. *Res. Vet. Sci.* **135**:72–77.
- DIEGUEZ FJ, GONZALEZ AM, MENENDEZ S, VILARA MJ, SANJUANA ML, YUS E, ARNAI I (2009). Evaluation of four commercial serum ELISAs for detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infection in dairy cows. *Vet J.* **180**(2): 2231-235.
- DOW CT (2012). *M. paratuberculosis* heat shock protein 65 and human diseases: bridging infection and autoimmunity. *Autoimmune Dis.* 2012.
- DUIGNAN A, KENNY K, BAKKER D, GOOD M (2019). Tuberculin PPD potency assays in naturally infected tuberculous cattle as a quality control measure in the Irish bovine tuberculosis eradication programme. *Front. Vet. Sci.*, **6**:328.

- EAMENS G, MARSH I, PLAIN K, WHITTINGTON R (2015). Australian and New Zealand standard diagnostic test protocols. Paratuberculosis (Johne's disease) Subcommittee on Animal Health Laboratory Standards. ErişimAdresi: [[http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/animal/ahl/anzsdpjohnes-disease\\_july-2015.pdf](http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/animal/ahl/anzsdpjohnes-disease_july-2015.pdf)]. Erişim Tarihi: 3/10/2022
- ELMAGZOUB WA, ADAM NM, IDRIS SM, MUKHTAR ME, AB DELAZIZ SA, OKUNI JB, OJOK L, ABD EL WAHED A, ELTAYEB E, GAMEEL AA, ELTOM KH (2020). Seroprevalence of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in Dairy Cattle in Khartoum State, Sudan. *Vet. Sci.* 2020;**7**(4):209.
- EISENBERG T, NESSELER A, SAUERWALD C, KLING U, RIBE K, KAIM U, ALTHOFF G, FIEGE N, SCHLEZ K, HAMANN HP, FAWZY A, MOSER I, RIBE R, KRAFT G, ZSCHÖCK M, MENGE C (2016). *Mycobacterium tuberculosis* exposure of livestock in a German dairy farm: implications for *intra vitam* diagnosis of bovine tuberculosis in an officially tuberculosis-free country. *Epidemiol. Infect.*, **144**:724–731.
- ERGANİŞ O, (1993). Veteriner Epidemiyoloji. In: Sensitivite ve Spesifite Arasındaki İliŐki. Ed.: Erganiş, O. 1. Baskı. Mimoza Yayıncılık, Konya. S.:57-59.
- FAN L, CHEN Z, HAO XH, HU ZY, XIAO HP (2012). Interferon-gamma release assays for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **65**(3):456-66.
- FECHNER K, DREYMANN N, SCHIMKOWIAK S, CZERNY CP, TEITZEL J (2019). Efficacy of dairy on-farm high-temperature, short-time pasteurization of milk on the viability of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*. *J Dairy Sci.***102**:11280–11290.
- FECTEAU ME (2018). Paratuberculosis in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* **34**:209–222.
- FERNANDEZ-SILVA JA, CORREA-VALENCIA NM, RAMIREZ NF (2014). Systematic review of the prevalence of paratuberculosis in cattle, sheep, and goats in Latin America and the Caribbean. *Trop Anim Health Prod.* **46**(8):1321-1340.
- FRAU J, COSSU D, COGHE G, LOREFICE L, FENU G, MELIS M, PACCAGNINI D, SARDU C, MURRU MR, TRANQUILLI S, MARROSU MG, SECHI LA, E COCCO E (2013). *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* and multiple sclerosis in Sardinian patients: epidemiology and clinical features. *Mult Scler.* **19**:1437–42.
- FUJIKI A (2001). Direct smear examination. In: TB Bacteriology Examination to Stop TB. The Research Institute of Tuberculosis, ed. Fujiki A, Japan International Cooperation Agency JINNOU Co.7.
- GAGNEUX S (2012). Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, *Biol. Sci.* **367**(1590):850-859.

