

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA BÖLGESİNDE SIĞIRLARDA
PARATÜBERKÜLOZ SEROPREVALANSININ
BELİRLENMESİ**

Ali ÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman Yaşar TEL**

**ŞANLIURFA
2022**

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA BÖLGESİNDE SIĞIRLARDA
PARATÜBERKÜLOZ SEROPREVALANSININ
BELİRLENMESİ**

Ali ÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman Yaşar TEL

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 19315 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA
2022

TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmamın her aşamasında her tŸrlŸ yardımlarını esirgemeyen, baŐta danışman hocam Prof. Dr. Osman Yaşar TEL olmak Ÿzere kıymetli bilgilerini benimle paylaŐan, Prof. Dr. Oktay KESKİN, Prof. Dr. Sevil ERDENLİŐ GŸRBİLEK'e, ArŐ. GŸr. Ayfer GŸLLŸ YŸCETEPE'ye, yardımlarını esirgemeyen mesai arkadaşlarım Veteriner Hekim Mehmet DOLAŐ, Veteriner Hekim Mustafa HALHALLİ'ya verdiği emeklerden dolayı teŐekkŸr ederim.

Ali ÇELİK
2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ	v
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Etiyoloji.....	2
2.2. Epidemiyoloji	2
2.3. Paratüberkülozun Türkiyedeki yaygınlığı.....	3
2.4. Paratüberkülozun Dünyada Yaygınlığı.....	5
2.5. Bulaşma	7
2.6. Patogenez.....	7
2.7. Klinik Tablo.....	8
2.8. Ekonomik Önemi.....	9
2.9. Teşhis.....	10
2.9.1 Nekropsi.....	11
2.9.2 Bakteriyoskopi	11
2.9.3 Bakteriyolojik Kültür.....	12
2.9.4 PZR.....	13
2.9.5 Serolojik Testler.....	14
2.9.6 Hüresel Bağışıklık Testleri	16
2.10. Tedavi.....	16
2.11. Koruma ve Kontrol.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18

3.1 Gereç	18
3.1.1 Serumlarının Toplanması.....	18
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Malzemeler.....	18
3.2 Yöntem.....	19
3.2.1 ELISA Testinin Yapılışı	19
3.2.2 ELISA ile sonuçların değerlendirilmesi	20
3.2.3 İstatistiksel Analiz.....	20
4. BULGULAR	21
5. TARTIŞMA	24
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	28
7. KAYNAKLAR.....	29
8. EKLER.....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3.1. Kullanılan <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> antikor test kiti.....	19
Şekil 4.1. Sığır serumlarının antijen-antikor reaksiyonu sonucunda vermiş oldukları renk reaksiyonu.....	23



TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 4.1. Şanlıurfa ilinde paratüberküloz seroprevalansı (sayısal)	21
Tablo 4.2. Şanlıurfa ilinde paratüberkülozun sığırlarda ırka göre dağılımı.....	22
Tablo 4.3. Şanlıurfa ilinde paratüberkülozun sığırlarda yaşa göre dağılımı.....	22



KISALTMALAR VE SİMGELER

ABD:	Amerika Birleşik Devletleri
AGID:	Agar Jel İmmunodiffüzyon
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
IV:	Intravenöz
ML:	Mililitre
PCR:	Polymerase Chain Reaction
CFT:	Complement Fixasyon Testi
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
Mg:	Miligram
A.B.D.:	Ana Bilim Dalı

ÖZET

ŞANLIURFA BÖLGESİNDE SIĞIRLARDA PARATÜBERKÜLOZ SEROPREVALANSININ BELİRLENMESİ

Ali ÇELİK

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Bu çalışmada, önemli ekonomik kayıplara neden olan kronik enfeksiyöz bir hastalık olan Paratüberküloz'un Şanlıurfa'daki Sığırlarda seroprevalansının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, tesadüfi örnekleme ile sağlıklı 465 adet Sığırdan alınan serumlar çalışmada kullanılmıştır. Serum örneklerinden Paratüberküloz antikorlarını tespit etmek amacıyla ELISA testi kullanıldı. Test, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi. Test sonucunda toplamda 465 serumun 21 (%4.51) tanesinde pozitif reaksiyon belirlenirken, 16 (%3.4)'sı şüpheli ve 428 (%92) serum ise negatif olarak saptandı.

Ülkemizde paratüberküloz varlığı uzun yıllardır bilinmektedir. Farklı yörelerde bu hastalıkta prevalans tespitine yönelik çalışmalar yürütülmüş olup, Şanlıurfa bölgesi sığırlarında paratüberkülozun prevalansını ortaya koyan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma sonucunda 21 (%4.51) hayvanın seropozitif olarak saptanması bölgede hastalığın var olduğunu ve bölgemizde hem ekonomik kayıp oluşturması nedeniyle hem de hayvan refahı için Paratüberküloz'a karşı koruma ve kontrol önlemlerinin alınmasının gerekliliği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Paratüberküloz, sığır, ELISA, Şanlıurfa*

ABSTRACT

DETERMINATION OF PARATUBERCULOSIS SEROPREVALENCE IN CATTLE IN ŞANLIURFA REGION

Ali ÇELİK

Department of Microbiology, Master's Thesis

In this study, the seroprevalence (positivity) of paratuberculosis, which is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium avium subsp.* and causes significant, economic losses, was detected in healthy cattle in Sanliurfa. For this purpose, sera from randomly selected 465 healthy cattle were used in the Central Districts of Şanlıurfa Province between Autumn 2019 and Fall 2021. In our study, *Mycobacterium avium subsp.* ELISA test was used to detect paratuberculosis (MAP) IgG antibodies. The test was carried out in line with the manufacturer's instructions. As a result of the test, 21 (4.51%) out of a total of 465 sera gave positive reaction. Sixteen sera (3.4%) gave doubtful results and 428 (92%) sera were found to be negative.

The existence of paratuberculosis in our country has been known for many years. Studies have been conducted to determine the prevalence of this disease in different regions, and no study was found that demonstrates the prevalence of paratuberculosis in cattle in Şanlıurfa region. This study was the first one in this regard. In the study, antibodies were detected against *Mycobacterium avium subsp.* indicating the presence of the disease in the region. Therefore, it was concluded that it was extremely important to reveal the prevalence of the disease in our country and related prevention measures should be taken against Paratuberculosis (MAP).

Keywords: *Paratuberculosis*, cattle, ELISA, Şanlıurfa

1. GİRİŞ

Paratüberküloz (Johne Hastalığı) yabani ve evcil ruminantların sindirim sistemini etkileyen ve önemli ekonomik kayıplara neden olan kronik enfeksiyöz bir hastalıktır. Enfeksiyon sindirim sisteminde granulatöz yangıya neden olur, hayvan kademeli olarak zayıflar ve sonrasında ölüme neden olmaktadır (Alaçam ve ark. 1997).

