



**ERZURUM İLİNDE SÜT SIĞIRLARI VE RİSK GRUBU
İNSANLARDA *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSPECİES
PARATUBERCULOSIS'İN İZOLASYONU VE MIRU-
VNTR YÖNTEMİYLE GENOTİPLENDİRİLMESİ**

Yasemin ERDOĞAN
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Hakan USLU

Doktora Tezi-2022

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ERZURUM İLİNDE SÜT SIĞIRLARI VE RİSK GRUBU
İNSANLARDA *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSPECİES
PARATUBERCULOSIS'İN İZOLASYONU VE MIRU-VNTR
YÖNTEMİYLE GENOTİPLENDİRİLMESİ**

Yasemin ERDOĞAN

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Hakan USLU**

**ERZURUM
2022**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Taksonomi ve sınıflandırma	4
2.3. Epidemiyoloji.....	5
2.4. Patogeneze	7
2.5. Süt Sığırlarında Paratüberküloz	9
2.6. İnsanlarda Paratüberküloz.....	10
2.7. Teşhis Metodları	12
2.7.1.MAP Genotipik Sınıflandırma Yöntemleri.....	14
2.8. Koruma ve Kontrol	16
3. MATERYAL VE METOT.....	17
3.1. Örneklerin alınması ve testler	17
3.1.1. Örneklerin Alınması	17
3.1.2. Serolojik Analiz	18
3.1.3. Moleküler Teşhis	18
3.1.4. İzolasyon Çalışmaları	20

3.1.5. MIRU VNTR Analizi	20
3.2. Örneklerin işlenmesi ve testler	21
3.2.1 Serolojik Analiz	23
3.2.2. DNA Ekstraksiyonu	25
3.2.3. Real-time PCR	26
3.2.4. Bakteriyolojik Kültür ve İzolasyon.....	26
3.2.5. Klonal İlişkinin MIRU-VNTR Yöntemi ile Belirlenmesi	27
4. BULGULAR.....	29
4.1. Örneklerinin Alınması	29
4.2. Kan Örneklerinin ELISA Bulguları	30
4.3. Real time PCR Bulguları	30
4.4. Bakteriyolojik Kültürde İzolasyon.....	33
4.5. MIRU-VNTR Yöntemi Sonuçları	34
5. TARTIŞMA.....	38
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	44
KAYNAKLAR	46
EKLER	56
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	56
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	57
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	58
EK-4. ERİŞKİN HASTALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	59

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmaya, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Hakan USLU'ya en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tıbbi Mikrobiyoloji A.B.D kıymetli öğretim üyelerine ve çalışanlarına eğitimimde katkılarından dolayı teşekkür ederim .

Tez çalışmamın yapımı ve yazımı aşamalarında benimle birlikte mesai harcayan Dr. Ediz Kağan ÖZGEN'e, Prof. Dr. Bülent POLAT'a, Uzm. Biyolog Murat ÖZMEN'e, Doç.Dr.Seyda CENGİZ'e, Dr. Özgür DEMİR CİNİSLİ'ye çalışma sürecinde beni yalnız bırakmayan mesai arkadaşlarım Elif KARADENİZ PÜTÜR, Ersan PÜTÜR, Nebahat POLAT, Ramazan KUTLU, Selçuk BENKLİ, Recep AKINCI'ya teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Erzurum iline bağlı İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğünde çalışan meslektaşlarıma teşekkür ederim.

Tezimi TAGEM Projesi olarak destekleyen Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırma ve Geliştirmeler Genel Müdürlüğü'ne sonsuz şükranlarımı sunarım.

Doktora öğrenimim boyunca sabırla beni destekleyen saha çalışmalarında kar, kış soğuk demeden yanımda olan eşim Veteriner Hekim Selçuk ERDOĞAN'a oğullarım Emir Haktan ve Hamza Talha'ya, başarabilirsın telkinleriyle herdaim yanımda olan ablam Neslihan PAK'a kız kardeşim Özlem BAKIR'a teşekkür ederim.

Yasemin ERDOĞAN

ÖZET

Erzurum İlinde Süt Sığırları ve Risk Grubu İnsanlarda *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*'in İzolasyonu ve Miru-Vntr Yöntemiyle Genotiplendirilmesi

Amaç: Bu çalışmada, Erzurum yöresindeki hayvancılık işletmelerinde bulunan süt sığırlarında ve bu hayvanlarla yakın teması olan kişilerde Paratüberkülozis hastalığının etkeni olan *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* varlığının saptanması amaçlanmıştır. Bu etkenin zamanda insanlara bu yolla bulaşın söz konusu olup olmadığı ve bulaş söz konusu olması durumunda etkenin genetik kimliğinin ortaya konması ile insan ve hayvanlarda *M. avium* subsp. *paratuberculosis*'ın genetik yakınlığı araştırılmıştır.

Materyal ve Metot: Tez çalışmasının materyalini; Erzurum ilinde bulunan 24 aydan büyük, 420 adet ineğe ait defibrine kan, dışkı ve kan serumu numuneleri ile bu ineklerin bakıcıları veya bu hayvanlara ait ürünleri tüketen risk grubundaki 210 kişinin defibrine kan numuneleri oluşturdu. Sığır serumlarındaki antikor seviyeleri ELISA metodu ile tespit edildi. (Idexx Paratuberculosis Screening Ab Test) Real Time PCR yöntemi ile seropozitif tespit edilen inek ve insanlardan alınan defibrine kan örneklerinde IS900, Amplicon F57, Amplicon IV 0865 primer ve probler ile *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) DNA' sı araştırıldı. Seropozitif tespit edilen 24 adet ineğe ait dışkı örneklerinden MAP izolasyonu için mikrobiyolojik ekim yapıldı. Ayrıca real time PCR pozitif 7 kişiye ait kan örneklerinin Buffy-Coatları çıkarılarak mikrobiyolojik ekim yapıldı. Besiyerlerede MAP etkeni izole edilen insan ve hayvan örnekleri ekstraksiyon işlemine tabi tutularak DNA'ları elde edildi. Elde edilen MAP DNA'ların MIRU-VNTR ile tekrar sayılarına bakıldı.

Bulgular: 420 adet ineğin %5.7'si (n=24) seropozitif sonuç alındı. 220 adet insan kan numunesinden %3.3'ü (n=7) PCR pozitif olarak teşhis edildi. Seropozitif hayvan (n=6) ve PCR pozitif insan (n=7) numunelerinden toplam 13 adet MAP izole edildi. MIRU-VNTR yöntemi ile 6 farklı genotip tespit edildi.

Sonuç: Yapılan bu çalışma ile hasta hayvanlarla yakın teması olan kişilerde MAP etkeni saptandı. İnsan ve ineklerde tespit edilen MAP etkenlerinin genetik yakınlığı belirlendi. Bu çalışmadan elde edilen veriler ve literatür bildirimi dikkate alındığında bu etkenin Crohn hastalığı veya Otoimmün hastalıklarla ilişkili olabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Crohn hastalığı, ELISA, John hastalığı, MAP, MIRU-VNTR, Real Time PCR

ABSTRACT

Isolation and Genotyping of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Dairy Cattle and Risk Group Humans in Erzurum Province and Genotyping by Miru-Vntr Method

Aim: In this study, the aim is to determine the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP), which is the causative agent of paratuberculosis disease, in dairy cattle and people who have close contact with these animals in livestock farms in Erzurum. The genetic closeness of *M. avium subsp. paratuberculosis* in humans and animals was investigated by revealing the genetic identity of the agent in case of transmission, and whether this agent was transmitted to humans in this way at the time.

Material and method: The material of the thesis study consisted of defibrinated blood, feces and blood serum samples of 420 cows older than 24 months in Erzurum and defibrinated blood samples of 220 people in the risk group who consume the products of these cows or their caretakers. Antibody levels in bovine serum were determined by ELISA method. (Idexx Paratuberculosis Screening Ab Test) MAP DNA was investigated with IS900, Amplicon F57, Amplicon IV 0865 primers and probes in defibrinated blood samples taken from cows and humans, which were detected to be seropositive by Real Time PCR method. Microbiological cultivation was performed for MAP isolation from stool samples of 24 cows that were found to be seropositive. In addition, microbiological cultivation was performed by removing the Buffy-Coats of the blood samples of 7 PCR positive people. MAP DNAs were obtained by extracting human and animal samples from which the MAP agent was isolated in the medium. The number of repeats of the obtained MAP DNAs was checked with MIRU-VNTR.

Results: In this study, MAP agent was detected in people who had close contact with sick animals. Genetic resemblance of MAP agents detected in humans and cows was determined. Considering the data obtained from this study and literature reports, it was concluded that this factor may be related to Crohn's disease or Autoimmune diseases.

Key Words: Crohn Disease, ELISA, Johne Disease, MAP, MIRU-VNTR, real time PCR

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MAP	:	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>
%	:	Yüzde oranı
µl	:	Mikrolite
CD	:	Crohn Disease
CFU	:	Colony Forming Unit
dk	:	Dakika
ELISA	:	Enzyme-Linked-Immunosorbent
g	:	Gram
HEYM	:	Herold egg yolk medium
HGDI	:	Hunter-Gaston diversity index.
HPC	:	Hexadecylpyridinium chloride
JD	:	Johne Disease
ml	:	Mililitre
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
RFLP	:	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
rpm	:	Revolutions per Minute
rRNA	:	Ribozomal Ribonükleik Asit
UV	:	Ultraviyol

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. MAP bulaş döngüsü	7
Şekil 2.2. Hastalığın bulaşma döngüsü	9
Şekil 2.3 MAP tiplerinin terminolojisi ve sınıflandırılması	14
Şekil 3.1. TM Herrold's egg yolk agar slant (BBL).....	20
Şekil 3.2. Plazma tabakası ile ficoll paque plus katmanları arasında kalan buffy coat tabakası	23
Şekil 4.1. Örnek alınan insan sayılarının ilçelere göre dağılımları. Örnek alınan insan sayısının iki katı kadar sığırdan örnek alındı.	29
Şekil 4.2. Real time PCR metotlarının tespit limitlerine göre Ct değerlerinin görüntüsü	33
Şekil 4.3. Kültür pozitif koloni ve modifiye Ziehl-Neelsen boyama sonucunda mikroskopik görünüm	34
Şekil 4.4. Qiaxcel cihazında elektroforez görüntüsü	35
Şekil 4.5. MIRU-VNTR Sonucunda 13 <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> Suşarının Dendrogramı	36
Şekil.5.1. MAP etkeninin kökeni.....	42

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Çalışma Kapsamında Alınan Örneklerin İlçe ve Mahallelere Göre Dağılımı	17
Tablo 3.2. Materyal Olarak Alınan Örnek Türlerinin Hedef Canlı Türlerine Göre Dağılımları	18
Tablo 3.3. İndirekt ELISA Kit İçeriği	18
Tablo 3.4. DNA Ekstraksiyon Kiti İçeriği	19
Tablo 3.5. Real Time PCR Analizinde Kullanılan Primer ve Problar	19
Tablo 3.6. MIRU-VNTR Analizinde Kullanılan Primerler	21
Tablo 4.1. İndirekt ELISA ile Test Edilen Örneklerin İlçelere Göre Dağılımları ve Pozitiflik Oranları	30
Tablo 4.2. DNA konsatrasyonlarının Seri Dilusyonları Sonucunda Elde Edilen Ct Değerleri	32
Tablo 4.3. <i>Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis</i> Suşlarının MIRU-VNTR 8 Lokusundaki Allel Sayıları	35
Tablo 4.4. MIRU-VNTR sonucunda 13 <i>Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis</i> Örneğinin Allel Durumları ve HGDI Değerleri	37

1. GİRİŞ

Ruminantlarda Johne hastalığına neden olan *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) dünya çapında evcil hayvanlarda yaygın olan, oldukça bulaşıcı zoonoz bir hastalıktır. Hastalığın ekonomik kayıplarına bakıldığında; kronik ishal, ileri kaşeksi, süt ve döl veriminde düşme, ölüm, teşhis, tedavi, koruma ve kontrol programlarındaki giderler nedeniyle önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Özellikle sütçü sığırlar başta olmak üzere birçok evcil ve yabani ruminantlar ile geyik, tavşan gibi diğer hayvanları da etkilemektedir.¹⁻³ *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*'in geniş bir konakçı kitlesi olması, Johne Hastalığının kontrol altına alınmasını zorlaştırır. Bunun sebebi etkenin bulaşma hızının ve konakçının duyarlılığının fazla olmasıdır.⁴ Enfeksiyon belirtisi göstermeyen hasta hayvanlar birincil rezervuardır. Enfekte hayvanlar, etkeni dışkı ve süt ile çevreye saçarlar. Bulaşma; anneden yavruya fekal, oral, süt, kolostrum veya enfekte damızlık boğaların semeninden intraüterin yolla gerçekleşmektedir.⁵ Sığırlarda bulaşma, etkenin dışkıda saçılımına göre orta, hafif ve şiddetli saçılım olarak sınıflandırılırlar (<300 CFU / g, 300-3000 CFU / g > 3000 CFU / g).⁶ Buzağılarda yapılan deneysel bir çalışmada 10⁶ CFU / g düzeyinde etkenin oral yolla alınması sonucu hastalığın %100 oranında oluştuğu gözlemlenmiştir.⁷

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis*, ilk olarak 1895 yılında Johne ve Frothingham tarafından tanımlanmıştır.⁸ MAP, küçük (0.5x1.5 mikron), kısa ve kalın çomakçıklar şeklinde, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, Gram pozitif ve asite dirençli olup kültür ortamında üremesi oldukça yavaş olan bir bakteridir. Hücre duvarındaki lipid içeriği nedeniyle ısı, sıcaklık, UV gibi çevresel etkilere karşı dayanıklıdır. Toprakta 8 hafta, gübrede 35 hafta ve suda 74 hafta canlı kalabilmektedir.⁹

Tip I suşların yaygın olarak koyunlardan tespit edildiği ve yavaş üreme özelliği gösterdiği bildirilmektedir. Buna karşın Tip II izolatların sığır kökenli olduğu ve daha

hızlı ürettiği belirtilmektedir.¹⁰ Moleküler epidemiyoloji metotları ile genotiplendirmenin mümkün olduğu dönemde yapılan araştırmalarda *M. avium* subsp. *paratuberculosis*'in ana tipleri ve alt tipleri olduğu belirlenmiştir. *M. avium* subsp. *paratuberculosis*'in moleküler epidemiyolojisinde ve genotiplendirmesinde birçok metot kullanılmaktadır. Bakterinin birçok konakta hastalık belirtisi göstererek ya da göstermeksizin teşhis edilmiş olması, moleküler epidemiyolojik inceleme yapılarak bulaş kaynakları hakkında bilgi edinmeyi sağlayacaktır ¹¹

Enfeksiyon Crohn hastalığı olarak bilinen insan kronik granümatöz enteritinin Johne's hastalığı ile histopatolojik ve klinik benzerlikleri ve MAP'ın etiyolojisinde rolü nedeniyle önemli bir zoonoz olarak bilinmektedir.¹² İnsanlara bulaşma; etkenin ısı ve pastörizasyona dirençli olması, enfekte olan su kaynakları, süt ve süt ürünlerinin tüketimi veya hayvan bakıcılarının enfekte hayvanların dışkıları ile direkt teması sonucu gerçekleşmektedir.¹³ MAP ile ilişkili olan ve insanlarda görülen bu hastalığının etiyopatolojisi çok yönlüdür. MAP bir granülomu başlatabilir, moleküler taklit yoluyla otoantikorları uyarabilir ve diğerlerini aktive ederek bağışıklık dengesizliğini güçlendirerek insanlarda otoimmün kaynaklı birçok hastalığın oluşumuna katkı sağlayabilir.¹⁴⁻¹⁵

Bu tez çalışmasında; Erzurum Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü hinterlandında, Erzurum ilindeki ineklerde;