- GARCIA AB, SHALLOO L (2015). Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *Int. J. Dairy Sci.* **98**(8):5019–5039.
- GARVEY M (2018). *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*: a possible causative agent in human morbidity and risk to public health safety, *Open Vet. J.*, **8**(2):172–181.
- GERRARD ZE, SWIFT BMC, BOTSARIS G, DAVIDSON RS, HUTCHINGS MR, HUXLEY JN, REES CED (2018). Survival of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* in retail pasteurised milk. *Food Microbiol.* **74**:57–63.
- GILARDONI LR, PAOLICCHI FA, MUNDO SL (2012). Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests. *Rev Argent Microbiol.* **44**:201-215.
- GOODCHILD AV, DOWNS SH, UPTON P, WOOD JL, DE LA RUA-DOMENECH R (2015). Specificity of the comparative skin test for bovine tuberculosis in Great Britain. *Vet Rec.*; **177**(10):258.
- GOOD M, BAKKER D, DUIGNAN A, COLLINS DM (2018). The history of in vivo tuberculin testing in bovines: tuberculosis, a “One Health” issue. *Front. Vet. Sci.*, **5**:59.
- GORMLEY E, DOYLE MB, MCGILL K, COSTELLO E, GOOD M, COLLINS JD (2004). The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, **102**:413-420.
- GORMLEY E, DOYLE MB, FITZSIMONS T, MCGILL K, COLLINS JD (2006). Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Vet. Microbiol.* **112**:171-179.
- GROENENDAAL H, ZAGMUTT FJ, PATTON EA, WELLS SJ (2015). Cost-benefit analysis of vaccination against *Mycobacterium avium* spp. paratuberculosis in dairy cattle, given its cross-reactivity with tuberculosis tests. *J. Dairy Sci.*, **98**(9):6070-6084.
- GÜNAYDIN E, GÜVEN GÖKMEN T (2021). Sığır Paratüberkülozu, Epidemiyoloji, İzleme ve Eradikasyon Stratejileri. Ed. Ergün Y. *Sütçü Sürülerde Sürdürülebilir Sürü Sağlığında Primer Önem Sahip Hastalıklar, Epidemiyoloji, İzleme ve Eradikasyon Stratejileri*. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri. p.27-35.
- HASHEM Z, SOLIMAN R, ABD EL AZIZ M, BADR Y, ABOUL-ELLA H (2022). Development of a monoclonal antibodies-based interferon-gamma enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for rapid and accurate diagnosis of bovine tuberculosis.
- HUMBLET MF, GILBERT M, GOVAERTS M, FAUVILLE-DUFAUX M, WALRAVENS K, SAEGERMAN C (2010). New assessment of bovine tuberculosis risk factors in Belgium based on nationwide molecular epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, **48**:2802–2808.

- HUMBLET MF, BOSCHIROLI ML, SAEGERMAN C (2009). Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. *Vet. Res.*,**40**(5)
- IMADA J, KELTON FD, BARKEMA HW (2020). Epidemiology, Global Prevalence and Economics of the Infection. In *Paratuberculosis, Organism, Disease, Control*, 2nd ed.; Behr, M.A., Stevenson, K., Kapur, V., Eds.; CABI Publishing: Wallingford, Oxfordshire, UK, pp. 1–13.
- ISLAM SKS, RUMI TB, KABIR SML, VAN DER ZANDEN AGM, KAPUR V, RAHMAN AKMA, WARD MP, BAKKER D, ROSS AG, RAHIM Z (2020). Bovine tuberculosis prevalence and risk factors in selected districts of Bangladesh. *PLoS One*. 2020 Nov 10;**15**(11):e0241717.
- JUNGERSEN G, HUDA A, HANSEN JJ, LIND P (2002). Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **9**:453-460.
- KALIS CHJ, COLLINS MT, HESSELINK JW, BARKEMA HW (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. *Vet. Microbiol.*, **97**: 73-86.
- KARADELİ N (2016). *Mycobacterium tuberculosis* Complex suşlarının genotiplendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- KARAKAŞ B (2017). Kırklareli yöresi süt sığırlarında subklinik Paratüberkülozun seroprevalansı. Yüksek lisans tezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- KARATAY M, AKYÜZ E, GÖKCE G (2020). Seroprevalence of paratuberculosis in cattle in ardahan region. *Kocatepe Vet. J.*, **13**(4):327-331.
- KAWAJI S, NAGATA R, MINEGISHI Y, SARUYAMA Y, MITA A, KISHIZUKA S, SAITO M, MORI Y (2020). A novel real-time PCR-based screening test with pooled fecal samples for bovine Johne's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, **58**(12): e01761-20.
- KOETS AP, EDA S, SREEVATSAN S (2015). The within host dynamics of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* infection in cattle: where time and place matter. *Vet Res.* **46**:61.
- KOETS AP, GRÖHN YT (2015). Within- and between-host mathematical modeling of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (MAP) infections as a tool to study the dynamics of host-pathogen interactions in bovine paratuberculosis. *Vet Res.* **46**:60.
- KUBICA T, RUSCH-GERDES S, NIEMANN S (2003). *Mycobacterium bovis subsp. caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J. Clin. Microbiol.* **41**:3070-3077.