Türkiye’de paratüberküloz sığırlarda ilk defa 1928 yılında Sezginer tarafından (Sezginer, 1928), koyunlarda ise 1968 yılında Marmara bölgesinde (İzmit) Hakioglu tarafından (1968) teşhis edilmiştir. Keçilerde ise iç Anadolu bölgesinde 1973 yılında ilk defa Alibaşoğlu ve ark. (1973) tarafından rapor edilmiştir.

Paratüberküloz bulaşıcı bir hastalıktır. Yayılma enfekte olan hayvanların dışkı ve sütleriye olur ve canlılığını uzun süre dış ortamda koruyabilir. Paratüberküloz’un hasta hayvanlardan insanlara enfekte su, et ve süt ürünlerinin tüketilmesi sonucu bulaştığı bildirilmiştir. Hayvanlar doğumunun ilk dönemden itibaren hastalanıp, 2-6 yaş aralığında klinik belirtilere rastlanır. Hastalıkta mikroorganizma önce bölgesel lenf yumrularına yayılır daha sonra klinik belirtilerin ortaya çıkmasıyla teşhis edilmektedir (Alibaşoğlu ve ark. 1973, Çetinkaya ve ark. 1997, Osterstock ve ark. 2010). Hasta hayvanların %1’i ölür, %50’si ise klinik belirti göstermeden yaşamlarını sürdürürler. Bu hayvanlarda verim kaybı dikkati çeken bulgudur (Andrews AH 1992).

İnsanlardaki Crohn’s hastalığının etiolojisinde paratüberküloz’un rol aldığı bildirilmiştir (Pickup ve ark. 2004). “Crohn hastalığı” 1932 yılında, Ginsburg ve Oppenheimer tarafından Crohn: sindirim sisteminde görülen bir hastalık olarak tarif edilmiştir. Crohn Hastalığı, sık ishal nöbetleri, dayanılmaz ağrı, malabsorbsiyon gibi belirtileri olan, kronik seyreden bir hastalık olarak bildirilmiştir (Nancy N. Buckley M. 2007). Tipik bir Crohn hastalığı için semptomlar; karın ağrısı (%84), kilo kaybı (%80) ve kronik ishal (%79)’dir.

Son dönemde sığırlardaki Johne hastalığı ile insanlardaki Crohn hastalığı etkenin aynı olduğu konusunda görüşler bulunmaktadır (Scanu ve ark. 2007). Geçen yüzyılın başından beri süren düşünce ve tartışmalar günümüze kadar gelmiştir. Thomas Dalziel ilk defa sığır ve insanlarda kronik inflamatuvar barsak hastalığının Johne hastalığına benzer olduğunu belirtmiştir (Dalziel TK. 1913). Crohn hastalığının etiolojisinde paratüberkülozun Crohn hastalığına neden olduğu görüşü sığırlardaki Johne hastalığının patomorfolojik olarak benzer olmasındandır (Güner A. 2004).

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Etiyoloji

Paratüberküloz önce *Mycobacterium paratuberculosis* (eski adı *M. johnei*) adıyla bilinen bakterinin oluşturduğu hastalıktır. Son yıllarda gelişen moleküler karakterizasyon ile etken *Mycobacterium avium*'un alt türü olarak sınıflandırılmış olup *M. avium subsp. paratuberculosis* (MAP) olarak rapor edilmiştir (Harris NB ve Barletta RG 2001).

MAP, *M. avium*'dan, PCR'da insersiyon sekansı olarak tanımlanan (IS900) kısa bir DNA elementinin çok sayıda kopyasının olmasıyla ayırt edilmektedir. Bu nedenle etkenin klinik örneklerde tespiti veya kültürlerde identifikasyonu genellikle IS900 varlığına dayandırılarak yapılmaktadır. *M. avium subsp. avium*'da IS901, *M. avium subsp. sylvaticum*'da IS902 gen lokasyonu olmasıyla ortaya konmaktadır (Gilardoni ve ark. 2012, OIE 2013, Whittington RJ ve ark. 1998).

Genetik olarak *M. avium*'a benzer (>%99) bulunan etken, memelilerin tüberküloz kompleksindeki patojenik mikobakteriler (*M. tuberculosis* ve *M. bovis*) ve insanlarda lepranın etkeni olan *M. leprae*'dan farklıdır (Akay Ö. 1997, Quinn PJ ve ark. 2005, Yardımcı H. 2006).

Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis; küçük (0,5x1,5 mikron), kısa ve kalın çomakçıklar şeklinde, sporsuz, Gram pozitif, kapsülsüz, hareketsiz ve aside dayanıklı bir bakteridir. Bakterinin en ayırt edici özelliği, invitro gelişimi için ekzojen mikobaktine bağlı olmasıdır. Mikobaktin kimyasal olup demir elementi taşır ve bakterinin çoğalması için gereklidir (Akay Ö. 1997, Quinn PJ ve ark. 2005, Yardımcı H. 2006).

MAP patojeni mikobakterilere göre daha küçüktür. Ziehl-Nielsen boyamada tipik asidorezistans boyanma özelliğine sahiptir. Etken dokularda bireysel bakteri olarak görülmez ve makrofajlar içerisinde kümelenmiş olarak bulunur. Bakteri çevresel etkilere karşı oldukça dirençlidir ve ahır şartları ve dışkıda 1 yıldan daha uzun süre canlılığını korur. Hastalığın ortamdan elimine edilmesi için krezol içeren dezenfektanlar ve sodyum ortofenil fenat kullanılmaktadır (Whittington RJ ve ark. 2004).

2.2 Epidemiyoloji

Dünyanın her yerinde paratüberküloza rastlanılmakta ve yaygınlığı (prevalans) bölge ve ülke olarak farklılık göstermektedir. Avustralya'nın bazı bölgeleri bu

hastalıktan ari'dir. İsveç'te bu hastalık pek yaygın değildir. Almanya'da bu hastalığın prevalansı %84.7, ABD'de %50, Danimarka'da %47, Kanada'da %43 olarak kayıtlara geçmiştir (Collins MT ve ark. 1994, Jakobsen MB ve ark. 2000, Van Leeuwen JA ve ark. 2001, Hacker U ve ark. 2004, Holmstrom A ve Stanlund S. 2005).