- MAP varlığının tespit edilmesi,
- Etkenin genetik kimliğinin ortaya çıkarılması,
- İnsan ve hayvanlarda MAP'ın genetik yakınlığının ortaya çıkarılması,
- Alınan örneklerden, hasta hayvanlarda hastalığın prevelansının belirlenmesi,
- Hastalıkla mücadele ve koruma kontrol önlemlerinde önemli bir basamağın sağlanması,

- Epidemiyolojik açıdan geleneksel usulde yetiştiriciliği yapılan hayvancılık işletmelerindeki bakıcıları ve bu hayvanlardan elde edilen hayvansal ürünleri tüketen kişilerde herhangi bir bulaşmanın söz konusu olup olmadığının araştırılması amaçlandı.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Paratüberküloz, ilk kez 1895 yılında Johne ve Frothingham tarafından kronik enteritisi olan bir inekte intestinal mukozanın yaygın kalınlaşması ve lezyonlarda asit fast boyanan çomakların varlığı ile tüberkülozun garip özel vakası olarak tarif edilmiştir. Bang (1906), bu hastalığı Tüberküloz olarak tanımlamış ve John hastalığı veya Psödotüberküloz diye adlandırmıştır. Kısa bir süre sonra bu etken paratüberküloz olarak tanımlanmıştır. Daha sonrasında ise etken kültürde üretildi, karakterize edildi ve deneysel olarak hastalığı oluşturmak için kullanıldı. Bu organizma orjinal olarak *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne* diye adlandırıldıktan sonraki süreçte *Mycobacterium johnei*, *Mycobacterium paratuberculosis* diye adlandırıldı. Son olarak *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* olarak adlandırılmaktadır.¹⁶

2.2. Taksonomi ve sınıflandırma

Mycobacteriaceae ailesinin *Mycobacterium avium* kompleksini; *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) olarak dört ayrı alt tipi vardır. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*'in alt tiplerinin oluşturulması DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları ve sayısal taksonomik analizlere dayandırılır. Her ne kadar *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium avium intercellare* kompleksinin içerisinde çoğunlukla gruplandırılrsa da *Mycobacterium intercellulare* farklı bir genetik türdür. Alt türler düzeyinde *Mycobacterium paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *silvaticum*'dan fenotipik olarak mikobaktin bağımlılığı bakımından ayrılır. Genotipik olarakta bir insertion elementi olan IS900 ün çoklu kopyalarının varlığı ile ayrılır.⁷

Mycobacteriaların rRNA genlerinin analizi bu genusun iki farklı kümeye bölünmesiyle sonuçlanmıştır. Buna bağlı geleneksel olarak hızlı büyüyen mikobakteriler

patojenik olmayan ve çevreden izole edilen suşlardır. Yavaş büyüyen mikobakterilerse patojen olarak adlandırılan çoğu mikobakteriyi barındırır. rDNA gen kopya sayıları da aynı zamanda mycobakterileri yavaş ve hızlı ve büyüyen ikiye ayrılmasını destekler. Hızlı büyüyen mikobakteriler iki set rRNA içerirken Mycobacterium paratüberkülozis *M. avium* içeren yavaş büyüyenler sadece bir kopya içerir. Diğer mikobakterilerde olduğu gibi rDNA genleri Mycobacterium paratüberküloziste tekli operonda bulunmuştur.¹⁶

2.3. Epidemiyoloji

Ruminantlar MAP için tercih edilen ve doğal konakçı gibi görünüyor olsada atlar, domuzlar, develer, köpekler ve insan dahil olmak üzere bu türlerde tek tük vakalar rapor edilmiştir. MAP ayrıca çok çeşitli yaban hayatı türlerinden izole edilmiştir.¹⁶ Enfeksiyon hakkında en çok ruminantlarda özellikle de süt sığırlarında araştırmaların yapılması diğer türlerde sınırlı araştırmalar yapılmış olması sığırlarda yaygınlığın gerçekten daha fazla olduğu sonucunda hata yapmamızı sağlayabilir.

MAP ile kontamine olmuş dışkının doğrudan yutulmasıyla veya dolaylı olarak MAP ile kontamine olmuş kolostrum, süt, su veya yem yoluyla fekal oral yolla bulaşır. Mikobakteriyel enfeksiyonlar arasında Paratüberkülozun belirgin olarak yaşa bağlı enfeksiyon duyarlılığı benzersizdir denmiştir. Muhtemelen yeni doğanlar için enfeksiyöz doz düşükken, yetişkinler için oldukça yüksektir. Bunun biyolojik temeli bilinmemekle birlikte muhtemelen MAP'ın konakçıya öncelikle Peyer plakları olarak bilinen bağırsak lenfoid dokusu yoluyla girdiği gözlemiyle ilgilidir. Her ne kadar etkenin üremesinin yaşa bağlı olduğu düşünülüp koruma ve kontrol önlemleri gençler için alınmış olsada yaşlı hayvanlarda da bulaşın aynı kolaylıkta olabileceği fikri ortaya atılmıştır.¹⁶

Yeni doğanlar için bulaşma MAP ile kontamine gübre ile kolostrum, süt su ve yem ile gerçekleşmektedir. Dışkı ile bulaşma haricinde hasta ineklerden yavrularına süt ve kolostrumla geçebilir.¹⁶

Sütlerin toplanması sırasında hastalığı ilerlemiş olan yetişkin ineklerin kolostrum ve sütünün diğer sağlıklı sütlerle karışması MAP'ın bulaşmasını mümkün kılar.¹⁷ Enfeksiyonun subklinik veya preklinik evrelerinde transuterin bulaşma mümkündür.¹⁸ Kısacası çiftlik yönetimi uygulamalarına bağlı olarak MAP enfeksiyon durumu birçok yolla yavrulara bulaşmayı sağlayabilir. En fazla risk altında olan hastalığı ilerlemiş MAP ile enfekte yaşlı dişilerin yavrularıdır.¹⁹

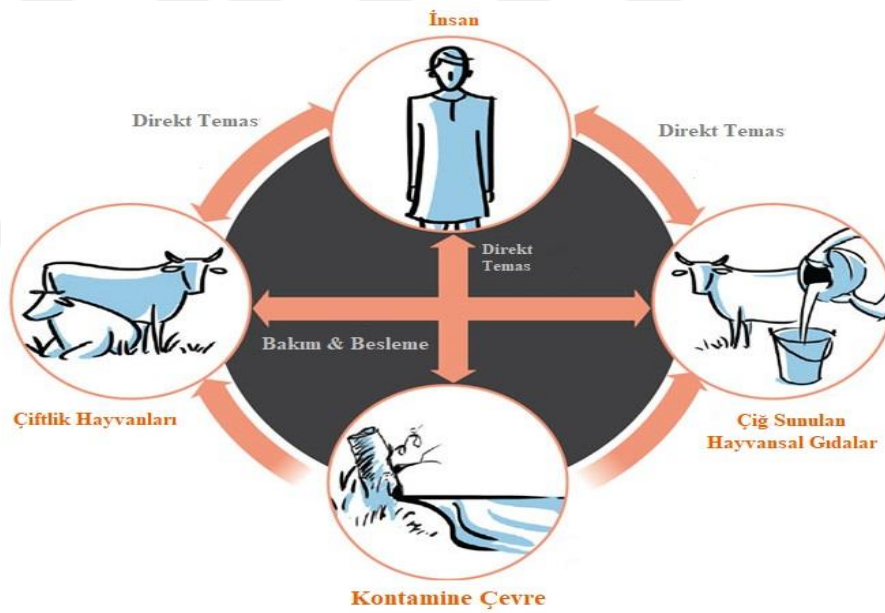
Paratüberkülozda hastalığın kuluçka süresi uzundur. Süt sığırlarında bu sürenin ortalama 5 yıl olduğu Avusturyalı araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur.²⁰ Paratüberkülozun epidemiyolojisi açısından en büyük riski, subklinik dönemde olan hayvanların hastalık belirtilerini göstermemesi nedeniyle hastalığı uzun süre çevreye bulaştırabilmesidir. Böylece hayvan sahibinin haberi olmadan tesisler kontamine olabilir ve çiftliklerde yeni doğanlar doğrudan veya dolaylı olarak MAP enfeksiyonuna maruz kalabilir. Bu tür hayvanların tespit edilerek itlaf edilmesi Paratüberküloz kontrol programının başarısının ayrılmaz bir parçasıdır.²¹

MAP hayvanların zorunlu bir paraziti gibi hareket eder. Enfekte konakçı hayvan hücreleri ve serbest yaşayan amipler MAP'ın kendini replike edebilmesi için tek ekolojik nişi sağlar. Mikobaktini üretememesi ve hücreler içinde demir varsa mikobaktine ihtiyaç olmadan replikasyonunu sürdürmesi MAP adaptasyonunun bir örneğidir.²²

Bir konaktan başka bir konağa geçişi için bekleme döneminde hayatta kalma yeteneğini sınırlandıran ısı, dehidrasyon ve güneş ışığı gibi çevresel faktörlere karşı dirençlidir. Toprakta bir yıla kadar, suda daha uzun bir zaman hayatta kalabilir. MAP'ın suda uzun süre canlı kalması ve hatta çoğalması nedeniyle suda serbest yaşayan amiplerin konakçı olabileceği düşünülmektedir. MAP ile kontamine olmuş toprak ve su ile üretilen bitkisel ürünler veya çiftliklerde, vahşi yaşamda enfeksiyonun gözlenmesi bu etkenin biyolojik olarak ne derece önemli olduğunu göstermektedir.¹⁶

MAP ısıya dayanıklıdır. Pastörizasyon sıcaklığında diğer mikobakterilerle hayatta kalabilme durumu değerlendirilmiş olup MAP diğer mikobakterilere göre ısıya daha dayanıklı olduğu bulunmuştur. Birçok çalışmadan elde edilen verilere, MAP'ın özellikle perakende çiğ süt ve pastörize (71,7 °C x 15 s) süt örneklerinde saptandığı bildirilmiştir. Bu durum etkenin insanlara zoonotik yayılım için bir potansiyel olduğunu göstermektedir.²³ MAP'ın bulaş döngüsü Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.²⁵

Hastalığın ekonomik maliyetini hesaplamak düşük süt verimi, sürüden çıkarma gerekliliği, karkas kalitesinin düşmesi, mastitis ve yemden yararlanamama gibi etkenler nedeniyle oldukça zordur. Hastalığın Amerika'da yıllık 200-250 milyon dolar ekonomik kayıba neden olduğu bildirilmiştir.²⁴



Şekil 2.1. MAP bulaş döngüsü

2.4. Patogenez

Konakçı tarafından sindirim yoluyla alınan MAP'ın, bağırsak ile ilişkili lenfoid dokuya, tonsillerde, duodenumda, ileum ve jejunumun yanı sıra ileal, jejunal ve spiral kolon lenf düğümlerine yerleştiği ve Peyer plaklarında bulunan M hücreleri ile fibronektin köprüsü kurarak konakçıya girdiği bildirilmektedir.²⁶

Mikobakterilerin patogenezindeki en önemli özelliği makrofajlar içerisinde canlı kalabilme ve çoğalabilmesidir. Mikobakteriyel proteinler ve protein kompleksleri basilin barsak mukozasına tutunmasına ve hücre içerisinde yerleşmesine olanak sağlarlar. Yapılan bir çalışmada 35 kDa'lık bir zar proteininin, sığır epitel hücrelerinin istilasında rol oynadığı gösterilmiştir.²⁶ Diğer bir örnek ise Mce operonları tarafından kodlanan proteinlerin, mikobakterilerin fagositik hücrelere girmesi ve hayatta kalmasında ve epitel hücrelerinin istilasında rol oynadığı ileri sürülmüştür.²⁷ Verilen örnekler MAP'ın, vücuda girdikten sonra intestinal makrofajlara invaze olma yeteneğine sahip olduğu ve çeşitli stratejilerle konakçı savunmasını engelleyerek makrofajların içerisinde yaşayıp replike olabildiğinin açıklamasıdır.²⁶

Enflamatuvar hücrelerin akışı, bağırsak duvarının artık işlevselselliğini kaybetmesine kadar kalınlaşmasına neden olur. Bu durum malabsorpsiyona ve protein kaybettiren enteropatiye yol açar. Eşzamanlı bir TNF- α yükselmesi de doku katabolizmasının uyarılması yoluyla zayıflamaya katkıda bulunabilir.²⁸ Şekil.2.2 hastalığın bulaşma döngüsü gösterilmiştir.²⁹

İnce bağırsağın orta ve alt segmentlerine gronulomlar oluşturarak bu bölgeye makrofajların toplanmasını sağlamak ve makrofajlar aracılığı ile sistemik dolaşıma bulaşan enfeksiyonun vücuda yayılması sağlanmış olur. Bu durum supramammar, karaciğer ve akciğer lenf düğümleri de dâhil olmak üzere bağırsak dışında diğer organlara da yayılabildiği fikrini akla getirmektedir.²⁸

Sığırlarda enfeksiyon dört farklı klinik evrede seyreder.

Hastalık semptomlarının görülmediği sessiz enfeksiyon dönemi (EVRE I): Bu dönemde enfekte olan hayvanların dışkıları etkeni taşıyabilirler fakat kültür, ELISA ve PCR tanı testleri ile tespit edilmeyebilirler.³⁶

Hayvanlarda kilo kaybı ve ishal olmadan etkenin yüksek miktarda saçılımı gerçekleştiği dönem Asemptomatik taşıyıcı yetişkinler dönemi olarak tanımlanır (EVRE II): Bu dönemde diğer hayvanların etken ile maruz kalmasına sebep verdiği hastalığın yayılımının arttığı dönemdir.³⁶

Hayvanlarda kademeli kilo kaybı ve ishal görüldüğü klinik hastalık dönemi (EVRE III): Bu dönemde iştah normaldir ve aralıklı ishal genellikle haftalarca devam eder. Yaşamsal fonksiyonlar (kalp atış hızı, solunum hızı ve vücut ısısı), zayıflama ve kaşeksi, süt üretiminde azalma ile birlikte yavaş yavaş bozulur. İnce bağırsak yolunun önemli bir kısmı boyunca kalınlaşmış bir bağırsak mukozası, lenfadenopati hastalığın ilerlemesinin karakteristik göstergesidir. Tüm tanı testleri etkenin belirlenmesinde güvenilir sonuçlar verir.³⁶

Hayvanların kaşektik bir hal aldığı, kronik yoğun ishal ve çene altında ödem görüldüğü ilerlemiş klinik dönem (EVRE IV): Hayvanın durumu genellikle birkaç gün içinde hızla kötüleşir kesime gönderilmeyen hayvanlar dehidratasyon ve kaşeksi sonucu ölür.³⁶

2.6. İnsanlarda Paratüberküloz

Paratüberküloz ve Crohn hastalığı arasında klinik ve patolojik benzerlikler nedeniyle 100 yıl önce MAP'ın hastalığa neden olabileceği fikri ortaya konulmuştur.³⁷ Klinik olarak, her iki durum da aralıklı ishal ve kilo kaybı patolojik olarak, ileosekal alanda hastalık ve ülserasyonlar ve intramural granülomların oluşumu iki hastalık

arasında potansiyel benzerliğin olduğunu göstergesidir.³⁸ Fakat iki hastalık arasında bazı farklılıklar da olduğu karşı görüş olarak ortaya konmuştur.³⁹

1913'te Dalziel, sığırlarda Paratüberküloz ve insanlarda Crohn hastalığı (CD) olarak bilinen iki kronik inflamatuvar bağırsak hastalığı arasındaki histopatolojik ve klinik benzerlikleri tanımlamıştır. Araştırmacının raporuyla MAP'ın CD'deki etiyolojik rolü hakkında tartışma başlamıştır.³⁷ Johne's hastalığı ile benzerlikleri nedeniyle, Crohn hastalığının mikobakteriyel nedeni uzun yıllardır araştırılmaktadır. Ancak ilk çalışmalarda, CD olan hastalardan alınan dokularda geleneksel boyama ve kültür teknikleri ile MAP saptanmamıştır.³⁷

Cohiodini ve ark.⁴⁰, Crohn'lu hastalardan alınan doku örneklerinden birkaç aylık inkübasyon süresinden sonra, hücre duvar yapısı bulunmayan ve sferoplast olarak da bilinen hücreleri izole etmiştir. Alt kültürü yapılan sferoplastların daha sonra Ziehl-Neelsen boyama ile Asido Rezistans Boya (ARB) pozitif olarak boyanan hücre duvarı geliştirdikleri izlendi. Daha sonra sferoplastlar Mikobakteri benzeri bir organizma olarak sınıflandırıldı. Bu izolatlar DNA hibridizasyonu ile MAP olarak doğrulandı ve Crohn hastalığının mikobakteriyel etiyolojisi konusuna yeniden ilgi gösterilmesine yol açmıştır.