- LAHUERTA-MARIN A, GALLAGHER M, MCBRIDE S, SKUCE R, MENZIES F, MCNAIR J, MCDOWELL SWJ, BYRNE AW (2015). Should they stay, or should they go? Relative future risk of bovine tuberculosis for interferon-gamma test-positive cattle left on farms. *Vet. Res.*, **46**:90.
- LEE KW, JUNG BY (2009). Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle in Korea. *Vet Rec.* **165**(22):661-662.
- LIEVAART-PETERSON K, LUTTIKHOLT S, GONGGRIJP M, RUULS R, RAVESLOOT L, KOETS AP (2019). *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* DNA and Antibodies in Dairy Goat Colostrum and Milk. *Vet Sci.*; **6**(4):96.
- LULU D, HUSSEN M (2022). Review on microbial genetics and virulence factors of mycobacterium bovis. *IJBB*; **4**(1):22-27.
- MAKAV M, GÖKÇE E (2013). Kars yöresi sığırlarında subklinik paratuberkülozun seroprevalansı. *Kafkas univ Vet Fak Derg.* **19**(5):913-916.
- MAZZONE P, CORNELI S, DI PAOLO A, MARESCA C, FELICI A, BIAGETTI M, CIULLO M, SEBASTIANI C, PEZZOTTI G, LEO S, RICCHI M, ARRIGONI N (2018). Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the intermediate and final digestion products of biogas plants. *J Appl Microbiol.* **125**:36-44.
- MCCALLAN L, BROOKS C, BARRY C, COUZENS C, YOUNG FJ, MCNAIR J, BYRNE AW (2021). Serological test performance for bovine tuberculosis in cattle from herds with evidence of on-going infection in Northern Ireland. *PLoS One.* **16**(4):e0245655.
- MCALOON CG, ROCHE S, RITTER C, BARKEMAC HW, WHYTEA P, MOREA SJ, O'GRADY L, GREEN MJ, DOHERTY ML (2019). A review of paratuberculosis in dairy herds-part 1-2: epidemiology, on-farm control. *The Vet J.* **246**:54-65.
- MENZIES FD, NEILL SD. (2000). Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J.*, **160**: 92-106.
- MEDEIROS LS, MARASSI CD, FIGUEIREDO EES, LILENBAUM W (2010). Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis in Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, **41**:531-541.
- MOGHADAM MT, SARV S, MOOSAKHANI F, BADIIE A (2010). Detection of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Milk and faecal Samples in Dairy Cattle by PCR and Nested-PCR. *J Anim Vet Adv.*, **9**(24):3055-3061.
- MOHAMED A (2020). Bovine tuberculosis at the human–livestock–wildlife interface and its control through one health approach in the Ethiopian Somali Pastoralists: A review, *One Health*, **9**:100113.