Paratüberkülozun epidemiyolojisinde son 20 yıldaki en büyük gelişme paratüberküloz ile insanda granülomatoz enterit semptomu ile seyreden Crohn hastalığı arasında bağlantı olduğunun bildirilmesi ile sağlanmıştır. Paratüberküloz, her iki hastalıktaki klinik ve histopatolojik benzerlikten dolayı Crohn hastalığının muhtemel modeli olarak 1972'de önerilmiştir. Ancak paratüberküloz'un insandaki Crohn hastalığı patogeneziyle ilişkili olduğuna dair yeterli bilgi bulunmadığı bildirilmesine rağmen (Patterson DSP ve Allen WM. 1972), 1984'te dört Crohn hastasının dokularından paratüberküloz'un izole edilmesi ile etkenin rolü olduğunu gösterilmiştir (Chiodini RJ ve ark. 1984).

Doğal koşullarda bulaşma, kontamine olmuş çevreden paratüberküloz'un ağız yoluyla alınmasıyla olmaktadır ve enfekte olan hayvanların sürüye katılmasından sonra bulaşmasının yanında süt ile de dışarı çıkarıldığı bildirilmektedir (OIE 2013, Akay Ö. 1997, Yardımcı H. 2006, Quinn PJ 2005). Buzağular genellikle çok erken yaşlarda enfekte olan hayvanların dışkıları ile atılan etkeni ağız yolu ile almasıyla enfekte olmaktadır (Quinn PJ 2005, Windsor PA. ve Whittington RJ. 2010). Buzağular uterusu, doğumdan sonra dışkı veya kolostrum vasıtasıyla oral yolla enfekte olmalarına rağmen klinik semptomlar 2 yaşından sonra ortaya çıkmaktadır (Doré E ve ark. 2012). Bir aylıktan küçük yaşta küçük buzağuların enfeksiyona daha duyarlı oldukları ve yaşamlarının daha ileri dönemlerinde enfeksiyonlu olan hayvanlara oranla bu hayvanlarda hastalığın klinik formunun daha fazla görüldüğü rapor edilmiştir (Quinn PJ ve ark. 2005). Paratüberküloz'un inkübasyon süresi uzun ve değişkenlik göstermektedir. Klinik olarak hastalık, 2 yaşın altındaki sığırlarda çok nadiren görüldüğü bildirilmiştir (OIE 2013, Quinn PJ ve ark. 2005). Ancak hastalığın bazı hayvanlarda klinik belirtiler ve görünür kayıplar olmaksızın subklinik bir formda seyrettiğide belirtilmiştir (Akay Ö. 1997, Quinn PJ 2005, Doré E ve ark. 2012).

2.3 Paratüberkülozun Türkiyedeki Yaygınlığı

Coğrafi konumu itibariyle çok sayıda ülke sınırına sahip olan ülkemiz, salgın hastalık tehdidinde sürekli maruz kalmaktadır. Sığır vebası ile mücadelede başarı

kazanılmış olsa da, Türkiye’de koyun ve keçi vebası, şap, kuduz, mavidil, tüberküloz, paratüberküloz, bruselloz, listerioz ve şarbon hastalıkları halen görülmektedir. AB üye devletlerinde bu hastalıklarla mücadele programları başlatılmış ve bu programların bazılarında başarı elde edilmiştir. Türkiye’nin AB’ye üye olması halinde, hayvan ve hayvansal ürün hareketlerinde bu hastalıkların engel teşkil edeceği öngörülmektedir (Duman G.K. 2005).

Paratüberküloz Türkiye’de ilk kez 1928 yılında Sezginer ve 1932 yılında Akçay ve Erbil tarafından sığırlarda teşhis edilmiştir. Aynı hastalık 1968 yılında Hakioglu tarafından İzmit bölgesinde koyunlarda bulunmuştur. Keçi paratüberkülozu ise ülkemizde ilk olarak Alibaşoğlu ve ark. tarafından 1969 yılında tespit edilmiştir (Alibaşoğlu ve ark. 1973).

Atala ve Akçay (2001), Türkiye genelinde sığırlarda paratüberküloz’un prevalansını ELISA ile %4.6 olarak bulmuşlar. Ancak Nielsen ve Toft (2009), 1990-2007 yılları arasında Avrupa’da sığırlar üzerinde yapılan çalışma sonuçlarını, testlerin sensitivitelerini dikkate alarak değerlendirdiklerinde, Türkiye’de gerçek prevalansın %4.6 değil %20 olacağını ileri sürmüşlerdir. İç Anadolu bölgesinde mikro ve tüp komplement fikzasyon yöntemleri ile yapılan serolojik bir çalışmada sığırlarda seroprevalans sırasıyla %2.3 ve %2.7 olarak tespit edilmiştir (Vural B. ve Atala N. 1988). Elazığ ilinde sığırlardan alınan 500 süt örneğinin kültür ile %3.4’ünde, PZR ile ise örneklerin %5’inde etkenin saptandığı (Çetinkaya ve ark. 2000) belirtilmiştir. Batı Anadolu ve Trakya’da sığırlardan alınan 96 dışkı örneğinde PZR ile etkene spesifik DNA’ya rastlanmadığı rapor edilirken (İkiz ve ark. 2005), Uşak ilinde 200 süt sığırından alınan gaita örneklerinin %20’sinde, süt örneklerinin ise %17.5’inde PZR ile pozitiflik saptandığı belirtilmiştir (Hailat ve ark. 2010). Burdur ilinde süt sığırlarında yapılan bir çalışmada (Öztürk ve ark. 2010) hastalığın bireysel prevalansı %6.2, sürü prevalansı ise %58.3 olarak tespit edilmiştir. Kars ilinde sığırlarda yapılan serolojik bir çalışmada ise bireysel prevalans %3.5, sürü prevalansı %41.6 olarak belirlenmiştir (Makav M. ve Gökçe E. 2013). Afyon ve çevresindeki çiftliklerden yaş aralığı 4-8 olan 305 Holstein-Fresian sütçü sığırdan alınan kan serumu örneklerinin ELISA ile %31.8’inde pozitiflik saptanmıştır (Borum ve ark. 2014). Ülkemizde hastalığın koyunlarda prevalansının araştırıldığı bir çalışma mevcuttur (Büyük ve ark. 2014). Kars bölgesinde 26 koyun sürüsünde 24 ay ve üzerinde olan hayvanlardan toplanan 450 kan serumu paratüberküloz yönünden ticari bir ELISA kiti ile incelendiği araştırmada;

sürülerin 15'inde en az bir hayvan Map antikoru yönünden pozitif bulunmuş, bireysel, sürü-içi ve sürüler-arası görünen prevalans sırasıyla %6.2, %10.2 ve %57.7 saptanmış, hastalığın gerçek prevalansı ise sırasıyla %8.3, %14.6 ve %90 olarak hesaplanmıştır. Trakya Bölgesinde rastgele seçilen 30 işletmedeki 2 yaş ve üzeri süt sığırlarından alınan 270 gaita örneği ile bu işletmelerin ve buldukları köylerin süt toplama tanklarından alınan 45 çiğ süt örneği real-time PZR ve nested-PZR ile incelenmiş, ancak örneklerde MAP DNA'sı tespit edilememiştir (Özpinar ve ark. 2015).