Naser ve ark.¹⁴ yapmış oldukları çalışmada; Crohn hastalığı olan bireylerin önemli bir kısmında, periferik kanda canlı MAP saptamışlardır. Aynı araştırmacılar organizmanın bu hastalığın etiyolojisindeki rolüne ilişkin kanıtlara yer vermişlerdir.

Singh ve ark.¹⁵ Hindistan'da yaptıkları çalışmalarında ise, Paratüberkülozun endemik olduğu ve gastrointestinal problem gözlenen keçilerle ilişkili olan kişilerde yüksek düzeyde MAP (Hint bizonu tipi) prevalansı bulundu.

Ozana ve ark.⁴¹ çevreden ve kontamine gıdalardan kaynaklı olarak MAP'ın Tip 1 Diyabet için tetikleyici olabileceğini bildirirken, Bull ve ark.⁴² Crohn hastalığı olan kişilerde Paratüberkülozun önemli olduğunu ve kronik enterik patogeni hastalığın nedeni

olarak bildirmiştir. Sechi ve ark.⁴³ yaptığı çalışmada *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*'in Tip 1 diyabet hastalığının enfeksiyöz nedeni olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Cossu ve ark.⁴⁴ yaptığı araştırmaların sonucu da Tip 1 diyabet ile bakteriyel enfeksiyon arasında potansiyel bir ilişki olduğunu göstermektedir.

Temitope ve ark.⁴⁵ yaptığı bir çalışmada MAP ve MS (multiple sclerosis) arasında güçlü bir ilişki olduğu, MAP'ın MS'i tetikleyebilecek önemli bir çevresel ajan olduğu belirtilmiştir.

İnsanlarda Paratüberkülozun patojenitesi çeşitli faktörler tarafından etkilenmektedir. Bunlar yaş, çevre kirliliği, sağlık durumu, coğrafi konum, beslenme alışkanlıkları, spesifik mikroorganizmaların varlığı, hastalık mekanizması, ilaçlar ve konak immün yanıt olarak sayılabilir. MAP çok sayıda otoimmün ve enflamatuar hastalık ile ilişkilendirilmiştir ve tüm dünyada bu konudaki araştırmalar devam etmektedir. İnsanlarda MAP, uzun bir enflamatuar ve otoimmün hastalık listesiyle ilişkilendirilmiştir: Bu hastalıklardan başlıcaları; Crohn hastalığı, sarkoidoz, Blau sendromu, Hashimoto tiroiditi, Otoimmün diyabet (T1D), Multiple skleroz (MS), Romatoid artrit, Lupus ve Parkinson hastalığı'dır.⁴⁶

NOD2 genetik defekte sahip insanlar, hücre içi bakteriyel enfeksiyonlara karşı yatkındırlar. Crohn hastalığı olan hastalarda MAP DNA, vakaların %90'ına varan oranda PCR ile vakaların %70'i civarında ve yerinde hibridizasyon yoluyla ve vakaların %100'ünde MAP RNA için RT-PCR ile tespit edilmiştir⁴⁷

İki yıldan daha fazla süren Crohn hastalığı olan kişilerde MAP'a karşı etkili makrolid türevi antibiyotiklere karşı olumlu sonuçlar alındığı gözlemlenmiştir.⁴⁸

2.7. Teşhis Metodları

Hastalığın nekropside patognomik bulgusu terminal ileumda kalınlaşma ve dalgalanmadır. Patolojik bulguları olan mukozadan ve lenf nodüllerinin kesik

yüzeylelerinden alınan smearlar, MAP'ın morfolojik özelliklerine sahip aside dayanıklı mikroorganizmaların gözlemlenmesi için Ziehl-Neelsen boyama yöntemi kullanılabilir. Fakat kesitte aside dayanıklı organizmalar bulunmayabilir. En iyi teşhis, bağırsak duvarı ve mezenterik lenf nodülü numunelerinin %10 formol içerisinde fikse edildikten sonra hematoksilen-ve-eozin-boyama ve Ziehl-Neelsen-boyama yöntemi ile hastalık teşhis edilebilir. Kesitlerde epitelioid hücreler olarak da bilinen büyük makrofajlar içinde kümelenmiş asit-fast basiller genellikle bulunur. Dışkıdan ya da bağırsak kazıntısından sürüntü yaparak direkt Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile küçük (0.5-1.5 µm), güçlü aside dirençli basil kümeleri (üç veya daha fazla organizma) tespit etmek hastalıktan şüphelenmemize katkı sağlar. Ancak ileri tetkikler gereklidir. ⁴⁹

MAP ile enfeksiyonun kesin teşhisini kültürden izolasyonun sağlanması ile yapılır. Teknik olarak zor ve uygulanması zaman alıcı olsada %100 özgül bir testtir. Dışkı kültürü yaygın olarak Paratüberküloz tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir. Dışkı kültürünün duyarlılığı hastalığın evrelerine göre farklılıklar gösterir. MAP kültürasyonu için her zaman ticari olarak temin edilebilen mikobaktin J ile desteklenmiş özel besiyerleri kullanılmalıdır. ⁴⁹

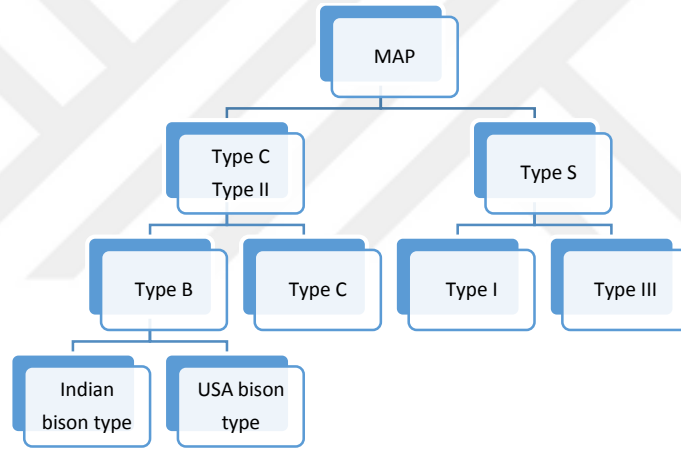
Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) MAP'a özgü olduğu düşünülen DNA dizilerinin tanımlanmasını sağlayan hızlı bir yöntemdir. Kan, süt, dışkı, dokular ve çevresel örneklerden MAP'ın varlığının tespiti kapsamlı geliştirilen PCR yöntemleri ile yapılabilmektedir. Bu yöntem zor üreyen ve yavaş büyüyen mikroorganizmaların hızlı bir şekilde tanısının konmasına olanak sağlar. ⁴⁹

Bir diğer tanı yöntemi ise MAP'a karşı oluşan antikorların varlığının saptanması için kan serumunda yapılan serolojik testlerdir. Sığırlarda Paratüberküloz için yaygın olarak kullanılan serolojik test Enzim bağlayıcı serum testi (ELISA), Kompleman Fiksasyon Testi (CFT) ve Agar gel İmmunodifüzyon (AGID) testleridir. ⁴⁹

2.7.1.MAP Genotipik Sınıflandırma Yöntemleri

MAP için birçok genotipik sınıflandırma yöntemi kullanılmıştır.

Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) analiz metodu ile genomik DNA, gelişigüzel dizinin tek bir kısa primeri (10-22 baz) kullanılarak düşük kesinlikte PCR koşulları altında doğrudan amplifiye edilmesi yöntemidir. Bu metod ile Şekil 2.3 yer alan MAP tipleri elde edilmiştir.⁵⁰ Bu analiz yöntemi sayesinde hem MAP hem de *M. avium* izolatları için altı farklı genotip tanımlanmıştır. Sığır, keçi ve insanlardan elde edilen MAP izolatları genetik olarak benzerken, bir koyun izolatının farklı bir genetik profile sahip olduğu belirtildi.⁵⁰



Şekil 2.3 MAP tiplerinin terminolojisi ve sınıflandırılması

Güçlendirilmiş parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP) ile yapılan genotiplendirme de ise restriksiyon enzimlerinin yardımıyla DNA fragmentasyonunu ve ardından restriksiyon bölgelerine tamamlayıcı olan adaptörlerin ligasyonunu içerir. Uyarlanan kısıtlama fragmanları daha sonra PCR ile amplifiye edilir ve poliakrilamid jeller üzerinde ya otoradyografi ya da floresan bazlı yöntemlerle görselleştirme esasına dayanır. AFLP yöntemi saflaştırılmış, yüksek molekül ağırlıklı DNA ihtiyacı, özellikle farklı platformlar

arasında zayıf yeniden üretilebilirlik ve bantlama modellerinin sübjektif yorumlanması nedeniyle standardizasyonun zorluğuna sahiptir.⁵⁰

Darbeli alan jel elektroforezi (PFGE); kısıtlanmış DNA fragmanlarının, DNA fragmanlarının daha iyi ayrılmasını sağlayan, jel yönüne göre elektrik alanın periyodik olarak yeniden yönlendirilmesine tabi tutulduğu özel bir jel elektroforez şeklidir.⁵⁰

IS900 -restriction fragment length polymorphisms (IS900-RFLP) yirmi yıldır ilk ve en sık kullanılan ve bir organizmanın genomunun bir veya daha fazla restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak sindirilmesini ve ardından DNA parçalarının elektroforezini içeren bir genotiplendirme yaklaşımıdır. Özellikle son yıllarda dizileme teknolojilerinin ilerlemesinden sonra zahmetli, zaman alıcı olması, genomik DNA ekstraksiyonu için önemli miktarda kültür materyali gerektiriyor olması testin kullanımını sınırlamaktadır.⁵⁰

Ardışık tekrar eden DNA dizilerine dayandırılan genotip sınıflandırma yönteminde Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit -Variable Number of Tandem Repeat (MIRU-VNTR) ve Multi-locus short sequence repeats (MLSSR) yöntemleri kullanılmaktadır. Bu DNA dizileri prokaryotik genomlarda yaygın olarak bulunurlar ve yakın akraba suşlar arasında bile değişebilen tekrar kopya sayılarına sahiptirler. Tekrar boyutuna göre, ardışık tekrarlar üç ana kategoride sınıflandırılır. 1 ile 9 nt arasındaki tekrarlar MIRU, kısa dizi tekrarları (SSR) veya kısa tandem tekrarları denir. Daha büyük tekrarlar (10-100 nt) genellikle mini satellitler veya değişken sayılı tandem tekrarlar (VNTR) olarak bilinirken, 100 nt'den fazla tekrarlar makro satellitler olarak adlandırılır. Karakterizasyon, tandem tekrar lokuslarının PCR tabanlı amplifikasyonuna ve ardından her lokustaki tekrar kopya sayılarının esas olarak jel veya kapiler elektroforezde (VNTR için) boyut polimorfizmi ile veya PCR ürünlerinin sekanslanmasıyla (SSR için) hesaplanması üzerine kuruludur. Farklı tandem tekrar lokuslarındaki tekrar kopya sayıları

daha sonra her bir izolatın genotipini tanımlayan sayısal bir kodda birleştirilir. Karakterizasyonu daha hızlı ve daha az zahmetli hale getirmeleri, klinik örneklerden veya canlı olmayan kültürlerden doğrudan tiplendirmeyi sağlamaları nedeniyle diğer PCR tabanlı genotiplendirme yöntemlerine göre daha avantajlıdır.⁵⁰

2.8. Koruma ve Kontrol

Etken dış ortam koşullarına oldukça dirençli olduğundan öncelikli olarak potansiyel bulaşma kaynaklarının ve bulaşma yollarının ele alınması gereklidir. Çalışmalarda, etkenin asidik topraklara göre alkali topraklara daha uzun yaşadığı, gübre çukurunda 250 güne kadar canlı kaldığını ispatlar niteliktedir. Deneysel olarak yapılan enfekte etme çalışmalarında etkenin ağızdan alınması enfeksiyonun başlaması için yeterli bulunmuştur. İçme sularının ve bulaşma sebep olacak bütün kaynakların irdelenerek sağlıklı kontrol basamakları geliştirmek zorunludur. Öncelikli olarak çevrenin kontaminasyonunu en aza indirmek gereklidir. Subklinik dönemde olan hayvanlar, önemli bulaş kaynakları arasında yer almaktadır. Sürü bazında ELISA ve dışkıdan bakteriyolojik etken taramalarının yapılması veya bu iki testin kombinasyonu ile enfekte hayvanların tespit edilebilirliğini yükseltir. Böylece şüpheli veya pozitif olarak tespit edilen hayvanlar itlaf edilmeli hızlıca sürüden ayrılmalıdır. Tedaviye uzun süre devam edilmesi gerekliliği, uygulanacak antibiyotiklerin pahalı olması ve tedavi kesildiği zaman hastalığın nüks etme olasılığı gibi nedenlerden dolayı günümüzde antibiyotiklerle bilinen bir tedavisi bulunmamaktadır.⁵¹ En iyi kontrol yönteminin aşılama olduğu bildirilmesine rağmen, aşının tam koruma sağlamadığını belirten çalışmalarda bulunmaktadır.⁵²

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Örneklerin alınması ve testler

3.1.1. Örneklerin Alınması

2022 yılı Ocak-Mart ayları arasında Erzurum Merkez ve Aziziye, Horasan, Karayazı, Tekman, Çat, Yakutiye, Karaçoban, Pasinler ilçelerine işletme ziyaretinde bulunuldu. Çalışmada toplam 18 mahalledeki toplam 210 sığır işletmesinde çalışan 210 insan ve bu işletmelerdeki 420 inekten alınan örnekler tez çalışmasının materyalini oluşturdu (Tablo 3.1.). Aynı zamanda işletmelerde bulunan rastgele tesadüfi örneklem metodu ile her işletmeden iki adet yaşları 24 aydan büyük olan hayvandan tam kan, kan serumu ve dışkı numuneleri alındı. Ziyaret edilen işletmelerde kan alınan kişilere onam formu imzalatıldı. İnsan ve sığırlardan örnek almak için antikoagulantsız ve NaEDTA içeren antikoagulanlı kan tüpleri kullanıldı. Dışkı örneklerinin alınmasında 50 ml hacimli steril vida kapaklı tüpler kullanıldı. Alınan örnek çeşitleri ve sayıları Tablo 3.1.'de gösterildi.

Tablo 3.1. Çalışma Kapsamında Alınan Örneklerin İlçe ve Mahallelere Göre Dağılımı

İlçe	Mahalle	İnsan Numune	Hayvan Numune
Aşkale	Dağyurdu	12	24
	Merdiven	10	20
	Merkez	8	16
Aziziye	Beypınarı	9	18
	Kayraman	5	10
Çat	Göbekören	11	22
	Parmaksız	10	20
	Yavi	9	18
Horasan	Değirmenler	30	60
Karaçoban	Bozyer	10	20
Karayazı	Çatalören	10	20
	Kırgındere	15	30
	Köyceğiz	10	20
Pasinler	Taşkaynak	20	40
Tekman	Düzyurt	8	16
Yakutiye	Arıbahçe	7	14
	Dumlu	17	34
	Kırmızıtaş	9	18

Tablo 3.2. Materyal Olarak Alınan Örnek Türlerinin Hedef Canlı Türlerine Göre Dağılımları

Hedef Tür	Tam Kan	Kan Serumu	Dışkı
İnsan	210	-	-
Hayvan	420	420	420
Toplam	630	420	420

3.1.2. Serolojik Analiz

Sığırlarda Paratüberküloza bağlı humoral immün yanıtın belirlenmesi için ticari indirekt ELISA kiti (IDEXX Paratuberculosis Screening Antibody Test Kit Lot Numarası: SN 2055) kullanıldı. Testte kullanılan indirekt ELISA içeriği Tablo 3.3.'de verildi. ELISA'nın gerçekleştirilmesinde ELISA yıkayıcı (BioTek ELX 50), ELISA okuyucu (BioTek, ELX 800) ve xCheckPlus programı kullanıldı.