- MORTIER RA, BARKEMA HW, DE BUCK J (2015). Susceptibility to and diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in dairy calves: a review. *Prev. Vet. Med.*, **121**(3-4):189-198.
- MOYANO RD, ROMERO MA, COLOMBATTI OLIVIERI MA, ALVARADO PINEDO MF, TRAVERÍA GE, ROMANO MI, ALONSO MN (2021). Development and Validation of a Novel ELISA for the Specific Detection of Antibodies against *Mycobacterium avium* Subspecies paratuberculosis Based on a Chimeric Polyprotein. *Vet Med Int.* **2021**:7336848.
- NIELSEN SS, ENEVOLDSEN C, GRÖHN YT (2002). The *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis ELISA response by parity and stage of lactation. *Prev. Vet. Med.*, **54**: 1–10.
- NIELSEN SS (2010). Immune-based diagnosis of paratuberculosis. In: Behr MA, Collins DM. (Eds), *Paratuberculosis: organism, disease, control*. Oxfordshire Wallingford, UK: CAB International, p: 284-293.
- NIELSEN SS, TOFT N (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- $\gamma$  assay and faecal culture techniques. *Vet. Microbiol.* **129**(3–4):217–235.
- NIELSEN SS, TOFT N (2009). Review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev Vet Med*, **88**:1-14.
- O’HAGAN MJH, MATTHEWS DI, LAIRD C, MCDOWELL SWJ (2016). Farmers’ beliefs about bovine tuberculosis control in Northern Ireland. *Vet. J.*, **212**:22–26.
- OIE (2022). Mammalian tuberculosis. Terrestrial Manuel. Chapter 3.1.13.
- OIE (2018). Bovine tuberculosis. Terrestrial Manuel. Chapter 3.4.6.
- OIE (2021). Paratuberculosis (Johne’s disease). Terrestrial Manuel. Chapter 3.1.15.
- OIE-WAHIS (2022). Dünya Hayvan Sağlığı Bilgi Sistemi. Erişim adresi: [<https://wahis.woah.org/#/report-smr>]. Erişim tarihi: 02/12/2022
- ORUENE IS, NDUKWE SC (2020). An assessment of meat inspection for bovine tuberculosis and the functional conditions of major abattoirs/ slaughter slabs in rivers state. *BSJ Agri*, **3**(3):205-210.
- OZSVARI L, LANG Z, MONOSTORI A, KOSTOULAS P, FODOR I (2020). Bayesian estimation of the true prevalence of paratuberculosis in Hungarian dairy cattle herds. *Prev. Vet. Med.*; **183**:105124.
- ÖZBEY G, KALENDER H, MUZ A (2008). Sığır Tüberkülozunun epidemiyolojisi ve teşhisi. *F.Ü. Sağlık Bilim. Derg.*, **22**(5):307 – 314.

- ÖZTÜRK D, PEHLİVANOĞLU F, TOK AA, GUNLU S, GULDALI Y, TURUTOĞLU H (2010a). Sero prevalence of paratuberculosis in the Burdur province (Turkey), in dairy cattle using the enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA). *Israel J Vet Med*, **65**: 53-57.
- ÖZTÜRK D, PEHLİVANOĞLU F, KALE M, TOK AA, GULDALI Y, TURUTOĞLU H (2010b). In Vitro Diagnosis of Bovine Tuberculosis by  $\gamma$ -Interferon Assay. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **16**(5):875-878.
- PAOLICCHI A, ZUMARRAGA MJ, GIOFFRE A, ZAMORANO P, MORSELLA C, VERNA A, CATALDI A, ALITO A, ROMANO M (2003). Application of Different Methods for the Diagnosis of Paratuberculosis in a Dairy Cattle Herd in Argentina. *J Vet Med. B* **50**:20-26.
- PATERSSON AB (1959). Tuberculosis bacteriology in infectious disease of animals; Disease due to bacteria by stable forth, A.W. and Golloway, I:A. *Buttherworths scientific publication*, London, **2**:671-687.
- PEARSON JKL, MC CLELLAND TG (1962). Studies on Johne's disease in cattle Northern Ireland: In diagnosis of nonclinical infections. Serological and allergic test in Northern Ireland. *Brit. Vet. J.* **118**:98-106.
- PHANSE Y, WU CW, VENTURINO AJ, HANSEN C, NELSON K, BRODERICK SR, STEINBERG H, TALAAT AM (2020). A protective vaccine against Johne's disease in cattle. *Microorganisms*, **8**(9):1427.
- POLLOCK JM, MACNAIR J, WELSH MD, GIRVIN RM, KENNEDY HE, MACKIE DP, NEILL SD (2001). Immune response in bovine tuberculosis. *Tuberculosis*. **81**:103-107.
- POLLOCK JM, NEILL SD (2002). *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet. J.*, **163**:115-127.
- PRAUD A, BOSCHIROLI ML, MEYER L, GARIN-BASTUJI B, DUFOUR B (2015). Assessment of the sensitivity of the gamma interferon test and the single intradermal comparative cervical test for the diagnosis of bovine tuberculosis under field conditions. *Epidemiol. Infect.*, **143**(1):157-166.
- POURMAHDI BORUJENI M, HAJI HAJIKOLAEI MR, GHORBANPOOR M, ELHAEI SAHAR H, BAGHERI S, ROVEYSHEDZADEH S (2021). Comparison of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infection in cattle, sheep and goats in the Khuzestan Province of Iran: Results of a preliminary survey. *Vet. Med. Sci.* **7**(5):1970-1979.
- RASMUSSEN P, BARKEMA HW, MASON S, BEAULIEU E, HALL DC (2021). Economic losses due to Johne's disease (paratuberculosis) in dairy cattle. *Int. J. Dairy Sci.* **104**(3): 3123-43.