2.4 Paratüberkülozun Dünyada Yaygınlığı

Kanada'da mezbahada kesilen 984 sütçü sığırın ileumları ve mesenterial lenf nodülleri toplanarak histolojik ve bakteriyolojik olarak incelenmiş ve paratüberküloz %16.1 olarak belirlenmiştir. Histolojik testin bakteriyolojik yöntemden daha az duyarlı olduğu ve hasta hayvan sayısının özellikle haziran ayında en yüksek oranda (%42.5) saptandığı belirtilmiştir (Mckenna ve ark. 2004).

Çek Cumhuriyeti'nde 131 inekten alınan gaita, süt ve çeşitli doku örnekleri paratüberküloz yönünden incelenmiş ve hayvanların %37.4'ünde etken izole edilmiştir. İzolasyon en fazla ince bağırsaklardan yapılırken, dalak ve meme bezlerinden izolasyon yapılamamıştır. Hayvanların %8.4'ünün gaitasında etken tespit edilmiş, ancak süt numuneleri negatif bulunmuştur. Enfeksiyon 1-3 yaş aralığındaki hayvanlarda en yüksek (%42.9), 8 ve üzeri yaşlardaki hayvanlarda ise en düşük oranda (%6.1) saptanmıştır. Ayrıca 5 aylık bir buzağının gaitasından da izolasyon yapıldığı bildirilerek, enfeksiyona 1 aydan küçük 7 hayvanda rastlandığı ve bu durumun intrauterin bulaşmaya ilgili olabileceği ileri sürülmüştür (Hasanova ve ark. 2009).

Hollanda'da 378 çiftlikte 3 yaşında olan 15822 inekten alınan kan serumu *Mycobacterium phlei* ekstraktı içeren bir tampon ile sulandırıldıktan sonra uygulanan ticari bir ELISA kiti ile incelenmiş, sürülerin 207'sinde (%55) en az bir veya daha fazla hayvanın serolojik olarak pozitif saptandığı, kullanılan testin sensitivitesi (0.3-0.4) ve spesifitesi (0.985-0.995) dikkate alınarak hastalığın bireysel ve sürü bazında gerçek prevalansının sırasıyla %2.7, %6.9 ve %31, %71 olarak bulunduğu bildirilmiştir (Muskens ve ark. 2000). Aynı yöntemle Belçika'da 556 sürüden 2 yaş ve üzerinde olan 13317 inekten alınan kan serumları incelendiğinde, görünen bireysel, sürü-içi ve sürü prevalans değerleri sırasıyla %0.87, %2.9 ve %18 olarak belirlenmiştir. Gerçek bireysel,

sürü-içi ve sürü prevalans değerleri hesaplandığında bu değerlerin sırasıyla %2, %7 ve %6 olduğu, sürülerin yetiştirme yönüne göre ise sürü prevalans değerlerinin sütçü, karışık ve etçi sürülerde sırasıyla %10, %11 ve %3 olarak değiştiği belirlenmiştir (Boelaert ve ark. 2000).

İrlanda'da 2005 yılı boyunca 639 sürüdeki 1 yaş üstü 20322 inek ve boğalardan alınan kan serumları ELISA ile incelenmiş, sürü prevalansı %21.4 olarak belirlenmiştir. Sütçü sürülerde ortalama prevalans %31.5 iken, etçi sürülerde bu oran ortalama %17.9 olarak belirlenmiştir. Bireysel prevalans ise %2.86, 2 yaşın üzerindeki hayvanlarda ise %3.30 olarak rapor edilmiştir (Good ve ark. 2009). Almanya'da sütçü sığırlardan alınan 896 kan serumunun ELISA ile 38'i pozitif bulunarak, hastalığın görünen prevalansı %4.2 olarak belirtilmiştir. Kullanılan ELISA'nın özelliklerine dayandırılarak gerçek prevalansın %6.7 olduğu ve pozitiflik oranının yaşlı hayvanlarda daha yüksek olduğu açıklanmıştır (Denzin ve ark. 2011). Hindistan'ın güney-batı Bangalore bölgesinde 350 inek serumunun 53'ünde (%15.14) ve 300 inek sütünün ise 55'inde (%18.33) indirek ELISA ile pozitiflik saptanmıştır (Gupta ve ark. 2012).

Hailat ve ark. (2010), Ürdün'de 8 ile 24 aylık sağlıklı ivesi koyunlarının yaklaşık %50'sinde paratüberkülozla ilgili histopatolojik lezyonların varlığına dikkat çekmişlerdir. Pakistan'da mezbahada kesilen 47 koyundan alınan kan ve doku örnekleri paratüberküloz yönünden incelenmiş, intestinal patolojik lezyonlar hayvanların %4.12'sinde paratüberküloz gözlenmiş. Tuşe preparatların ve doku kesitlerinin asit-fast boyamalarında bağırsakların %12.76'sında, mesenterik lenf yumrularının ise %10.63'ünde pozitiflik saptanmış ve indirekt ELISA ile incelenen kan serumu örneklerinin %10.63'ü pozitif bulunmuştur. Histopatoloji ile indirek ELISA'nın paratüberküloz enfeksiyonunun kesin teşhisi için birlikte kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Sikandar ve ark. 2013).

İran'da paratüberküloz DNA'sı 144 sığır, 110 koyun ve 95 deve kanı ile 83 boğa spermasında nested PZR ile araştırılmış ve 11 sığır (%7.64), 11 koyun (%14.55), 7 deve (%7.34) kanı ile 7 boğa spermasında (%9.64) pozitiflik saptanmıştır. Bu nedenle İran'da hastalığın diğer hayvanlara ve özellikle insanlara bulaşmasında sığır, koyun ve develerin olası bir risk yaratacağı ileri sürülmüştür (Khamesipour ve ark. 2014).

2.5 Bulaşma

Paratüberküloz'un yayılmasında, doğumdan sonra fekal ve oral yolla bulaşma en önemli nedenler arasındadır. Hastalığın inkubasyon süresi uzun olup ortalama 10 yıldır (Klee ve ark. 2004) ve bu sürenin sonunda hasta olan hayvanlar etkeni dışkılarıyla ortama yaymaya başlarlar. Bir milyon bakterinin çevreye yayılması bir gram dışkı ile olabilmektedir (Whitlock ve ark. 2005). Hasta olan hayvanların etkeni dışkılarıyla 18 aylıktan önce yaymadıkları düşünülmektedir. Genç olan buzağuların etkeni dışkılarıyla yaydığı ve diğer buzağulara hastalığı bu şekilde bulaştırdığı yapılan çalışmalarla kayıt edilmiştir (Bolton ve ark. 2005). Doğumhanelerde yeni doğan buzağularda bulaşma, memenin fekal kontaminasyonu sonucu annelerini emmeleriyle etkeni oral yolla alırlar. Klinik belirti göstermeyen hayvanların kolostrum ve sütlerinde de paratüberküloz etkenine rastlanmıştır (Baumgartner W. ve Khol JL. 2006).