Tablo 3.3. İndirekt ELISA Kit İçeriği

Materyal	Adet
Pozitif kontrol	1x0.5 ml
Negatif kontrol	1x0.5 ml
Map Antigen Coated Plate	5
A Conjugate concentrate	1x0.75 ml
Dilution buffer N.1	1x120 ml
Dilution buffer N.12	1x100 ml
TMB Substrate N.9	1x60 ml
Stop solution N.3	1x60 ml
Wash solution	1x100 ml

3.1.3. Moleküler Teşhis

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* ait DNA'nın tespiti ve identifikasyonu için real time PCR metodu kullanıldı. Bakteriyel DNA'nın ekstraksiyonu

için ticari DNA ekstraksiyon kiti (Qıacube, Qiagen®) kullanıldı. DNA ekstraksiyon kit içeriği Tablo 3.4.'de gösterildi. DNA miktarları cihazı ile ölçüldü.

Tablo 3.4. DNA Ekstraksiyon Kiti İçeriği

Materyal	Adet
Buffer VXL	1x30 ml
Buffer ACB	2x60 ml
Proteinase K	1x6 ml
Carrier RNA	2x302 µg
Buffer AW1	98 ml
Buffer AW2	66 ml
Buffer AVE	2x20 ml

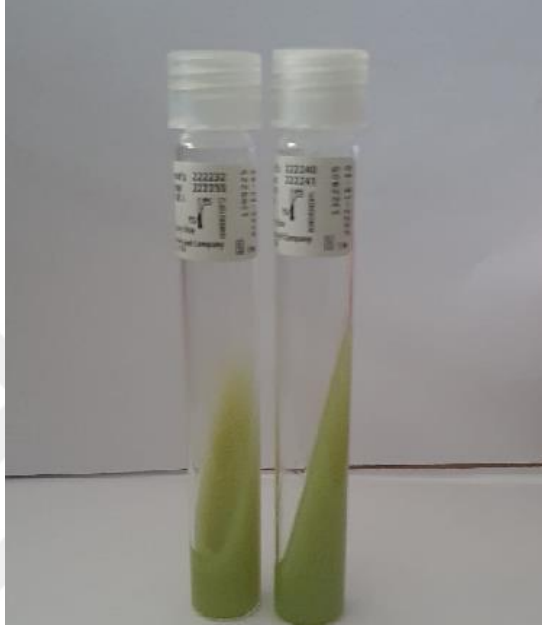
Real time PCR metodunda İmirzalıoğlu ve ark.⁵³ metodu referans olarak kabul edildi.⁵³ Kullanılan primer ve problemler Tablo 3.5.'de gösterildi. Bunun yanında içerisinde pozitif kontrolü, internal kontrolü, primer-probu bulunan ticari real time PCR kiti (bactotape MAP PCR Kit; BT285903) ile ayrıca analiz edildi. Çalışmada, LightCycler Taqman Master kiti (Roche), LightCycler LC 480 real time PCR cihazı (Roche) kullanıldı.

Tablo 3.5. Real Time PCR Analizinde Kullanılan Primer ve Problemler

Primer-Prob Adı	Dizilim (5'-3')
Amplicon III f57	Forward TAC CGA ATG TTG TTG TCA CCG
	Reverse TGG CAC AGA CGA CCA TTC AA
	Probe FAM-CCG GTC CCA GGT GTG TTC GAG TTG-TAMRA
AmpliconIV MAP0865	Forward GCG CGG CCA GTA TGG ATA TA
	Reverse GAC TCA ACC CAA CGA GCT CC
	Probe FAM-AGA TGC CTC TCC GAT GCT CGA TGG-TAMRA
Amplicon I IS900	Forward AAT GAC GGT TAC GGA GGT GGT
	Reverse GCA GTA ATG GTC GGC CTT ACC
	Probe FAM-TCC ACG CCC GCC CAG ACA GG-TAMRA

3.1.4. İzolasyon Çalışmaları

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*'in dışkı ve tam kan örneklerinden izolasyonları için hazır besiyerleri kullanıldı. Mikobaktinli ve mikobaktinsiz olacak şekilde iki farklı kombinasyonda TM Herrold's Egg Yolk Agar Slant (BBL) besiyerleri kullanıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. TM Herrold's egg yolk agar slant (BBL)

3.1.5. MIRU VNTR Analizi

Kültürden izole edilen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*'lerin moleküler epidemiyolojisinin belirlenmesi için Thibault ve ark.⁵⁴ metodu referans olarak kabul edildi. MIRU-VNTR analizinde kullanılan primerler Tablo 3.6.'da gösterildi. Pozitif kültürlerde DNA ekstraksiyonu için Magna Lyser cihazı (Roche), DNA ekstraksiyonu için ticari DNA ekstraksiyon kiti kullanıldı. PCR reaksiyonu hotstart mastermiks (Qiagen) ile gerçekleştirilirken ısı işlemler için sensoquest thermal cycler cihazı ile yürütüldü. PCR ürün boyutunda tekrarların belirlenmesi için Qiagen Qiaxcel kapiller elektroforez cihazı ile Qiaxcel high definition kiti kullanıldı.

Tablo 3.6. MIRU-VNTR Analizinde Kullanılan Primerler

Primer Adı	5'-3'
292-F	CTTGAGCAGCTCGTAAAGCGT
292-R	GCTGTATGAGGAAGTCTATTCATGG
32-F	CCACAGGGTTTTTGGTGAAG
32-R	GGAAATCCAACAGCAAGGAC
X3-F	AACGAGAGGAAGAAGTAAAGCCG
X3-R	TTACGGAGCAGGAAGGCCAGCGGG
25-F	GTCAAGGGATCGGCGAGG
25-R	TGGACTTGAGCACGGTCAT
3-F	CATATCTGGCATGGCTCCAG
3-R	ATCGTGTTGACCCCAAAGAAAT
7-F	GACAACGAAACCTACCTCGTC
7-R	GTGAGCTGGCGGCCTAAC
10-F	GACGAGCAGCTGTCCGAG
10-R	GAGAGCGTGGCCATCGAG
47-F	CGTTGCGATTCTGCGTAGC
47-R	GGTGATGGTCGTGGTCATCC

3.2. Örneklerin işlenmesi ve testler

3.2.1. Örneklerin işlenmesi

Çalışmada alınacak örnek sayısının belirlenmesi için Sampsiz web sitesinde (<http://sampsiz.sourceforge.net/iface/index.html>) %95 güven aralığı, %5 hata payı ve tahmini prevalans %3 (Gümüşsoy ve ark⁵⁵, Atala ve Akçay³⁰) kabul edilerek belirlendi. Yapılan hesaplamada insan ve hayvanlardan en az 208 örnek alınması gerektiği hesaplandı. İşletmeler arasında yoğunluğun ve örnek dağılımının daha iyi yapılabilmesi için alınması gereken örnek alınacak işletme sayısı 210'a tamamlandı. Bakterinin tespit edilmesi ve seroprevalansın ortaya konulabilmesi için Erzurum ilinde büyükbaş hayvancılığın yoğun yapıldığı merkez ve güney ilçelerde belirlenen köylerdeki 210

büyükbaş hayvan işletmesindeki en az 2 adet olmak üzere yaşı 24 aydan büyük olan dişi hayvanlardan tam kan, kan serumu ve dışkı örneği alındı. Aynı zamanda örnek almak için ziyaret edilen işletme çalışanlarından işletme başına bir kişi olmak üzere toplam 210 kişiden tam kan örneği alındı.

İnekler uygun şekilde zapturapt altına alındıktan sonra kuyruk dik bir şekilde kaldırıldı ve %70'lik alkol ile kuyruk altı temizlendi. Sonrasında vena coccygea'dan antikoagulantsız ve NaEDTA içeren antikoagulantlı vakumlu kan tüplerine en az 5 ml kan örneği alındı. Dışkı örneği için rektal palpasyon ile uyarım sonrasında hayvanın defekasyon yapması uyarıldı ve steril 50 ml hacimli steril vida kapaklı tüplere en az 10 gram dışkı örneği alındı.

Ziyaret edilen işletme sahiplerinden kan almak için sağlık teknisyeni tarafından uygun kolda dirsek yukarısında turnike uygulandıktan sonra %70'lik etil alkol ile temizlendikten sonra dirseğin iç kısmında belirgin venalardan venöz kan NaEDTA içeren antikoagulantlı vakumlu kan tüpüne en az 5 ml kan örneği alındı. Alınan tüm örnekler +4°C'de laboratuvara nakledildi. Örnek alınan kişilerde; diyare, Crohn hastalığı, Tip-1 Diyabet ve Hashimoto Troidi hastalıklarının olup olmadığı hakkında bilgiler alındı. Antikoagulantsız tüplere alınan sığır kan örnekleri 3000 rpm devirde 3 dakika santrifüj edilerek serumu ayrıştırıldı. Santrifüj sonrasında ayrılan ve hemoliz olmamış serum örnekleri 2 ml hacimli mikrosantrifüj tüplerine alındı ve indirekt ELISA yapılınca kadar -20°C'de muhafaza edildi.

İnsan ve ineklerden alınan tam kan örneklerinden buffy coat tabakasının ayrıştırılması için ficoll paque plus kullanıldı. Buffy coat tabakasının ayrıştırılması için tam kan örneğinden 2 ml alınıp, 15 ml hacimli steril vida kapaklı tüpe aktarıldı ve üzerine 2 ml fosfat tamponlu salin (PBS) aktararak homojen hale getirildi. Farklı bir 15 ml hacimli steril vida kapaklı tüp içerisine 3 ml ficoll paque plus aktarıldı. Ficoll Paque plus

üzerine 4 ml hacimli tam kan PBS karışımı iki farklı katman oluşacak şekilde yavaşça aktarıldı. Hazırlanan tüpler 400 g'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında plazma, buffy coat, ficoll paque plus ve eritrosit olmak üzere 4 katmanlı şekilde ayrıştırıldı (Şekil 3.2). Plazma tabakası ile ficoll paque plus katmanları arasında kalan buffy coat tabakası 2 ml hacimli mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve analiz edilinceye kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Alınan sığır dışkı örneklerinin bakteriyolojik kültür ekimleri öncesinde kontaminasyonun azaltılması için dekontaminasyon işlemi uygulandı. Bu amaçla, 50 ml hacimli steril vida kapaklı tüp içerisine 20 ml distile su aktarıldı ve üzerine 1 gr dışkı eklendi. Oluşturulan karışım oda sıcaklığında 30 dk hafifçe vorteks cihazı ile homojen hale getirildi. Büyük partiküllerin çökmesi için 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. En üstteki 5 ml dışkı süspansiyonu 20 ml % 0.95 HPC içeren 50 ml'lik yeni bir tüpe aktarıldı. Eşit dağılım sağlamak için tüp birkaç kez ters çevrilerek ve oda sıcaklığında 18 saat boyunca bozulmadan bekletildi.⁴⁹ Dekontaminasyon işlemi tamamlandıktan sonra direkt kültürlerle ekim yapıldı.



Şekil 3.2. Plazma tabakası ile ficoll paque plus katmanları arasında kalan buffy coat tabakası

3.2.1 Serolojik Analiz

Sığır kan serumlarında *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*'e spesifik antikorların tespiti için ticari hazır indirekt ELISA kiti (Idexx Paratuberculosis Screening

Ab Test) kullanıldı. Serumda non-spesifik antikorların ayrımı ve yanlış seropozitif sonuçların önlenmesi amacıyla serum örnekleri öncelikle *Mycobacterium phlei* (Dilution Buffer No.1) ile inkübe edildi. Herbir serum örneği, pozitif kontrol ve negatif kontroller ile 10 µl alınarak antijen ile kaplı olmayan 96 kuyucuklu U tabanlı plate aktarıldı. Her bir kuyucuğa 190 µl Dilution Buffer No.1 eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında dilüe edilmiş olan pozitif kontrol, negatif kontrol ve serum örneklerinden 100µl alınarak antijen kaplı ELISA platine aktarıldı. Oda sıcaklığında (22±4°C) 45 dakika inkübe edildi. Sonrasında her kuyucuk 300 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Yıkama sonrasında her kuyucuğa dilution buffer No:1 ile 1/100 oranında sulandırılan konjugat 100 µl eklendi ve 22±4°C’de 45 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her kuyucuk 300 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra her kuyucuğa 100 µl Substrat solüsyonu eklendi. Karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında 10 dakika boyunca (22±4°C) inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda her kuyucuğa 100 µl eklendi ve hemen ELISA okuyucu cihaza plate yerleştirilerek optik dansite ölçüldü. Ölçüm sonucunda test validasyon kriterlerine göre pozitif kontrol optik dansitesinin 0.350’den yüksek olması, pozitif kontrolün negatif kontrole oranı 3 veya daha fazla olması durumunda testin sonuçları geçerli olarak kabul edildi. Örneklerdeki pozitif, şüpheli veya negatif sonuç aşağıdaki kite ait formüle göre değerlendirildi.

$$Sonuç = \frac{(\text{Örneğin } OD_{450} - \text{Negatif Kontrol } OD_{450})}{\text{Pozitif Kontrol } OD_{450} - \text{Negatif Kontrol } OD_{450}} \times 100$$

Formülüne göre hesaplandıktan sonra, sonuç %45’den düşük veya eşit ise negatif, %45 ile %55 arasında şüpheli ve %55’den büyük ise pozitif olarak kabul edildi ⁴⁹

3.2.2. DNA Ekstraksiyonu

Real-time PCR ve MIRU-VNTR analizleri öncesinde buffy coat, kültürdeki izolatlardan DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Bakterinin hücre duvarındaki murein yapısından dolayı ekstraksiyon kitinin yetersiz hücre duvarı yıkımlanmasına neden olabileceği düşünüldüğü için ön işlem olarak örnekler fiziksel parçalama işlemi uygulandı. Bunun için, örnekler seramik boncuklu tüplere alındıktan sonra Magna Lyser cihazında 6400 rpm devirde 60 saniye olacak şekilde homojen hale getirildi. Homojenize hale getirildikten sonra örnekler soğuk blok üzerinde 3 dakika bekletildikten sonra 6000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası DNA ekstraksiyonu için süpernatanttan 200 µl alınarak steril 2ml hacimli mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. DNA ekstraksiyonu için Qiagen Qiacube otomatik nükleik asit izolasyon cihazı kullanıldı. Cihazın kullanım talimatına göre kit içeriğinde bulunan materyaller yerleştirildi. Cihazın örnekler üzerine uygulandığı işlemler aşağıda açıklandı.

Örnek üzerine 20 µl proteinaz K, 100 µl Buffer VXL aktarıldı ve vortekslenerek homojen hale getirildi. Tüpler $22\pm4^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüplere 350 µl Buffer ACB eklendi ve vortekslendi. Örnekler kit içerisinde bulunan spin kolon üzerine aktarıldı ve 8000 rpm devirde 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında spin kolon üzerine 600 µl Buffer AW1 eklendi ve 8000 rpm devirde 1 dakika santrifüj edildi. Alt kısım atıldıktan sonra spin kolon üzerine 600 µl Buffer AW2 eklendi ve 8000 rpm devirde 1 dakika santrifüj edildi. Alt kısım uzaklaştırıldıktan sonra spin kolonda kalan sıvıların da uzaklaştırılabilmesi için 14.000 rpm devirde 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında spin kolon altına steril 1.5 ml hacimli steril mikrosantrifüj tüpü yerleştirildi. Spin kolonun tam merkez kısmına 50 µl Buffer AVE eklendi ve 1 dk bekledikten sonra 14.000 rpm devirde 2 dakika santrifüj edildi. Altta kalan DNA ekstraktı real time PCR ve MIRU-VNTR analizleri yapılncaya kadar -20°C 'de muhafaza edildi.