- RATHNAIAH G, ZINNIEL DK, BANNANTINE JP, STABEL JR, GRÖHN YT, COLLINS MT, BARLETTA RG (2017). Pathogenesis, molecular genetics, and genomics of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, the etiologic agent of Johne's disease. *Front. Vet. Sci.*, **4**:187.
- RECHT J, SCHUENEMANN VJ, SANCHEZ-VILLAGRA MR (2020). Host diversity and origin of zoonoses: the ancient and the new. *Animals (Basel)*. **10**:1672.
- RESMİ GAZETE (1978). Sığır Tüberkülozu Yönetmeliği. 09 Kasım 1978. Sayı: 16458. Erişim adresi: [<https://www.resmigazete.gov.tr/arsiv/16458.pdf>]. Erişim tarihi: 10/09/2022
- RESMİ GAZETE (2009). Sığır Bovine Tüberkülozu Yönetmeliği. 02 Nisan 2009. Sayı: 27188 Erişim adresi: [<https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2009/04/20090402-2.htm>]. Erişim tarihi:4/6/2022
- RITACCO V, LOPEZ B, DE KANTOR IN, BARRERA L, ERRICO F, NADER A (1991). Reciprocal cellular and humoral immune responses in Bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.*, **50**:365–367.
- RADOSTITS O, GAY C, HINCHCLI K, CONSTABLE P (2007). *Veterinary Medicine*, 10th ed.; Saunders: Philadelphia, PA, USA.
- RODRIGUEZ-CAMPOS S, GONZALEZ S, JUAN L, ROMERO B, BEZOS J, CASAL C, ALVAREZ J, FERNANDEZ-DE-MERA IG, CASTELLANOS E, MATEOS A, SAEZLLORENTE JL, DOMINGUEZ L, ARANAZ A, THE SPANISH NETWORK ON SURVEILLANCE MONITORING OF ANIMAL TUBERCULOSIS (2012) A database for animal tuberculosis (mycoDB.es) within the context of the Spanish national programme for eradication of bovine tuberculosis. *Infect. Genet. Evol.*, **12**:877–882.
- SANCHEZ-CARVAJAL JM, GALAN-RELANO A, RUEDAS-TORRES I, JURADO-MARTOS F, LARENAS-MUNOZ F, VERA E, GOMEZ-GASCON L, CARDOSO-TOSET F, RODRIGUEZ-GOMEZ IM, MALDONADO A, CARRASCO L, TARRADAS C, GOMEZ-LAGUNA J, LUQUE I (2021). Real-Time PCR validation for *Mycobacterium tuberculosis* complex detection targeting IS6110 directly from bovine lymph nodes. *Front. Vet. Sci.*, **231**.
- SAYIN Z, ERGANİŞ O (2010). Sığır Tüberkülozünün Teşhisinde Kullanılan Metotlar. *Kocatepe Vet J.* **3**(2):77-82.
- SAYIN Z (2010). Sığır Tüberkülozünün Farklı Metotlar ile Karşılaştırmalı Teşhisi. Doktora Tezi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- SCANU AM, BULL TJ, CANNAS S, SANDERSON JD, SECHI LA, DETTORI G, ZANETTI S, HERMON-TAYLOR J (2007). *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* infection in cases of irritable bowel syndrome and comparison with Crohn's disease and Johne's disease: common neural and immune pathogenicities. *J Clin Microbiol.*, **45**(12):3883–3890.