2.6 Patogenez

Paratüberküloz hücre içi bir patojendir ve hücrel reaksiyonlar sonucu enterik lezyonlar oluşmaktadır. Etken oral yolla bulaşıp sindirim yoluyla alınır. Peyer plaklarında makrofajlar bulunur bu makrofajlar etkeni fagosite ederler ve etken bu hücrelerin içinde çoğalıp canlılıklarını hücrelerin içinde devam ederler. Hastalığın ilerleyen zamanlarında, submukozada ve lamina propriada belirgin bir halde makrofajlar ve lenfositler birikir ve immun yanıt sonucu ortaya granülatöz reaksiyonlar oluşmaya başlar. Bağırsak duvarında ve bölgede bulunan lenf yumrularında makrofajlar çok miktarda mikobakteri içerir. Bağırsaklarda oluşan bozukluk sonucu enteropati oluşup, gıda ve su emilimi bozulur ve buda plazma proteinlerinin kaybına neden olmaktadır (Quinn PJ ve ark. 2005).

Bölgesel lenf nodüllerinde ve sindirim sisteminde oluşan enterik lezyonlar, ileum duvarında kalınlaşmaya ve bağırsaklarda oluşan kıvrımların beyin görünümü alması, paratüberkülozun ayırt edici özelliğidir. Sindirim sisteminde non-nekrotik fibrozis, enterit ve diffuz granülatöz değişiklikler teşhis edilir. Hastalıklı hayvan çok zayıflamış ve yağ depoları atrofiye uğramıştır (Osterstock ve ark. 2010).

2.7 Klinik Tablo

Subklinik enfeksiyon döneminde hasta olan hayvan klinik belirti göstermez. Etken bu dönemde çok yavaş bir yayılım göstermektedir. Yılların geçmesiyle artık sürü enfekte olarak tanımlanabiliyor. Enfeksiyon oranının düşük olduğu sürüler çok iyi yöntemlerle yönetilen sürüler olarak düşünülmektedir. Sığırlarda klinik paratüberküloz vakalarına daha çok 3-6 yaş aralığında rastlanılmaktadır (Baumgartner W. ve Khol JL. 2006). Enfeksiyona yakalanmış olan hayvanlarda ilk klinik belirtiler daha çok doğumdan sonra ortaya çıkmaktadır (Klee ve ark. 2004). Görünen ilk semptom sürekli ve aralıklı diyare olup sonra zaman zaman normal hale gelen diyaredir. İştah bazen azalır bazende normal olup yemden yararlanma azalır. Zaman geçtikçe hayvanda kronik kilo kaybı görülmektedir. Bunun yanı sıra, kıl yapısında kabalaşma, deride döküntü ve deride kuruma meydana gelmektedir. Hastalığın ilerleyen evrelerinde mandibula bölgesinde ödematöz şişlikler oluşur ve süt veriminde azalmalar dikkati çekmeye başlar. Projektil ishal ve kaşeksi hastalığın son döneminde ortaya çıkan tipik bir özelliktir. Paratüberkülozun bilinen herhangi bir tedavi yöntemi yoktur (Baumgartner W. ve Khol JL. 2006). Hastalığın oluşumu 4 evrede incelenmektedir; bunlar sessiz enfeksiyon dönemi, subklinik dönem, klinik dönem ve ilerlemiş klinik form dönemleridir.

Sessiz enfeksiyon dönemi: Etken ileum ve jejunum mukozasında fagositik hücreler tarafından tutulmakta olup ve burdanda lenf yumrularına dağılmaktadır. Bu dönemde, dışkıdan alınan örneklerle etkenin teşhisi çok zordur. Ancak sindirim kanalından elde edilen doku kültürü, çok azda olsa, paratüberküloz'un teşhisinde kullanılabilir. Bu sessiz enfeksiyon dönem hastalığın 2 yaşından başlayıp 10 yıl kadar devam etmektedir (Smith S. ve Bradford P. 2001, Mecitoğlu Z.ve Demir G. 2012).

Subklinik hastalık dönemi: Sitotoksik T lenfositleri paratüberküloz antijenine karşı immun yanıt oluştururlar. Bu enfekte dönemde hasta hayvanda kilo kaybı ve ishal görülmez (Stricklands ve ark. 2005). Bu evrede paratüberküloz'lu hayvanlar etkeni dışkılarıyla saçıp bütün sürüyü enfekte hale getirirler. Bazı hasta hayvanlardan alınan dışkı kültürleri pozitif çıkabilir. Bu hastalık evresi bir kaç yıl sürebilir, bu hastanın immun yanıtına veya vücuttaki paratüberküloz yoğunluğuna göre değişir (Andrews AH. 1992).

Klinik form dönemi: Şiddetli ishal ve kilo kaybı bu dönemin karakteristik özelliğidir. Aralıklı olan ishal birkaç hafta daha devam eder. Kalp frekansları, solunum ve vücut ısıları normal seyrederek. Bu dönemde alınan dışkı kültürü, serum ELISA ve AGID testleri pozitif sonuçlar vermektedir (Andrews AH. 1992).

İlerlemiş klinik form dönemi: Hayvanlar kaşektik olup aşırı zayıftırlar. Projektil ishal bu evrede gözlenir. Subklinik dönemden bu evreye geçiş, hızlı bir şekilde haftalar içinde olur. Bu evrede çene altında oluşan ödem ayırt edicidir. Oluşan ishal sonucu hipoproteinemi oluşur. Aşırı dehidrasyon ve kaşeksi sonucunda ölüm gerçekleşmektedir (Blood ve ark. 2000).

2.8 Ekonomik Önemi

Paratüberküloz süt sığırlarında, ekonomik maliyet kaybına neden olan, tedavisi bulunmayan yaygın bir hastalıktır. Klinik paratüberkülozda ölüm kaçınılmaz olup, verim kayıpları, tedavi maliyetinin yüksekliği, mastitis, infertilite, vb. yönlerden ekonomik önem arz etmektedir. Ayrıca yetiştiricilerin şüpheli olguları gizlemesi ve hastalığı kabul etmemeleri nedeniyle de hastalığın gerçek prevalansı tam olarak bilinmemektedir. Whitlock ve arkadaşları 2005'te bir çalışma yapmış ve ABD'nin bu hastalıktan dolayı yaşadığı ekonomik kayıp yıllık olarak 1,5 milyar dolar olduğu ortaya konmuştur (Whitlock ve ark. 2005). Sharma ve arkadaşları ise yaptığı çalışmada bu ekonomik kaybın 220-250 milyon dolar olduğunu belirtmişlerdir (Sharma ve ark. 2008). Türkiye'de farklı çalışmalar yapılmış fakat hastalığın ülkemize yaptığı etkiler ve kayıplar net olarak belirlenmemiştir (Mecitoğlu Z.ve Demir G. 2012).