3.2.3. Real-time PCR

Elde edilen DNA ekstraktlarında analiz gerçekleştirilmeden önce Qubit cihazında DNA yoğunluğu ölçüldü. DNA ölçümünde Qubit dsDNA HS Assay Kit kullanıldı. Bunun için öncelikle kit içerisindeki standartları ile kalibre edildikten sonra 1 µl ile 199 µl dsDNA HS Buffer ile karıştırıldıktan sonra okuma yapıldı. Hazırlanan karışım Qubit cihazında ölçülen DNA yoğunluğunun analiz için yeterliliği belirlendi.

DNA ölçümleri sonrasında Real Time PCR analizinde, Imirzalioglu ve ark.⁵³ bildirdikleri yöntem referans olarak kullanıldı. Real time PCR aşamasında LightCycler Taqman Master kiti (Roche) kullanıldı. PCR çalışmalarında primerler 10 pmol, problemler 5 pmol olacak şekilde ayarlandı. Reaksiyon hacmi LightCycler Taqman Master kiti protokolüne göre 0.2 ml hacimli steril mikrosantrifüj tüplerinde hazırlandı ve tüpler real time cihazına yerleştirildi. Real-time PCR çalışmasında döngü parametreleri 95 °C'de 10 dakika ve 45 döngü 95 °C'de 20 saniye, 60 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 saniye olacak şekilde ayarlandı. Real time PCR analizi sırasında 35. cycle threshold (CT) değerine kadar olan ışımlar pozitif olarak kabul edildi.

3.2.4. Bakteriyolojik Kültür ve İzolasyon

Sığırların kan serumlarından ELISA sonuçlarında, insan buffy coat PCR analizi sonuçlarında pozitif tespit edilen dışkı ve buffy coat tabakası örneklerinde bakteriyel izolasyon yapıldı. Buffy coat tabakası örneklerinden doğrudan kültürde ekim yapıldı.

Buffy coat örnekleri ve dekontamine edilen dışkı süspansiyonlarından 0.1 ml miktarında tortu alınarak, üçü mikobaktinli, biri mikobaktin içermeyen 4 adet TM Herrold's Egg Yolk Agar Slant (BBL) besiyerlerine ekim yapıldı. Kapaklar gevşek şekilde kapatıldı yaklaşık 1 hafta boyunca 37 ° C'de eğik bir pozisyonda kalmasına izin verildi. Serbest nem, eğimlerden buharlaştığında tüpler dikey konuma getirildi. Tüpler en az 8 ay inkübe edilerek ve altıncı haftadan itibaren haftalık olarak gözlemlendi.⁴⁹ Üreme

tespit edilen örnekler real time PCR ile doğrulandıktan sonrtta MIRU-VNTR analiz işlemleri yapılncaya kadar -70°C’de muhafaza edildi. Pozitif örneklerde yine ticari nükleik asit izolasyon kiti ile DNA izolasyonu yapıldı.

3.2.5. Klonal İlişkinin MIRU-VNTR Yöntemi ile Belirlenmesi

Bu çalışmada 8 lokus MIRU-VNTR yöntemi kullanılarak ve hedeflenen MIRU lokusları için Thibault ve ark.⁵⁴ belirtilen primerler kullanıldı. Her bir suşa özgü 8 MIRU lokusunun VNTR sayısının belirlenmesi için 8 PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyonlar Qiagen Hotstart Master Miks kiti protokolüne göre 0.2 ml hacimli steril mikrosantrifüj tüpünde hazırlandı ve thermal cycler cihazına yerleştirildi. Reaksiyonlar; toplam hacim 25 µl olacak şekilde; dH₂O 8.5 µl, 2X PCR Master Mix 12.5 µl, 10 pmol yoğunlukta olan her bir primerden 0.5 µl, DNA 3 µl olacak şekilde hazırlandı. PCR analizindeki ısıl işlemler; 95 °C 5 dakika ilk denaturasyon, 95 °C’de 30 saniye, 60 °C’de 30 saniye, 72 °C’de 1 dakika olacak şekilde 30 döngü yapıldıktan sonra 72 °C’de 5 dakika son uzama basamağı gerçekleştirildi.

Lokus büyüklüklerinin Qiaxcel cihazında elektroforez işlemi yapılmadan önce kalibrasyon gerçekleştirildi. QIAxcel DNA High Resolution Kit (+4) oda sıcaklığına çıkarıldı ve 1 saat süresince oda sıcaklığına düşmesi için beklendi. Mavi kapaklı kartuş standında kartuşun yerleştirileceği kuyucuğa önce QX Wash Buffer eklendi ve daha sonra üstüne 2 ml mineral oil eklendi. Kartuşun arkasında yer alan yapışkan bant çıkartıldı. Buffer trayde yer alan WP and WI pozisyonlarını 8 ml QX Wash Buffer ile dolduruldu.

Buffer trayde yer alan Buffer pozisyonunu 18 ml QX Separation Buffer ile dolduruldu. WP and WI pozisyonlarının üzerine 2 ml, Buffer pozisyonunun üzerine 4 ml mineral eklendi. Buffer tray’i buffer tray holder a yerleştirildi. 12’li striplerin yerleştirileceği kısımlar öne gelecek şekilde yerleştirildi. QIAxcel DNA High resolution kitin içerisinden çıkan QX 0.2 ml 12-Tube Striplerin, 12 kuyucuguna da 15 er µl

Alignment marker eklendi. Her kuyucugun üzerine Alignment markerın uçmaması için bir damla mineral oil eklendi. Hazırlanan Alignment marker1 pozisyonuna yerleştirildi. QIAxcel DNA High resolution kitin içerisinde çıkan QX Colored 0.2 ml 12-Tube Striplerin her kuyucuguna 15 er ul Intensity Calibration Marker eklendi. Üzerlerine bir damla mineral oil eklenir ve marker 2 pozisyonuna yüklendi. Kalibrasyon gerçekleştirildi.

Kalibrasyon işlemi tamamlandıktan sonra PCR ürünlerinin elektroforez işlemleri gerçekleştirildi. Hazırlanan QX Alignment marker 15bp/1kb 12 li strip marker 1 pozisyonuna, Size Marker 0.2 ml lik PCR tüpünde EBA buffer ile 1:20 oranında dilue edilerek. “OM500-20 sec” protokolu kullanılarak analiz işlemi başlatıldı. Elektroforez tamamlandığında lokuslara ait bant büyüklükleri tespit edildi ve metoduna göre tekrar sayıları tespit edildi.⁵⁴

Elde edilen tekrar sayılarına göre, Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA) yöntemi ve şuşlar arasındaki ilişki bantlara dayalı “Dice” benzerlik katsayısına göre değerlendirilerek dendrogram oluşturuldu.

4. BULGULAR

4.1. Örneklerinin Alınması

Araştırmada Erzurum ilinde entansif sığır yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı ilçelerde belirlenen işletmelerden hem yetiştiricilerden tam kan hem de her işletmedeki yaşları 24 aydan büyük olan 2 inekten tam kan, kan serumu ve gaita örneği alındı. Örnek alınan insan sayılarının ilçelere göre dağılımları Şekil 4.1’de gösterildi. Örnek almak için ziyaret edilen işletmelerin küçük aile tipi işletmeleri olduğu, genel hijyen ve dezenfeksiyon kurallarının olmadığı ve geleneksel hayvan yetiştirme şeklinde işletme yönetimi olduğu tespit edildi.



Şekil 4.1. Örnek alınan insan sayılarının ilçelere göre dağılımları. Örnek alınan insan sayısının iki katı kadar sığırdan örnek alındı.

4.2. Kan Örneklerinin ELISA Bulguları

Çalışmada alınan sığır kan serumları ticari indirekt ELISA kiti olan Idexx Paratuberculosis Screening Ab Test ile analiz edildi. Kit protokolüne göre yürütülen analiz sonuçlarında alınan örneklerin %5.7 (24/420)'inde seropozitiflik tespit edildi. Numune alınan ilçelere göre seropozitif hayvan sayısı ve yüzde seropozitiflik Tablo 4.1'de gösterildi. Analiz sonucunda en yüksek seropozitiflik oranı %16.6 olmak üzere Horasan ilçesinde tespit edildi. Bunun yanında Çat ve Pasinler ilçelerinde ise seropozitiflik tespit edilmedi.

Tablo 4.1. İndirekt ELISA ile Test Edilen Örneklerin İlçelere Göre Dağılımları ve Pozitiflik Oranları

İlçe	% Pozitiflik	Pozitif Sayısı	Numune Sayısı
Aşkale	8.3	5	60
Aziziye	10.7	3	28
Çat	0.0	0	60
Horasan	16.6	10	60
Karaçoban	5.0	1	20
Karayazı	2.8	2	70
Pasinler	0.0	0	40
Tekman	6.2	1	16
Yakutiye	3.0	2	66
TOPLAM	5.7	24	420

4.3. Real time PCR Bulguları

Çalışmada örnek alınan işletmelerde hayvanlarla teması olan ve risk grubu içerisinde tanımlanan 210 insandan alınan tam kan örneklerinden buffy coat tabakası ayrıştırılarak real time PCR analizi gerçekleştirildi. Aynı zamanda seropozitif 24 sığırın hem tam kan örneklerinden DNA ekstrakte edildi ve real time PCR analizi yapıldı. Real

time PCR analizi yapılmadan önce test performans ölçümleri gerçekleştirildi. Pozitif kontrol olarak bactotype MAP PCR Kiti pozitif kontrolü kullanıldı.

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* pozitif kontrol nükleik asiti spektrofotometre (Nanodrop 1000) cihazı ile konsantrasyonu ölçülerek 100 ng olacak şekilde seyreltildi. Daha sonra 10 katlı dilüsyonlarını yapılarak PCR ları yapıldı. Amplicon I IS900 gen bölgesi için; en düşük tespit limiti 1.0×10^1 sulandırmada $Ct = 35.47$, en yüksek tespit limiti 1.0×10^8 sulandırmada olarak 14.30 tespit edildi. Amplicon III f57 gen bölgesi için; en düşük tespit limiti 1.0×10^1 sulandırmada $Ct = 36.78$ en yüksek tespit limiti 1.0×10^8 sulandırmada 17.32 olarak tespit edildi.

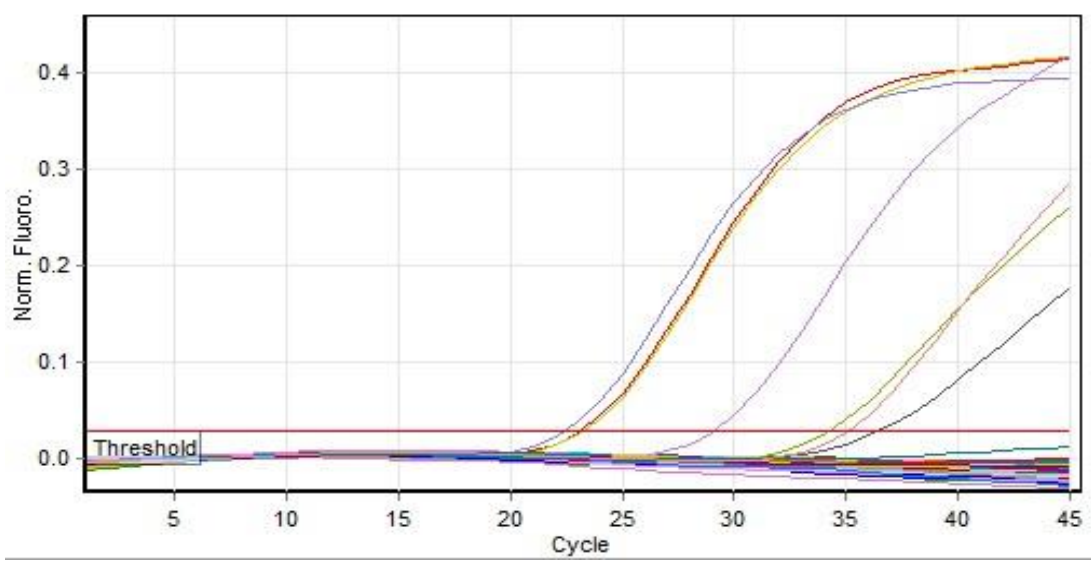
Amplicon IV gen bölgesi için; en düşük tespit limiti 1.0×10^1 sulandırmada $Ct = 37.42$ en yüksek tespit limiti 1.0×10^8 sulandırmada 18.12 olarak tespit edildi. Real time PCR çalışılan örneklerin değerlendirilmesi en düşük tespit limitinin altında olan değerler pozitif üstünde olan değerler negatif olarak değerlendirildi.

Tablo 4.2’de seri dilusyonları yapılan nükleik asit miktarları ile bu örneklerle ait Ct arasındaki ilişkiler SPSS 11.5 paket programı kullanılarak pearson korelasyon katsayısı ile test edildi. 100 ng olarak ölçülen genomik DNA’nın 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000 sulandırımıları hazırlanarak f57, amplicon IV ve IS 900 primerleri kullanılarak PCR’ı yapıldı. Yapılan sulandırmaya çalışmalarında nükleik asit konsantrasyonundaki azalmanın doğrusallık gösterdiği ve regresyon değeri $R^2 = \%99$ ve testin verimliliği $E=2$ olarak hesaplandı bu da analizin tekrarlanabilir olduğu ve sensitivitesinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.2. DNA konsatrasyonlarının Seri Dilusyonları Sonucunda Elde Edilen Ct Değerleri

Sulandırma oranları	Amplicon IS900	Amplicon III f57 (X70277)	AmpliconIV MAP0865
1.0x 10 ⁸	14.30	18.12	17.32
1.0x 10 ⁷	18.05	20.27	20.01
1.0x 10 ⁶	20.97	22.04	21.80
1.0x10 ⁵	23.12	24.48	25.55
1.0x10 ⁴	26.89	28.30	28.48
1.0x10 ³	29.88	30.85	31.37
1.0x10 ²	32.54	34.60	35.78
1.0x10 ¹	35.47	36.78	37.42
1.0x10 ⁰	-	-	-

DNA izolasyonları yapılan örneklerin real time PCR analizlerinde *M. avium* subsp. *paratuberculosis* f57, amplikon IV ve IS 900 primerleri ve primerlere özgü taqman probu kullanıldı. Tüm primer ve problemler aynı PCR tamponu ve aynı sıcaklık koşullarında yürütülmüştür. Koşullar aynı olmasına rağmen sonuçlar, f57, amplikon IV ve IS 900 PCR'ler arasında aynı etkinlik seviyeleri ve ara hassasiyet seviyeleri gösterdi. Uygulanan koşullar altında belirlenen özdeş etkinlik sonuçları nedeniyle, her üç amplikonu temsil eden yalnızca bir eğri gösterilmektedir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Real time PCR metotlarının tespit limitlerine göre Ct değerlerinin görüntüsü

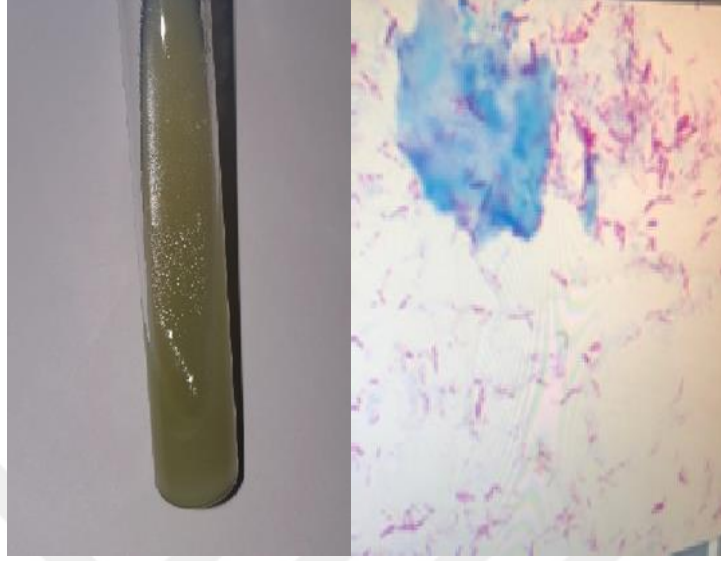
Real time PCR analizlerinin optimizasyonları sonrasında 210 insan ve serolojik olarak pozitifliği belirlenen 24 sığıra ait örneklerin analizleri gerçekleştirildi. Analiz sonucunda insan örneklerinin %3.3 (7/210) oranında, sığırlarda ise seropozitif hayvanların %25 (6/24)'ünde, numune alınan tüm hayvanlar arasında ise %1.4 (6/420)'ünde real time PCR pozitifliği tespit edildi.