- SECHI LA, DOW CT (2015). *Mycobacterium avium* ss. paratuberculosis Zoonosis—the hundred year war—beyond Crohn’s disease. *Front Immunol.*, **6**:96.
- SHAHMORADI AH, AREFPAJOHI REZA, TADAYON K, MOSAVARI N (2008). Paratuberculosis in Holstein-Friesian cattle farms in Central Iran. *Trop. Anim. Health Prod.* **40**:169-173.
- SHITTU A, CLIFTON-HADLEY RS, ELY ER, UPTON PU, DOWNS SH (2013). Factors associated with bovine tuberculosis confirmation rates in suspect lesions found in cattle at routine slaughter in Great Britain, 2003–2008. *Prev. Vet. Med.*, **110**:395– 404.
- SHIPPY DC, LEMKE JJ, BERRY A, NELSON K, HINES ME, TALAAT AM (2017). Superior protection from live-attenuated vaccines directed against Johne's disease. *CVI*, **24**(1):e00478-16.
- SRINIVASAN S, JONES G, VEERASAMI M, STEINBACH S, HOLDER T, ZEWUDE A, FROMSA A, AMENI G, EASTERLING L, BAKKER D, JULEFF N, GIFFORD G, HEWINSON RG, VORDERMEIER HM, KAPUR V (2019). A defined antigen skin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Sci Adv.*; **5**(7):eaax4899.
- SISTO M, CUCCI L, D’AMORE M, DOW TC, MITOLO V, LISI S (2010). Proposing a relationship between *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection and Hashimoto’s thyroiditis. *Scand J Infect Dis.*, **42**:787–90.
- SMITH K, KLEYNHANS L, WARREN RM, GOOSEN WJ, MILLER M A (2021). Cell-mediated immunological biomarkers and their diagnostic application in livestock and wildlife infected with *Mycobacterium bovis*. *Front. Immunol.*, **12**:483.
- STABEL JR, KIMURA K, ROBBE-AUSTERMAN S (2007). Augmentation of secreted and intracellular gamma interferon following Johnin purified protein derivative sensitization of cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Vet Diagn Invest.*, **19**:43–51.
- STABEL JR (2006). Host responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a complex arsenal. *Anim Health Res Rev.*, **7**:61–70.
- STABEL JR, ROBBE-AUSTERMAN S (2011). Early immune markers associated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in a neonatal calf model. *Clin. Vaccine Immunol.*, **18**:393-405.
- STEVENSON K (2010). Diagnosis of Johne’s disease: Current limitations and prospects. *Cattle Pract.*, **18**:104-109.
- SUN WW, LV WF, CONG W, MENG QF, WANG CF, SHAN XF, QIAN AD (2015). *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* and Bovine Leukemia Virus Seroprevalence and Associated Risk Factors in Commercial Dairy and Beef Cattle in Northern and Northeastern China. *Biomed Res Int.* **2015**:315173.

- SWEENEY RW (2011). Pathogenesis of Paratuberculosis. *Vet. Clin. N. Am. – Food Anim. Pract.* **27**(3):537–46.
- ŞABABOĞLU E (2019). *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* Enfeksiyonu Teşhis Edilen Koyunların Gama-interferon, İnterlöykin-10 ve Neopterin Düzeyleri. Doktora Tezi. Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- THOEN CO, STEELE JH, KANEENE JB (2014). (eds.) Zoonotic tuberculosis: *Mycobacterium bovis* and other pathogenic mycobacteria. 3rd ed. Ames, Iowa: Wiley Blackwell.
- THOMAS J, BALSEIRO A, GORTAZAR C, RISALDE MA (2021). Diagnosis of tuberculosis in wildlife: a systematic review. *Vet. Res.*, **52**:1-23.
- TOB GENELGE, (2022). Hayvan Hastalıkları ile Mücadele ve Hayvan Hareketleri Kontrolü Genelgesi. Erişim ad: [<https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Duyuru/463/2022>]. Erişim tarihi: 08/11/2022
- TÜTÜNCÜ M, KILIÇOĞLU Y, GÜZEL M, PEKMEZCİ 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.
- VAN DEN ESKER MH, KOETS AP (2019). Application of transcriptomics to enhance early diagnostics of mycobacterial infections, with an emphasis on *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*, *Vet. Sci.*, **6**(3):59.
- VAZQUEZ P, GARRIDO JM, JUSTE RA (2013). Specific Antibody and Interferon-Gamma Responses Associated with Immunopathological Forms of Bovine Paratuberculosis in Slaughtered Friesian Cattle. *PLoS ONE* **8**(5):e64568.
- VORDERMEIER M, GOODCHILD A, CLIFTON-HADLEY R, DE LA RUA R (2004). The interferon-gamma field trial: background, principles and progress. *Vet Rec.*, **155**:37–38.
- VURAL B, ATALA N, ÇELEBİ M (1995). Sığırlarda Paratüberkülozun Serolojik, Allerjik ve Bakteriyolojik Muayene Yöntemleri ile Mukayeseli Olarak Araştırılması. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg.*, **8**(1):19-44.
- WADDELL LA, RAJIC A, STARK KD, MCEWEN SA (2015). The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*: a systematic review and meta-analyses of the evidence. *Epidemiol Infect.* **143**:3135–57.
- WEBER MF, VERHOEFF J, VAN SCHAIK G, VAN MAANEN C (2009). Evaluation of Ziehl–Neelsen stained faecal smear and ELISA as tools for surveillance of clinical paratuberculosis in cattle in the Netherlands. *Prev. Vet. Med.*, **92**(3):256-266.