Diğer adıyla Johne hastalığı olarak bilinen paratüberküloz, sığır, koyun, keçi, geyik, manda, ve diğer geviş getiren hayvanları etkilemektedir. Dünya çapında yaygın olan paratüberküloz, süt ve süt ürünleri sektöründe çok önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Behr MA. 2010).

Hayvan kaybına ek olarak süt ve döl veriminin azalması, aşırı kilo kaybı, düşük kilo ve düşük doğurganlık gibi kayıplar bu hastalığın önemini arttırmaktadır (Köhler ve ark. 2003). Benedictus ve ark (1987)'na göre, önceki laktasyona kıyasla yaklaşık %5, hastalığın klinik aşamasında ise inekte %19.5 oranında süt verimi azalır. Subklinik hayvanlarda bu düşüş %6 ila %16 arasındadır (Benedictus ve ark. 1987, Otto ve ark. 1991). Stabel, (1998) yapmış olduğu araştırmada mali kayıpların sürülerin üretim

sistemleriyle alakalı olduğunu bildirmiştir. Bu mali kayıplar ABD'de 1.5 milyar dolar olarak tahmin edilmektedir.

2.9 Teşhis

Paratüberkülozun tanısında bakteriyel kültür yoluyla mikroorganizmanın identifiye edilmesi altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak hastalığın başlangıç evrelerinde etkenin çıkarılmaması veya aralıklı olarak çıkarılması yanında kültür protokollerinin yetersiz kalması gibi nedenlere bağlı olarak, enfekte hayvanların tanısında bu yöntemin her zaman doğru sonuca götürmediği de bilinmektedir (Gilardoni ve ark. 2012, Ayele ve ark. 2001). Bu nedenle diğer teşhis yöntemlerinin de dikkate alınmasında yarar bulunmaktadır. Diğer teşhis yöntemleri arasında; klinik belirtilerin saptanması, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi moleküler teknikler, konakçının humoral [enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA), komplement fikzasyon, agar jel immuno difüzyon gibi testler] veya hücresel (alerjik deri testi, gama interferon testi gibi) immun yanıtının saptanması ve mikroskopik lezyonların histopatolojik yoldan tanımlanması sayılabilir (Harris NB. 2001, OIE. 2013, Quinn ve ark. 2005, Ayele ve ark. 2001).

Paratüberküloz teşhisinde kullanılan testlerin sensitivite (duyarlılık) ve spesifiteleri (özgüllük), incelenen hayvanların yaşına ve hastalığın evresine göre değişiklik gösterdiği için tanıda sorunlarla karşılaşılacaktır (Gilardoni ve ark. 2012, Diéguez ve ark. 2007). Klinik belirtilerin ciddiyetine ve teşhis olasılığına göre; paratüberkülozun gizli, klinik, subklinik ve ilerlemiş olmak üzere 4 evreye ayrılabilceği belirtilmiştir (Gilardoni ve ark. 2012, Ayele ve ark. 2001). Paratüberkülozun teşhisi genel olarak klinik hastalığın teşhisi ve subklinik enfeksiyonun tespiti olarak iki kısımda incelenebilir (OIE. 2013). Klinik olarak şüpheli bir hayvanda hastalığın teşhisi; gaitadan hazırlanan frotilerin direk mikroskopisi, gaita veya doku örneklerinden moleküler tekniklerle teşhis, gaita ve doku örneklerinden kültür, histopatoloji, nekropsi ve serolojik teknikler gibi laboratuvar testleri ile yapılabilmektedir (Gilardoni ve ark. 2012, OIE. 2013, Quinn ve ark. 2005). Subklinik enfeksiyonun teşhisi ise serolojik testler ile spesifik antikorların tespiti, dışkı veya nekropside alınan dokularda etkenin izole edilmesi ve hücresel immun yanıtın ortaya konulmasıyla yapılmaktadır (Gilardoni ve ark. 2012, OIE. 2013). Subklinik dönemdeki ineklerin gaita

ile etkeni çıkarmalarına göre düşük (<10 CFU/g), orta (10-50 CFU/g) ve yüksek (>50 CFU/g) fekal saçıcılar diye alt gruplara ayrılabilceği ileri sürülmüştür (Crossley ve ark. 2005).

2.9.1 Nekropsi

Bağırsağın ileum mukozasının son kısmı patognomonik bir bulgu olarak kalınlaşmış ve kıvrımlı (beyin görünümü) bir hal almıştır. Mesenterik lenf yumruları genellikle büyümüş ve ödemli bir şekil almıştır. Etkilenmiş mukoza ve lenf yumrularından alınan kesit yüzünden hazırlanan preparatlar Ziehl-Neelsen boyama yöntemiyle boyanarak asit-fast bakteriler yönünden mikroskopik olarak incelenebilir. Ancak asit-fast bakteriler tüm olgularda bulunmayabilir. Bu nedenle, bağırsak duvarının farklı yerlerinden alınan örnekler ile mesenterik lenf yumrusu örneklerinin histolojik muayenesi teyit için gereklidir (Akay Ö. 1997, Gilardoni ve ark. 2012, Nielsen SS. ve Toft N. 2008).

2.9.2 Bakteriyoskopi

Dışkı veya intestinal mukozadan hazırlanan kesitlerden, Ziehl-Neelsen boyama yöntemiyle boyanan preparatlarda küçük (0,5-1,5 µm) ve kümeler halinde asit-fast basillerin görülmesi ile teşhis yapılabilmektedir. Basit, ucuz ve hızlı olması bu yöntemin avantajı olmasına karşın, dezavantajı ise kolostrum, gaita, ve süt örneklerinde düşük sensitivite ve spesifiteye sahip olması ve diğer mikobakteri türlerinden ayırımının yapılamamasıdır. Özellikle gözle görülen lezyonlara sahip ileosekal valf veya intestinal lenf yumrularından hazırlanan froti veya doku kesitlerinde, lezyonda mevcut makrofajlar içinde belirgin olarak boyanmış 10-20 basil grubunun gözlenmesi paratüberküloz yönünden oldukça anlamlıdır (Gilardoni ve ark. 2012, OIE. 2013, Akay Ö. 1997).