4.4. Bakteriyolojik Kültürde İzolasyon

Real time PCR analizi sonucunda *M. avium* subsp. *paratuberculosis* varlığı tespit edilen toplam 13 olmak üzere 7 insan buffy coat örnekleri ile 6 sığır dışkı örneklerinden üçü mikobaktinli, biri mikobaktin içermeyen 4 adet TM Herrold's Egg Yolk Agar Slant (BBL) besiyerlerine ekim yapıldı. Besiyerleri 8 ay boyunca 37°C'de aerobik atmosferik koşulda inkübe edildi.

İnkübasyon sonucunda smooth karakterli renksiz koloniler şüpheli olarak kabul edilerek hem modifiye Ziehl-Neelsen boyamada asidorezistans özellikli basillerin görülmesi ve real time PCR analizinde pozitifliğin görülmesi ilgili kültürdeki koloniler *M. avium* subsp. *paratuberculosis* pozitif koloni olarak değerlendirildi. Analiz sonucunda

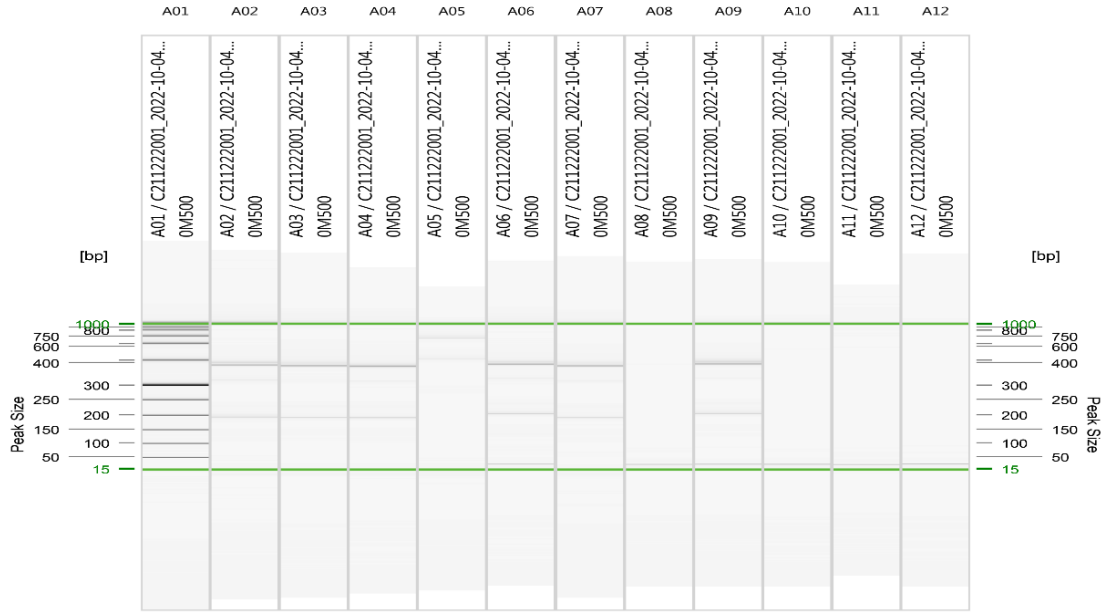
kültürde ekimi yapılan 7 insan ve 6 sığır örneği olmak üzere toplam 13 örnekte kültürde üreme tespit edildi. (Şekil 4.3)



Şekil 4.3. Kültür pozitif koloni ve modifiye Ziehl-Neelsen boyama sonucunda mikroskopik görünüm

4.5. MIRU-VNTR Yöntemi Sonuçları

Çalışmada, kültürde izole edilen *M. avium* subspecies *paratuberculosis* izolatları MIRU-VNTR metodu ile genotiplendirildi. Elde edilen MIRU-VNTR bantları büyüklükleri ve tekrar sayıları (Tablo 4.3) Mac INMV veri tabanındaki çizelgeye göre belirlendi (<http://mac-inmv.tours.inra.fr>) Erişim tarihi: 21.10.2022).

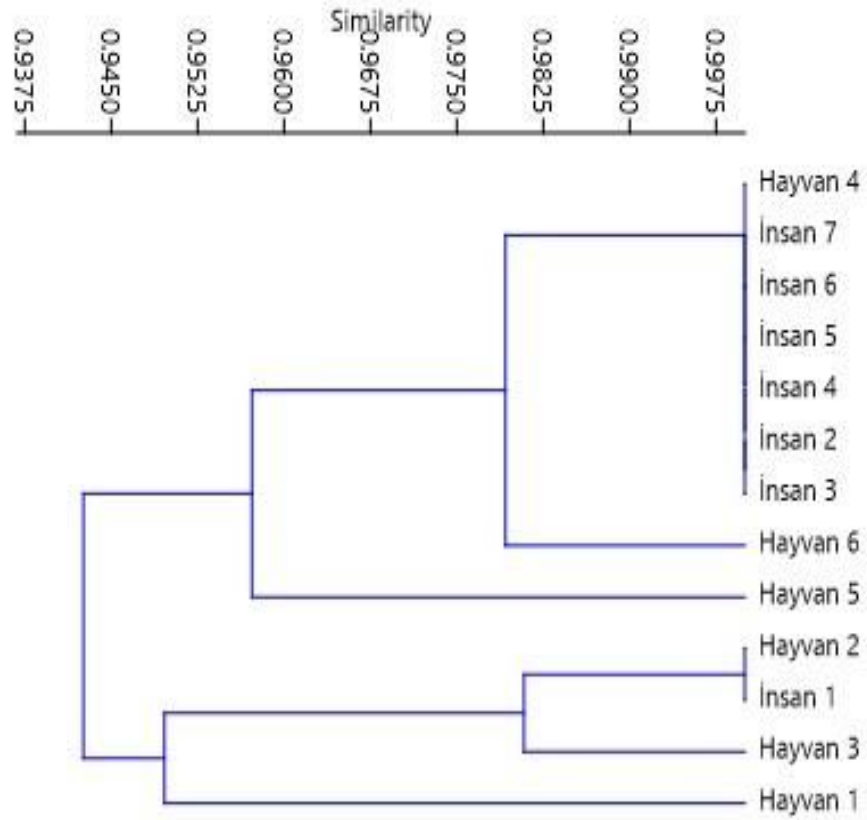


Şekil 4.4. Qiaxcel cihazında elektroforez görüntüsü

Tablo 4.3. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* suşlarının MIRU-VNTR 8 Lokusundaki Allel Sayıları

Numuneler	MIRU 292	MIRU X3	VNTR 10	VNTR 47	VNTR 3	VNTR 7	VNTR 25	VNTR 32
İnsan 1	3	1	2	3	2	2	3	8
İnsan 2	3	2	2	3	2	2	3	8
İnsan 3	3	2	2	3	2	2	3	8
İnsan 4	3	2	2	3	2	2	3	8
İnsan 5	3	2	2	3	2	2	3	8
İnsan 6	3	2	2	3	2	2	3	8
İnsan 7	3	2	2	3	2	2	3	8
Hayvan1	4	1	1	3	2	2	3	8
Hayvan2	3	1	2	3	2	2	3	8
Hayvan3	4	1	2	3	2	2	3	8
Hayvan4	3	2	2	3	2	2	3	8
Hayvan5	3	2	1	3	2	2	3	8
Hayvan6	4	2	2	3	2	2	3	8

Oluşan bant profilleri Past programı kullanılarak, Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA) yöntemi ve suşlar arasındaki ilişki bantlara dayalı “Dice” benzerlik katsayısına göre değerlendirildi ve dendrogram oluşturuldu (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. MIRU-VNTR Sonucunda 13 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Suşarının Dendrogramı

MIRU-VNTR yöntemi ile *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* için toplam 6 genotip tespit edildi ve ayırt edici gücünün oldukça yüksek olduğu belirlendi (HGDI=0.9425). Kullanılan yöntemin lokuslara göre ayırt etme gücü Tablo 4.5’de gösterildi. Mac INMV veri tabanı” (<http://mac-inmv.tours.inra.fr>) yapılan analizler sonucunda; *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* MIRU-VNTR profiline %99 benzerlik gösterdiği tespit edildi.

Sunulan çalışmada Hunter-Gaston Ayrımcılık Endeksi (HGDI) değerleri hesaplanmıştır. MIRU292, MIRUX3 ve VNTR 32 lokuslarında iki alelik polimorfizm gözlemlendi.

Araştırma sonucunda tespit edilen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* izolatlarının MIRU-VNTR analizi sonucunda elde edilen genotip profilleri Mac INMV

veri daha önceden bildirilmiş olan *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* genotip profilleri ile karşılaştırıldığında, Fransa ve İrlanda izolatları ile benzer genotip profilinde olduğu tespit edildi.⁵⁴

Tablo 4.4. MIRU-VNTR sonucunda 13 *Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis* Örneğinin Allel Durumları ve HGDI Değerleri

Lokus	Allel sayısı***	Tekrar sayısı	HGDI*
MIRU 292	2	3(10), 4(3)	0.3846
MIRU X3	2	1(3), 2(10)	0.3846
VNTR 25	1	3(13)	0
VNTR 47	1	3(13)	0
VNTR 3	1	2(13)	0
VNTR 7	1	2(13)	0
VNTR 10	2	1(2), 2(11)	0.2821
VNTR 32	1	8(13)	0

*HGDI: Hunter-Gaston diversity index.

**Allellere ait Tekrar Sayıları:2,2,1,1,1,1,2,

5. TARTIŞMA

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* dünyada oldukça yaygın olan, başta sığırlar olmak üzere koyun, keçi, at, köpek gibi evcil hayvanlar ile geyik, tavşan, porsuk, bizon, deve, tilki, primatlar ve domuz gibi yaban hayatında yaşayan hayvanlarda ve hatta insanlarda hastalık yapabilme özelliğine sahip hücre içi zorunlu bir patojendir. Sunulan araştırma ile Erzurum ilinde entansif sığır yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı ilçelerde tesadüfi olarak belirlenen işletmelerde hem yetiştiriciden tam kan, hem de işletmedeki 2 adet inekten alınan kan serumu, tam kan ve gaita örneklerinde *M. avium* subsp. *paratuberculosis*'in yaygınlığı ve genotipik varyasyonları araştırılmıştır.

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*; John hastalığı ve Crohn hastalığının klinik ve histopatolojik bulguları birbirine benzemektedir. Bu nedenle MAP etkeninin her iki hastalığa da sebep olabildiği fikri 1917'den beri tartışılmakta olup birçok araştırmaya konu olmuştur.³⁷

2020 yılında Kuenstner ve ark.⁷⁰ yaptıkları çalışmada Crohn hastası kişilerin kanları alınarak buffy-coat tabakası çıkartılmış ve MAP kültürü ile 44.4 % (4/9) oranında pozitiflik bildirmişlerdir. 2004 yılında Naser ve ark.¹³ Crohn hastalarında 46.4% (13/28), Ülseratif kolitis 22.2 % (2/9) yangısal bağırsak problemi olmayan kişilerden 0% (0/15) MAP etkeni izole etmişlerdir. 2006 yılında Sechi ve ark.⁴³ bakteriyemi döneminde *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* enfeksiyonun Tip-1 Diyabet hastalığını tetikleyip tetiklemediği yönündeki araştırmalarında 63% (29/46) PCR pozitifliği bildirmişlerdir. Yaptığımız tez çalışmasında ise hayvan yetiştiriciliği yapan risk grubunda yer alan PCR pozitif olarak teşhis ettiğimiz insanlarda 6/6 kültür pozitifliği tespit edildi. Bu durumun kültür pozitif tesbit edilen kişilerde etkenin bakteriyemi döneminde olabileceğini düşündürmektedir.

Singh ve ark.¹⁴ Hindistan'da yaptıkları çalışmada ise, Paratüberkülozun endemik olduğu ve gastrointestinal problem gözlenen keçilerle temas eden kişilerde %2,9 oranında MAP (Hint bizonu tipi) prevalansı bulunduğunu belirtmiştir.¹⁴ Genel yayın tarama veri tabanlarından yapılan literatür taramalarında Türkiye’de Paratüberküloz pozitif bulunan işletmelerdeki sığırlarda ve bu işletmelerle yakından teması olan insanlarda MAP’ın izolasyonu ve MIRU-VNTR analizine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sunulan tez çalışmasında Singh ve ark.¹⁵ bulgularına paralel olarak hayvanlarla teması bulunan risk altındaki kişilerden eş zamanlı olarak alınan ve real time PCR yöntemiyle kan numunelerinde %3.3 oranında pozitiflik tespit edildi.

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*, sistemik dolaşıma makrofajlar aracılığı ile dahil olduktan sonra vücutta bir takım hücrel ve humoral tepkilere sebep olur. Hücre duvarındaki mürein yapısı nedeniyle savunma hücreleri içerisinde etkisiz hale getirilmekten kaçarak, latent faza geçip aylarca hatta yıllarca hastalık belirtisi göstermeden konakçısında yaşam döngüsünü sürdürebilir.⁵⁶

Paratüberkülozun epidemiyolojisine bakıldığında; hasta hayvanların subklinik dönemde hastalığı çevreye uzun bir süre bulaştırdığı görülmektedir. Böylece hayvan sahibinin haberi olmadan işletmeler kontamine olabilir ve çiftliklerde yeni doğanlar doğrudan veya dolaylı olarak MAP enfeksiyonuna maruz kalabilirler.

Bu çalışmada hayvanlardan alınan kan örneklerinde öncelikli olarak ELISA testinin yapılmasının amacı, klinik olarak belirti göstermeyen hayvanları serolojik olarak tespit ederek, serolojik olarak pozitif bulunan hayvanlardan alınan kan ve dışkı örneklerinden moleküler olarak etken varlığını tespit etmektir.

Türkiye’de sığır kan serumlarında direkt ELISA yöntemi ile yapılan seroprevalans çalışmalarında; Kars bölgesinde Makav ve ark.³¹ %3.5, Kırklareli Yöresinde Karakaş ve ark.³² %1.4, Ardahan ilinde Karatay ve ark.⁵⁷ %4.7, Şanlıurfa ilinde Çelik ve ark.⁵⁸

%4.51, Manisa Bölgesinde Berberoğlu ve ark.⁵⁹ % 21.72, Afyon bölgesinde Borum ve ark.⁶⁰ %31.80 , Türkiye genelinde Atala ve Akçay³⁰ 9 bölgede yaptığı çalışmada 1. Bölgeden başlamak üzere sırası ile %2.2, %3.6, %3.7, %3.6, %0, %1.2, %9.6, %4.5, %4.4 olarak pozitiflik tespit etmişlerdir. Dünyada yapılan seroprevalans çalışmalarında ise; Kuzey İrlanda da Guta ve ark.⁶¹ (%4.6), Kolombiya Tuta eyaletinde Sharon ve ark.⁶² %3.1, Gürcistan'da Melpence ve ark.⁶³ %9.58, Hindistan güneydoğu Bangalore bölgesinde Gupta ve ark.⁶⁴ %15.14, Belçika da Boelaer ve ark.³⁴ %9.5 ve Avusturya'da Dreier ve ark.⁶⁵ %10.1, oranında MAP a karşı oluşan antikör pozitif yanıtı tespit etmişlerdir.