- WELSH DM, CUNNINGHAM RT, CORBET, DM, GIRVIN RM, MCNAIR J, SKUCE R, BRYSON DG, POLLOCK JM (2005). Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral responses in bovine tuberculosis. *Immunology*, **114**:101–111.
- WHITTINGTON RJ, BEGG DJ, DE SILVA K, PURDIE AC, DHAND NK, PLAIN KM (2017). Case definition terminology for paratuberculosis (Johne's disease). *BMC Vet. Res.*, **13**:328.
- WHO (2018). Global tuberculosis report. Erişim ad: [<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274453/9789241565646-eng.pdf>]. Erişim tarihi: 28/11/2022
- WHO (2022). Global tuberculosis report. Erişim adresi: [<https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosisreport-2022>]. Erişim tarihi: 03/12/2022
- WHO, FAO, OIE, THE UNION (2017). Erişim adresi: [<https://www.who.int/publications/i/item/9789241513043>]. Erişim tarihi: 03/12/2022
- WOOD PR, JONES SL (2001). BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, **8**:147-155.
- XIN T, JIA H, DING J, LI P, YANG H, HOU S, YUAN W, GUO X, WANG H, LIANG Q, LI M, WANG B, ZHU H (2013). Assessment of a protein cocktail-based skin test for bovine tuberculosis in a double-blind field test in cattle. *Clin Vaccine Immunol.*, **20**(4):482-90.
- YARDIMCI H (2006). Mycobacterium enfeksiyonları. *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)*. Ed.: Aydın N ve Paracikoğlu J, 1. Baskı. Ankara. İlke-Emek Matbacılık ve Yayıncılık. S.: 87-107.
- YILDIRIM D, CİVELEK T (2013). Prevalence of subclinical paratuberculosis in dairy cattle in Uşak Region. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, **19**(1):121-126.
- ZAHARAN RN, BEHIRY AE, MARZOUK E, ASKAR T (2014). Comparison of LCD array and IS6110-PCR with conventional techniques for detection of Mycobacterium bovis isolated from Egyptian cattle and Buffaloes. *Int J Mycobacteriol*, **3**:197 –204.

# ETİK KURUL

Ek-1



T.C.  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul

## HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

**TOPLANTI TARİHİ** : 14/07/2021  
**TOPLANTI NO** : 2021-13  
**DOSYA NO** : 2021-76  
**KARAR NO** : 2021-13-106

Yürüttüğü Ankara Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Hakan YARDIMCI'nın yaptığı; araştırmacı olarak Veteriner Hekim Halil PİR'in katıldığı "Sığır Tüberküloz ve Paratüberküloz Enfeksiyonlarının Antemortem Tanı Yöntemleriyle Ayrımı" başlıklı çalışma Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliğin 2 (2) "b" maddesi kapsamında değerlendirilmiş ve çalışmanın Etik Kurul iznine tabi olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Geçerlilik Süresi : 16/07/2021 - 16/07/2023

ETİK KURUL ÜYELERİ			
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti
Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E
Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K
Prof. Dr. Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E
Prof. Dr. Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E
Prof. Dr. Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K
Doç. Dr. Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K
Doç. Dr. Halit KANCA (Üye)	Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E

Dr. Vet. Hek. Nigar YERLİKAYA (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	K
Dr. Vet. Hek. Gürbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E
Uzm. Vet. Hek. Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E
Uzm. Vet. Hek. Attila İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K