Bakteriyoskopi, veteriner hekimler için sahada uygulanılabilen ucuz ve pratik bir yöntemdir (Nielsen ve ark. 2001, Yıldırım D. ve Civelek T. 2013). Klinik belirti göstermeyen vakalarda kullanımı uygun değildir çünkü sensitivitesi düşük olup bunun yanı sıra, dışkı kültürüne göre güvenilirliği de azdır (Smith S. ve Bradford P. 2001). Froti hazırlanıp mikroskopla incelendiğinde asit-faz mikroorganizmaların epitel

hücrelerindeki tipik kümelenmesine bakılır. Teşhisin doğruluğunu saptamak için aynı örnekten birkaç froti daha hazırlanıp mikroskopla incelenmesi gerekmektedir (Muskends ve ark. 2003).

2.9.3 Bakteriyolojik Kültür

Bakteriyolojik kültür metodu semptomatik/aseptomatik paratüberküloz'un tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir. Klinik semptomlar ortaya çıkmadan önce (1-3 yıl) bu yöntemle teşhisi yapılır (Muskends ve ark. 2003). Ortalama 2-4 aylık bir inkubasyon süresi sonunda etken izole edilmektedir. Likid besi yeri kullanımı bu süreyi 3 haftaya kadar indirmektedir (Botcher J. ve Gangl A. 2004). Paratüberkülozu diğer *Mycobacterium* türlerinden ayıran en çarpıcı farkı, yavaş üremesi olup, üremesi içinde ortamda mikobaktine ihtiyaç duyulmasıdır (Andrews AH. 1992, Muskends ve ark. 2003). Kültürün sensitivitesinin düşük olmasının nedeni etkenin bölgesel lenf yumrularına geç ulaşması ve fekal yayılımın geç başlamasıdır. Daha yüksek spesifite, sensitivite ve maliyeti azaltmak ve için aynı yaş grubundaki en az 5 hayvandan dışkı örnekleri alınıp karıştırılır ve elde edilecek bu dışkı örnek havuzu bakteriyel ekim amacıyla kullanılabilir (Collins ve ark. 2005).

Bakteriyolojik kültür enfeksiyonun kesin teşhisini sağlar, yanlış pozitif sonuç vermez ve %100 spesifiteye sahip olan bir test olduğu gibi teknik olarak zor ve zaman alıcı bir işlemdir (OIE. 2013). Kültür için gaita, süt, kolostrum ve bağırsak mukozasından alınan kazıntı örneğinden yararlanılabileceği açıklanmıştır (Gilardoni ve ark. 2012, OIE. 2013). Canlı hayvanlardan alınan gaita kültürünün paratüberküloz'un teşhisi için kullanılan en iyi örnek olduğu, hastalığın ilerleyen dönemlerinde hayvanların çoğunu saptayabildiğini ancak enfeksiyonun başlangıç dönemlerinde bu metodun çok az hayvanı teşhis edebileceği belirtilmiştir. Bu metodun klinik belirtiler gelişmeden 6 ay önce veya daha fazla süre içinde olan hasta hayvanları teşhis edebileceği, ancak belirtilerin başladığı dönemde sensitivitesinin %100'e ulaştığı bildirilmiştir (Whitlock ve ark. 2005).

Kültür yöntemleri, kullanılan besiyerlerine ve örnek işleme protokollerine göre değişkenlik göstermektedir. Paratüberkülozun kültürünü yapmak için özel besi yeri daima mikobaktin J ilave edilir (Güner A. 2004, Gilardoni ve ark. 2012). Kültür yapılırken örnekler dekontaminasyon işlemine tabi tutulmaktadır çünkü fekal ve

intestinal doku örneklerinde bulunan diğer bakteri ve mantarlar paratüberkülozun üremesini baskılayabilmektedir (OIE. 2013). Kültür işleminde, mikobaktin içeren Herrold'un yumurta sarılı besiyeri, Dubos'un modifiye besiyeri, modifiye Middle brook 7H10, BACTEC 12B, Middle brook 7H9, 7H10 ve 7H11 besiyeri ile mikobaktinli veya mikobaktinsiz Löwenstein–Jensen besiyerleri kullanılabilir (Gilardoni ve ark. 2012, OIE. 2013). Katı besiyerinde MAP kültürü için, kullanılan belli başlı 2 temel yöntem bulunmaktadır. Birinci yöntem de dekontaminasyon için okzalik asit ve NaOH, üretmek için de Löwenstein–Jensen besiyerinin kullanılmaktadır. İkinci yöntem de ise dekontaminasyon için hexadecylpyridinium chloride ile muamele ve bakteriyi üretmek içinde Herrold'un yumurta sarılı besiyeri kullanılmaktadır (OIE. 2013). Sığır kökenli izolatların, mikobaktin içeren her iki besiyerinden (Löwenstein–Jensen ve Herrold'un yumurta sarılı besiyeri) ürettiği ama Herrold'un yumurta sarılı besiyerinde daha iyi ürettiği bildirilmiştir ancak bazı suşların Löwenstein–Jensen ve Middle brook besiyerlerinde daha iyi üredikleri de rapor edilmiştir (De Juan ve ark. 2006).

Kültür işlemlerinin dezavantajı; kimyasal dekontaminasyon ve olası çevresel kurumaya bağlı olarak canlı bakteri sayısında azalma olması ve uzun inkübasyon süresidir (Gilardoni ve ark. 2012, OIE. 2013, Yardımcı H. 2006). MAP kolonileri besiyerinde, inokülasyondan 5 haftadan 6 aya kadar geçen süre içinde görülebileceği (Gilardoni ve ark. 2012, OIE. 2013) ve rutin dekontaminasyon protokollerinin gaita ve dokularda bulunan etkenin sayısında sırasıyla yaklaşık 2.7 log₁₀ ve 3.1 log₁₀ azalmaya yol açacağı belirtilmiştir (Reddacliff ve ark. 2003). Klinik vakalardan alınan örneklerde kültürün spesifitesi %100 olup, kültür pozitif durumlarda üreyen bakterileri tanımlamak için moleküler yöntemlere gerek duyulacağı da açıklanmıştır (Whittington ve ark. 1998).

2.9.4. PZR

Paratüberküloz için spesifik olan insertion sekans 900 (IS 900) tespiti bu hastalığın tanısında çok önemlidir. Etkene spesifik IS900 sekansını saptayan PZR, kültür sonuçlarını doğrulamak ve kan, süt ve doku örneklerinde teşhis amacıyla kullanılabilir (Juste ve ark. 2005).