Türkiye genelinde seroprevalans pozitiflik oranı 0 ila %31.8 arasında iken, dünyada bu oran % 3.1 ile %15.14 arasındadır. Bizim çalışmamız da Erzurum bölgesinde seroprevalans 5,7% oranında tesbit edilmiş olup çıkan sonuç dünyada ve Türkiye genelinde olduğu gibi ilimizde de etkenin sirküle olduğu ve hastalıktan muzdarip işletmelerin mevcut olduğu ortaya koyulmuştur.

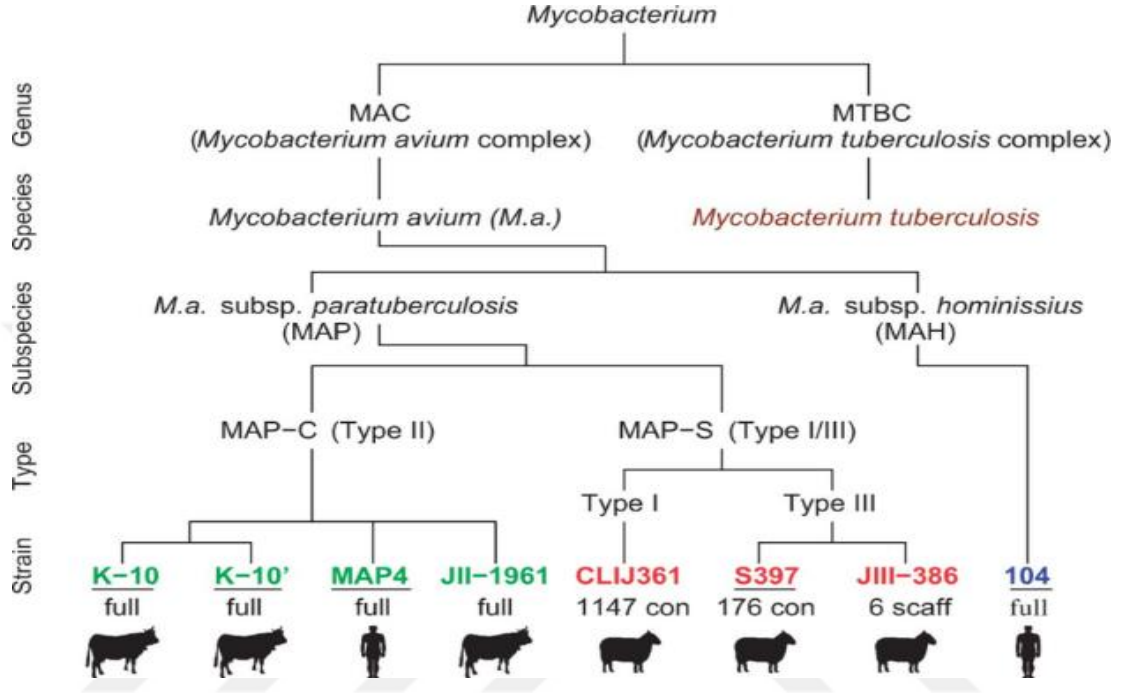
2004 yılında Florida Üniversitesinde Buergelt ve ark.⁶⁶ 4 yaşında erkek bir hayvandan alınan kan ve dışkı numunelerinden kültür, seroloji ve nested PCR analizleri uygulamışlardır. Yapılan dışkı kültürlerinde negatif sonuca ulaşılmıştır. Kan serumunda yapılan ELISA testinde pozitif sonuca ulaşılmıştır. Ayrıca kan numunelerinde yapılan nPCR çalışmalarında ise sonuç yine pozitiflik gözlenmiştir. Benzer bir çalışma 2010 yılında Viyana'da Khold ve ark.⁶⁷ tarafından ELISA ile teşhisi konulan paratüberküloz şüpheli bir boğadan itlaf öncesinde eş zamanlı olarak 9'ar kan, dışkı, semen ve itlaf sonrası iç organ numunesi alınmış kan numunelerinde yapılan ELISA ile MAP'a karşı spesifik antikör taramasının hepsi pozitif, MAP IS900 DNA 7 kan numunesinde 7 pozitiflik, F57 amplikonunda ise hiçbir kan örneği pozitiflik göstermemiştir. Dışkı

numunelerinde HEYM kültüründe çok sayıda üreme gözlemlenmiştir. Tüm dışkılarda IS900 ve F57 DNA örnekleri tespit edildiği bildirilmiştir.

2005 yılında ABD de Juste ve ark.⁶⁸ 278 sığırdan yapmış oldukları çalışmada hem ELISA hem de PCR sonucu pozitif olan %3.6, ELISA pozitif PCR negatif olan %25.2, ELISA negatif PCR pozitif sonuç veren %20.1 ve ELISA negatif PCR negatif veren ise %51.1 olarak bildirmişlerdir. 2015 yılında Pinedo ve ark.⁶⁹ ineklerde süt, kan ve dışkı örneklerinde serum ELISA, dışkı örnekleri ve Nested PCR sonuçları arasındaki ilişkinin araştırılması amacıyla yaptıkları çalışmada 328 süt sığırından %10 (33/328) oranında dışkı kültürü pozitifliği, %3,4 (11/328) kandan ELISA pozitifliği, %2.1 (7/328) ise Nested PCR pozitifliği sonuçlarını bulmuşlardır. Bu çalışma da en yüksek pozitifliğin ELISA testi ile 5,7% (24/420) elde edildiği belirlenmiş olup seropozitif hayvanlardan alınan dışkı kültürü ve real time PCR sonuçları genel olarak mevcut çalışmalardan düşük bulunmuştur. Bu durumu tez çalışmasında etken izolasyonunu hedeflediğimizden ELISA pozitif olan hayvanların dışkılarını ekime alınmış olmasına bağlamaktayız. Ayrıca PCR pozitif sonucunun düşük tesbit edilmesinin nedeninin etkenin epitel dokusuna yerleşip orada granülomlar oluşturduğu döneme denk geldiği düşünmekteyiz. Testler arasındaki karşılaştırmanın yapılabilmesi için örneklerin tamamında ELISA, kültür ve PCR denemelerinin yapılması gerekliliği görüldü.

Thibault ve ark.⁵⁴ tarafından yapılan çalışmada insanlardan ve sığırlardan Fransa kaynaklı nadir bulunan MIRU-VNTR paterni (INMV9) ve bir IS900 RFLP paternini (R01) Paratüberküloz suşu izole ettiklerini bildirmektedir. Benzer şekilde, Marcel ve ark.⁵³ yaptıkları çalışmada MIRU292, MIRUX3 ve VNTR 32 lokuslarında HGDI değerlerini yüksek bulmuştur. 2015 yılında Möbius ve ark.⁶⁹ tarafından sığır, insan ve hayvan kökenli suşlarda yapılan tüm genom analizinde (WGS) MAP ile sığır ve insan suşlarının ilişkili olduğunu ortaya koydular (Şekil 5.1).⁶⁹ Bizim çalışmamızda

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* izolatlarının benzer profilde bulunduğu izolatların insan ve sığır izolatları ile benzer çıkmış olup araştırma sonuçları ile uyumludur.⁵⁴



Şekil.5.1. MAP etkeninin kökeni

Bu verilere göre bir genelleme yapılırsa, değerlendirilme yapılan işletmelerde MAP varlığının devam ettiği gözlenmiştir. Genel olarak, ulusal ve uluslararası yaygınlık ile ilgili yapılan çok sayıdaki seroepidemiolojik araştırmada yaygınlığının %0 ile %32,8 arasında değiştiği belirlenmiş olup bu araştırmalarda bazı ırk ve yaş ayrımları açısından da doğru yorumlanma gerektiği vurgusu hem bizim hem de yabancı kaynaklı yayınlar için önem arz etmektedir. Süt sığırlarında hastalığın prevalansın tespitinde sürü bazlı kullanılabilecek en ucuz ve en uygulanabilir test günümüzde ELISA'dır. Subklinik pTB'li hayvanlar hastalığı sağlıklı olanlara bulaştırma eğiliminde olmaları nedeniyle bu tespit önemlidir.⁵⁷⁻⁶³

İnsan sağlığı, ülke ekonomisi ve süt sığırıcılığının kalitesi açısından önem arz eder. Paratüberküloz ve neden olduğu verim kayıpları ve yanı sıra sağlık açısından bu hastalığın sahip olduğu zoonotik potansiyeli bilinmesine rağmen kanaatimizce ülkemizde bu hastalığın bu bağlamda yaygınlığı üzerine yürütülmüş genel ve bölgesel bilimsel araştırma sayıları sınırlı olduğu düşüncesindeyiz.

Sonuç olarak yöremizde subklinik olarak MAP varlığının bulunması hastalığa karşı kontrol önlemlerinin alınması gerektiğinin göstergesi olabilir. Bununla birlikte; hastalığın yaygınlığının düşük olması paratüberkülozun bu yörede hayvancılık açısından olası bir tehdit oluşturduğu gerçeğini değiştirmemektedir.⁵⁷⁻⁶⁰

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İnsan ve sığır örneklerinde *M. avium* subspecies *paratuberculosis* teşhisi için real time PCR analizi gerçekleştirildi. Real time PCR hızlı, ucuz ve hassas bir testtir. Bakterinin kültürde izolasyonu için uzun süre inkübasyon ihtiyacı ve özellikle dışkı örneklerinin ekimlerine bağlı kontaminasyon kültürde izolasyonun rutinde kullanımını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle etkenin teşhisine yönelik daha hızlı sonuç veren real time PCR analizinin alternatif olarak kullanılabilecek oldukça hassas metot olduğu belirlendi.

Araştırmada seropozitif sığırların dışkı ve tam kan örneklerinden yapılan real time PCR analizinde pozitiflik bulunurken bu örneklerden izolasyon gerçekleştirildi. Kan serumu incelenen 24 seropozitif sığırın hem dışkı hem de tam kan örneklerinin yalnızca 6'sında etken pozitif tespit edildi ve kültürde izole edilebildi. Buna karşın seronegatif olduğu halde etken saçılımı olan sığır varlığı durumu değerlendirilemedi. Sonraki araştırmalarda hastalık tespit edilen sığır işletmelerindeki seronegatif ve seropozitif sığırlarda etken moleküler metotlar ile takip edilerek hastalığın patogenezi hakkında araştırmaların yapılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

Tam kan örneği alınan 210 işletme sahibinin 7'sinde *M. avium* subspecies *paratuberculosis* etkeni tespit edildi. Pozitiflik tespit edilen insanlardan birinin müzmin ishal şikayetlerinin olduğu anamnezi numune alınması esnasında öğrenildi. Bu bakterinin patogeneze uyumlu olsa da diğer ishale neden olan patojenler yönünden inceleme yapılmaması nedeniyle sonraki araştırmalarda özellikle hayvancılıkla geçimini sağlayan ailelerin bu tip rahatsızlıklarında *M. avium* subspecies *paratuberculosis*'in de analiz edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Hızlı tanı yöntemleri ELISA ve PCR testlerinin sürü taramasında kullanılması, süt ve dışkı ile enfeksiyonun saçılımına kaynak olan hasta veya şüpheli hayvanların erken

teşhisi sonrası itlaf edilmesi, hayvancılık işletmelerinde bulaş zincirinin kırılmasına ve üretilen hayvansal gıdanın kontaminasyonuna engel olacağı düşünülmektedir.

İnsan ve hayvan MIRU-VNTR profillerinin aynı olması hayvanlardan insanlara bulaşın söz konusu olabileceğini düşündürmekte olup halk sağlığı açısından yetiştiricilere hastalık hakkında eğitimlerin verilmesinin faydalı olabileceği düşünüldü.

Pozitiflik tespit edilen kişiler telefonla bilgilendirilerek bir sağlık kuruluşuna yönlendirildi.



KAYNAKLAR

1. Çetinkaya B, Muz A, Ertaş H, Öngör H, Sezen İ, Gülcü HB. Süt ineklerinde Paratüberküloz prevalansının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanması. *Turk J Vet Anim Sci*, 2000, 24: 371-379.
2. Abendaño N, Sevilla IA, Prieto JM, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from sheep and goats show reduced persistence in bovine macrophages than cattle, bison, deer and wild boar strains regardless of genotype. *Veterinary Microbiology*, 2013, 163: 325-334.
3. Nordlund K, Goodger W, Pelletier J, Collins M. Associations between subclinical *paratuberculosis* and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1996, 208: 1872-1876
4. Bao Y, Wu S, Yang T, Wang Z, Wang Y, Jiang X, Ma H. Analysis of long non-coding RNA expression profile of bovine monocyte-macrophage infected by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *BMC genomics*, 2022, 23, 1-17.
5. Karakaş B, Civelek T. Kırklareli yöresi süt sığırlarında subklinik paratüberkülozun seroprevalansı. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 2017, 11: 160-164.
6. Grant IR. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in animal-derived foods and the environment. *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*, 2010, 29-39.
7. Harris NB, Barletta RG. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, 14, 489-512.
8. Johne H, Frothingham L. Ein eigenthuemlicher fall von tuberculose beim rind. Dtsch. Z. Tiermed. *Pathology*, 1895, 21: 438-454.
9. Bannantine JP, Barletta RG, Stabel JR, Paustian ML, Kapur V. Application of the genome sequence to address concerns that *Mycobacterium avium* subspecies

- paratuberculosis* might be a foodborne pathogen. *Foodborne Pathogens & Disease*, 2004, 1, 3-15.
10. Collins DM, De Zoete M, Cavaignac SM. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguished by a PCR test based on a novel DNA sequence difference. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40, 4760-4762.
 11. Fawzy A, Zschöck M, Ewers C, Eisenberg T. Genotyping methods and molecular epidemiology of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP). *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 2018, 6, 258-264.
 12. El-Zaatari FA, Osato MS, Graham DY. Etiology of Crohn's disease: the role of *Mycobacterium avium paratuberculosis*. *Trends in Molecular Medicine*, 2001, 7, 247-252.
 13. Chiodini RJ. Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clinical Microbiology Reviews*, 1989, 2, 90-117.
 14. Naser SA, Ghobrial G, Romero C, Valentine JF. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *The Lancet*, 2004, 364, 1039-1044.
 15. Singh AV, Chauhan DS, Singh SV, Kumar V, Singh A, Yadav A, Yadav VS. Current status of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in animals & humans in India: What needs to be done?. *The Indian Journal of Medical Research*, 2016, 144, 661.
 16. Manning, E. J., & Collins, M. T. History of paratuberculosis. In Paratuberculosis: organism, disease, control. In: Marcel AB, Desmond M Paratuberculosis Organism, Disease, Control.. Wallingford UK: CABI. 2010 1-9.

17. Slana I, Kralik P, Kralova A, Pavlik I. On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 128, 250-257.
18. Whittington RJ, Windsor PA. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *The Veterinary Journal*, 2009, 179, 60-69.
19. Benedictus A, Mitchell RM, Linde-Widmann M, Sweeney R, Fyock T, Schukken YH, Whitlock RH. Transmission parameters of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in a dairy herd going through a control program. *Preventive Veterinary Medicine*, 2008, 83, 215-227.
20. Jubb TF, Sergeant ESG, Callinan APL, Galvin JW. Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johne's disease in Victorian dairy cattle herds. *Australian Veterinary Journal*, 2004, 82, 569-573.
21. Lu Z, Mitchell RM, Smith RL, Van Kessel JS, Chapagain PP, Schukken YH, Grohn YT. The importance of culling in Johne's disease control. *Journal of theoretical biology*, 2008, 254, 135-146.
22. Lambrecht RS, Collins MT. *Mycobacterium paratuberculosis*: factors which influence mycobactin-dependence. *Diagnosis and Microbiology of Infectious Diseases*, 1992, 15, 239-246
23. Grant IR, Williams AG, Rowe MT, Muir DD. Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71, 2853-2861.

24. Barkema HW, Hesselink JW, McKenna SL, Benedictus G, Groenendaal H. Global prevalence and economics of infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ruminants. In *Paratuberculosis: organism, disease, control*, 2010, Wallingford UK: CABI.
25. Kundan P.DTE. <https://www.downtoearth.org.in/news/health/amp/undetected-window-56036> 07 Aralık 2022.
26. Bannantine JP, Wu CW, Hsu C, Zhou S, Schwartz DC, Bayles DO, Paustian LM, Alt DP, Sreevatsan S, Kapur V, Talaat AM. Genome sequencing of ovine isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* offers insights into host association. *BMC genomics*, 2012, 13, 1-14.
27. Olsen I, Barletta RG, Thoen CO. *Mycobacterium*. In *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals: Fourth Edition* (pp. 113-132). 2010, Wiley-Blackwell..
28. Clarke CJ. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *Journal of comparative pathology*, 1997, 116, 217-261.
29. Koets, A. P., & Gröhn, Y. T. 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. *Veterinary Research*, 2015, 46(1), 1-4.
30. Atalan, Akçay E. Türkiye genelinde sığır paratüberkülozu prevalansının ELISA ile araştırılması. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 2001, 12, 39-48.
31. Makav M, Gökçe E. Kars yöresi sığırlarında subklinik paratüberkülozun seroprevalansı, 2013.
32. Karakaş B, Civelek T. Kırklareli yöresi süt sığırlarında subklinik paratüberkülozun seroprevalansı. *Kocatepe Veterinary Journal*, 2018, 11, 160-164.

33. Adaska JM, Anderson RJ. Seroprevalence of Johne's-disease infection in dairy cattle in California, USA. *Preventive Veterinary Medicine*, 2003, 60, 255-261.
34. Boelaert F, Walravens K, Biront P, Vermeersch JP, Berkvens D, Godfroid J. Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Veterinary Microbiology*, 2000, 77, 269-281.
35. Pence M, Baldwin C, Black III CC. The seroprevalence of Johne's disease in Georgia beef and dairy cull cattle. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 2003, 15, 475-477.
36. Fecteau ME. Paratuberculosis in cattle. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 2018, 34, 209-222.
37. Dalzie TK. Chronic interstitial enteritis. *The British Medical Journal*, 1913, 1068-1070.
38. Chacon O, Bermudez LE, Barletta RG. Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annu Rev Microbiol*. 2004;58:329-63
39. Sartor, R. B. Does *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cause Crohn's disease?, 2005 *Gut*, 54, 896-898.
40. Chiodini RJ. Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clinical Microbiology Reviews*, 1989, 2, 90-117.
41. Ozana, V., Hruska, K., & Sechi, L. A. (). Neglected Facts on *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Type 1 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022,23(7), 3657.
42. Bull, T. J., McMinn, E. J., Sidi-Boumedine, K., Skull, A., Durkin, D., Neild, P.,& Hermon-Taylor, J. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals

- with and without Crohn's disease. *Journal of clinical microbiology*, 2003,41, 2915-2923.
43. Sechi LA, Rosu V, Pacifico A, Fadda G, Ahmed N, Zanetti S. Humoral immune responses of type 1 diabetes patients to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* lend support to the infectious trigger hypothesis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2008, 15, 320-326.
 44. Cossu A, Rosu V, Paccagnini D, Cossu D, Pacifico A, Sechi LA. MAP3738c and MptD are specific tags of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in type I diabetes mellitus. *Clinical Immunology*, 2011, 141, 49-57.
 45. Ekundayo TC, Olasehinde TA, Falade AO, Adewoyin MA, Iwu CD, Igere BE. Ijabadeniyi OA. Systematic review and meta-analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as environmental trigger of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 2022, 59, 103671.
 46. Dow, C. T., & Alvarez, B. L. *Mycobacterium paratuberculosis* zoonosis is a One Health emergency. *EcoHealth*, 2022,1-11.
 47. Greenstein RJ, Collins MT. Emerging pathogens: is *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* zoonotic? *The Lancet*, 2004, 364, 396-397.
 48. Greenstein RJ. Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *The Lancet infectious diseases*, 2003, 3, 507-514.
 49. Paratuberculosis (Johne's Disease),
https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.16_PAR_ATB.pdf, 01 Aralık 2022.

50. Bryant JM, Thibault VC, Smith DG, McLuckie J, Heron I, Sevilla IA, et al. Phylogenomic exploration of the relationships between strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *BMC Genomics* 2016; Fawzy17:79.
51. Stabel JR. Johne's disease: a hidden threat. *Journal of Dairy Science*, 1998, 81, 283-288.
52. Khol JL, Kralik P, Slana I, Beran V, Aurich C, Baumgartner W, Pavlik I. Consecutive excretion of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in semen of a breeding bull compared to the distribution in feces, tissue and blood by IS900 and F57 quantitative real-time PCR and culture examinations. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2010, 1004280234-1004280234
53. Imirzalioglu C, Dahmen H, Hain T, Billion A, Kuenne C, Chakraborty T, Domann E. Highly specific and quick detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in feces and gut tissue of cattle and humans by multiple real-time PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49: 1843-1852.
54. Thibault VC, Grayon M, Boschirolu M L, Hubbans C, Overduin P, Stevenson K, Gutierrez MC, Supply P, Biet F. New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS 900 and IS 1245 restriction fragment length polymorphism typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45, 2404-2410.
55. Gümüşsoy KS, İça T, Abay S, Aydin F, Hizlisoy H. Serological and molecular diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 2015, 39, 147-153.
56. Weiss, D. J., Evanson, O. A., Moritz, A., Deng, M. Q., & Abrahamsen, M. S. (). Differential responses of bovine macrophages to *Mycobacterium avium* subsp.

- paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Infection and immunity*, 2002,70(10), 5556-5561.
57. Overduin P, Schouls L, Roholl P, Van Der Zanden A, Mahmmoud N, Herrewegh A, Van Soolingen D. Use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42, 5022-5028.
58. Karatay M., Akyüz E, Gökçe G. Seroprevalence of Paratuberculosis in Cattle in Ardahan Region. *Kocatepe Veterinary Journal*, 2020, 13, 327-331.
59. Çelik A, Tel Y. Şanlıurfa Bölgesinde Sığırlarda Paratüberküloz Seroprevalansının Belirlenmesi. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2022, 11, 100-105.
60. Berberoğlu M, Civelek T. Seroprevalence of subclinical paratuberculosis in dairy cattle in Manisa region of Turkey. *Kocatepe Veterinary Journal*, 2016, 9, 194-199.
61. Bodrum AE, Çatık S, Mecitoğlu Z, Demir G, Ülgen M, Şentürk S. ELISA ve fekal bakteriyoskopi ile sığırlarda Paratüberküloz prevalansının belirlenmesi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 2014, 25, 1-5.
62. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) and associated risk factors in Northern Ireland dairy cattle herds, <https://assets.researchsquare.com/files/rs-1917758/v1/bee226e9-bcaf-4bf6-a0df-c168513d5684.pdf?c=1662096597>, 01 Aralık 2022.
63. Cruz Estupiñan SE, Lancheros Buitrago DJ, Bulla Castañeda DM, Garcia Corredor DJ, Pulido Medellin MO. Serological diagnosis and risk factors associated with bovine paratuberculosis in the municipality of Tuta, Colombia. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 2022, 14, 38-46.

64. Pence M, Baldwin C, Black III CC. The seroprevalence of Johne's disease in Georgia beef and dairy cull cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2003, 15, 475-477.
65. Gupta A, Rani SM, Agrawal P, Gupta PK. Sero-prevalence of paratuberculosis (Johne's Disease) in cattle population of South-Western Bangalore Using ELISA Kit. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 2012, 2, 196-200
66. Dreier S, Khol JL, Stein B, Fuchs K, Güttler S, Baumgartner W. Serological, bacteriological and molecularbiological survey of paratuberculosis (Johne's disease) in Austrian cattle. *Journal of Veterinary Medicine, 2006, Series B*, 53, 477-481.
67. Buergelt CD, Donovan GA, Williams JE. Identification of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by polymerase chain reaction in blood and semen of a bull with clinical paratuberculosis. *Int Journal of Applied Research Veterinary Medicine*, 2004, 2, 130-134.
68. Juste RA, Garrido JM, Geijo M, Elguezabal N, Aduriz G, Atxaerandio R, Sevilla I. Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and sheep. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 2005, 17, 354-359.
69. Pinedo, P. J., Rae, D. O., Williams, J. E., Donovan, G. A., Melendez, P., & Buergelt, C. D. (). Association among results of serum ELISA, faecal culture and nested PCR on milk, blood and faeces for the detection of paratuberculosis in dairy cows. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2008, 55(2), 125-133.
70. Kuenstner, J. T., Potula, R., Bull, T. J., Grant, I. R., Foddai, A., Naser, S. A., ... & Shafran, I. Presence of infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

in the blood of patients with Crohn's disease and control subjects shown by multiple laboratory culture and antibody methods. *Microorganisms*, 2020,8(12), 2054.



EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Doğum tarihi: Doğum Yeri: Medeni Hali: Uyruğu: Adres: Tel: Faks: E-mail:
Eğitim
Lise: Lisans: Yüksek lisans: Doktora:
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: Almanca: - Rusça: -
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ Graduate School of Health Sciences	
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU¹		
Öğrencinin Adı ve Soyadı	Yasemin ERDOĞAN	
Öğrencinin Numarası		
Ana Bilim Dalı	Tıbbi Mikrobiyoloji	
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Doktora	
Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.		
Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	%15	% 15
II. Genel Bilgiler	%4	% 35
III. Materyal ve Metod	%17	% 35
IV. Bulgular	%10	% 15
V. Tartışma	%2	% 20
<i>Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5 'den büyük olmaması gerekir.</i>		
Tez Yazarı (Öğrenci)		Tez Danışmanı

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU**



KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	+90 442 234 65 11
	FAKS	+90 442 236 09 68
	E-POSTA	atatipetikkurul@gmail.com
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		Prof.Dr.Hakan USLU
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI		Erzurum İlinde Süt Sığırlarında ve Risk Grubu İnsanlarda Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis'in Teşhisi ve Miru-Vntr Yöntemiyle Genotiplendirilmesi
KARAR BİLGİLERİ	Toplantı Sayısı: 08 Karar No: 07	Tarih: 01.10.2020
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin TAGEM tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	

EK-4. ERİŞKİN HASTALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırma Projesinin Adı: Erzurum İlinde Süt Sığırlarında ve Risk Grubu İnsanlarda *Mycobacterium Avium* Subspecies *paratuberculosis*'in Teşhisi Miru-Vntr Yöntemiyle Genotiplendirilmesi

Sorumlu Araştırmacının Adı: Yasemin ERDOĞAN

Diğer Araştırmacıların Adı:

“Erzurum İlinde Süt Sığırlarında ve Risk Grubu İnsanlarda *Mycobacterium Avium* Subspecies *paratuberculosis*'in Teşhisi Miru-Vntr Yöntemiyle Genotiplendirilmesi” isimli bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmaya davet edilmenizin nedeni *Mycobacterium avium* paratüberküloz hastalığı taşıma açısından riskli grupta olmanız. Bu çalışma, araştırma amaçlı olarak yapılmaktadır ve katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir. Bu araştırma, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında, Prof.Dr. Hakan USLU'nun sorumluluğu altındadır.

Çalışmanın amacı nedir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

Bu çalışmada amaç Erzurum Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsünün çalışma sahasında yer alan Erzurum ilinde yetiştiriciliği yapılan süt sığırlarında MAP varlığının tespiti sağlanması hastalıkla mücadele ve koruma kontrol önlemlerinde önemli bir basamak teşkil edecektir. Ayrıca geleneksel usulde yetiştiriciliği yapılan hayvancılık işletmelerinde bu sığırların bakımı ile ilgilen hayvan bakıcıları ve hayvansal ürünlerini tüketen kişiler risk grubunda olmaları nedeniyle bu yolla herhangi bir bulaş söz konusu olup olmadığının araştırılması da amaçlanmaktadır. Böylece alınan örneklerde hayvanlarda hastalığın prevalansının belirlenmesi ve insanlara bu yolla bulaşın söz konusu olup olmadığı ve bulaş söz konusu olması durumunda etkenin genetik kimliğinin

ortaya konması ile insan ve hayvanlarda MAP ın genetik yakınlığını araştırılmış olacaktır.

Epidemiyolojik olarak Erzurum ilinde büyükbaş hayvancılığın yoğun yapıldığı (%90),merkez-ova-güney ilçelerdeki yaşı >36 ay olan dişi anaçlardan (210.)bin %1 i örneklenecek. Örnekleme inek sayısından ziyade daha fazla yetiştirici sürüsü baz alınarak %1 e ulaşılacak yani mümkün mertebe işletmelerin(n=210/420) her birinden örneklem yapılacaktır. İşletme sayısı kadar risk grubunda yer alan hayvan bakıcısı seçilecektir. Böylece pozitif bulma ve bunun temsiliyet gücü artırılabilecektir.yaklaşık 210 kişiden kan numuneleri alınılması planlanmaktadır.

Bu çalışmaya katılmalı mıyım?

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemez iseniz veya çalışmadan ayrılırsanız, doktorunuz tarafından sizin için en uygun tedavi planı uygulanacaktır. Aynı şekilde çalışmayı yürüten doktor çalışmaya devam etmeniz sizin için yararlı olmayacağına karar verebilir ve sizi çalışma dışı bırakabilir, bu durumda da sizin için en uygun tedavi seçilecektir.

Bu çalışmaya katılırsam beni ne bekliyor?

- Steril antikoagülanlı mor tüpler içerisinde 3-4 ml kan örneğiniz alanınıda uzman Sağlık çalışanı tarafından alınacaktır.
- Araştırmanın süresi 1 yıldır. Bir defaya mahsus olmak kaydı ile kan örneğiniz alınacaktır.
- Kan örneğinizden PCR metodu ile paratüberküloz var olup olmadığı saptanacaktır.,

Çalışmanın riskleri ve rahatsızlıkları var mıdır?

1. Steril olarak çalışılacağından herhangi bir risk taşımamaktadır.
2. Araştırmadan dolayı göreceğiniz olası bir zararda gerekli her türlü tıbbi girişim tarafımızdan yapılacaktır; bu konudaki tüm harcamalar da tarafımızdan karşılanacaktır.

Çalışmada yer almamanın yararları nelerdir?

Mycobacterium paratüberküloz hastalığının insan hayvan ilişkisi araştırılacak,Hastalıktan korunma,kontrol ve tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde önemli bir basamak teşkil edeceği düşünülmektedir.

Bu çalışmaya katılmamın maliyeti nedir?

Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak?

Çalışma doktorunuz kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde, sizinle ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Çalışmanın sonunda, kendi sonuçlarınızla ilgili bilgi istemeye hakkınız vardır. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

Daha fazla bilgi için kime başvurabilirim?

Çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI: Yasemin ERDOĞAN

GÖREVİ: Doktora Öğrencisi

TELEFON:

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalında, Yasemin ERDOĞAN tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının

bilincindeyim). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırmadan elde edilen benimle ilgili kişisel bilgilerin gizliliğinin korunacağını biliyorum.

Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, yukarıda numarası ve açık adresi belirtilen Yasemin ERDOĞAN'ı belirtilen adresten arayabileceğimi biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

AYDINLATMA ve KATILIMCININ BEYANI KESİNLİKLE BİRBİRLERİNİN
DEVAMI ŞEKLİNDE OLACAKTIR. AYRI AYRI SAYFALARDA YER
ALMAYACAKTIR.