Paratüberküloz da, kolostrum, süt, gaita, jejunal veya ileosekal lenf yumruları ile ileum veya jejunumdan alınan dokulardan ve kültür yöntemiyle elde edilen bakteriyel

izolatları hızlı bir şekilde identifiye etmek içinde DNA problemleri geliştirilmiştir. Ayrıca bu DNA problemleri ve paratüberküloz ile diğer mikobakterileri birbirinden ayırt etmede kullanılmaktadır (OIE. 2013, Buergelt ve ark. 2004, Sevilla ve ark. 2002). MAP genomunda 15-20 kopya halinde 1,451 baz çiftine sahip IS900 insersiyon sekansı karakterize edilmiş olup, IS900 insersiyon sekansını hedef alan PZR tekniği ile bakteriyel DNA'nın spesifik identifikasyonu çok az miktarda olsa bile mümkün olmaktadır (Gilardoni ve ark. 2012, OIE. 2013, Whittington ve ark. 1998, Sukumar ve ark. 2014). Moravkova ve ark. (2008) uyguladıkları IS900, IS901 ve IS1245 ile DNA J geni gibi eş zamanlı amplifiye olan sekansları kullandıkları multipleks PZR ile Map ve diğer *M. avium* alt türlerini (*M. aviumsubp. hominissuis*, *M. aviumsubp. avium* ve *M. aviumsubp. silvaticum*) birbirinden ayırt etmişlerdir.

Araştırmacılar, PZR tekniklerinin oldukça pahalı olmasının yanında uygulanma sırasında kontaminasyon oluşabilme ihtimaliyle de pozitif sonuçlar verebildiği ve alınan materyallerde bulunabilecek bazı maddelerin Taq polimeraz enzimi üzerinde inhibitör etki oluşturmamasından dolayı yanlış negatif sonuçlar verebilme olasılığının bulunduğuna dikkat çekmişlerdir (Güner A. 2004, Moravkova ve ark. 2008, Ireng ve ark. 2009).

2.9.5 Serolojik Testler

Paratüberkülozun kültür ile teşhisi pahalı, zaman alıcı ve zor olduğundan Map'a karşı gelişen antikörlerin varlığını ortaya koymak amacıyla ELISA, agar jel immüno difüzyon, komplement fikzasyon, gibi serolojik testlerden yararlanılmaktadır (Quinn ve ark. 2005, Ayele ve ark. 2001, Coelho ve ark. 2007).

Serolojik teşhis amacıyla en sık kullanılan yöntemlerden birisi ELISA'dır. Bu test diğer testlere oranla ucuz, kolay ve tekrarlanabilir olması, çok sayıda örneğin birlikte değerlendirilebilmesi, sonuçların objektif yorumlanabilmesi gibi avantajlara sahiptir (Gilardoni ve ark. 2012). Ayrıca anerjiden (antijene duyarsızlık) dolayı, ilerlemiş evre dışındaki ve özellikle de klinik dönemde sensitivite ve spesifitesinin oldukça yüksek olması nedeniyle hastalığın prevalansının araştırılacağı sürüler için hala en iyi yöntem olduğu belirtilmektedir. (Gilardoni ve ark. 2012, OIE. 2013). Woodbine ve ark. (2009), MAP'a karşı gelişen antikörlerin sığırların yaşı ile birlikte arttığını, Coelho ve ark. (2007) ise MAP'a karşı antikör gelişmediği için ELISA'nın 2 yaşından

daha genç olan enfekte hayvanları saptayamadığını bildirmişlerdir. Nielsen (2008), etkenin gaita ile atılımı başlamadan önce MAP'a karşı gelişen antikorların ELISA ile genellikle saptandığını ve bu nedenle ELISA'da elde edilen pozitif bir sonucun enfeksiyöz hale gelebilecek hayvanları önceden tespit etmede faydalı olacağını ileri sürmüştür. Uygun test yönteminin seçimi şartlara ve testlerin bireysel veya sürü düzeyindeki sensitivitesine bağlıdır. Genellikle sürü testi olarak tercih edilen ticari ELISA ile sensitivite ve spesifiteler arasında farklılıklar olabileceği ve bir sürüde hastalığın farklı dönemlerinde hayvanlar da bulunabileceği için kültür, PZR ve ELISA sonuçları arasında da uyumsuzluklar görülebileceği ileri sürülmüştür (Diéguez ve ark. 2009, Khol ve ark. 2012).

ELISA, paratüberküloza karşı gelişen özel antikorların tespiti için kullanılan yaygın bir yöntemdir. Ticari test kitlerine göre spesifitesi %84.7-99.8 ve sensitivitesi %27.8-44.5 arasında değişim göstermektedir. Test amaçlı olarak serum ve süt örnekleri kullanılmaktadır (Collins ve ark. 2005, Khol ve ark. 2012). Dışkı kültürü pozitif çıkan hayvanlarda ELISA'nın spesifitesi %98.7 ve sensitivitesi %57 olarak kabul edilmiştir. Etkeni saçan subklinik hayvanlarda sensitivite %15 iken, klinik semptom gösteren hayvanlarda %87 olarak rapor edilmiştir (Jubb ve ark. 2004). Enfekte olan hayvanlarda humoral immun yanıtın geç oluşmasıyla, yeni enfekte olmuş hayvanlarda ELISA'nın sonucu yanıltıcı olabilmektedir. Bu durum ELISA metodunun başlıca dezavantajı olarak görülmektedir (Klee ve ark. 2004). Paratüberkülozun teşhis yöntemlerine göre ELISA, klinik semptom göstermeyen enfekte hayvanlarda en güvenilir yöntem olarak kabul edilmektedir (Gupta ve ark. 2012).

Komplement Fiksasyon testi (CFT) paratüberkülozun teşhisi kullanılan başka bir yöntemdir. Klinik semptom gösteren hayvanlarda testin sensitivite ve spesifitesi %90 ve %70 olarak belirtilmiştir.

Agar gel İmmunodiffüzyon yöntemi klinik belirti gösteren hayvanlarda kullanılır. Düşük maliyetli ve hızlı sonuç alınabilen bir yöntemdir. Sensitivite ve spesifite oranları %96 - %94 olarak belirtilmiştir (Botcher J.ve Gangl A. 2004).

2.9.6 Hücresel Bağışıklık Testleri

Bir hayvan paratüberküloz ile temas ettiğinde ilk olarak gecikmiş tip (Tip IV) aşırı duyarlılık reaksiyonu gelişir ve bu durum intradermal test ile saptanabilmektedir (OIE. 2013). Test sahada kolay uygulanabilir, hücresel bağışıklığın gaita ile etkenin çıkarılmasından önce geliştiği için subklinik dönemdeki enfekte hayvanları serolojik testler ve bakteriyel kültürden daha erken teşhis edebileceği bildirilmiştir (Gilardoni ve ark. 2012). Ancak testin sensitivitesi düşük ve çapraz-reaksiyonlardan dolayı düşük spesifiteye sahiptir ve bu nedenle kontrol programları öncesi sadece bir başlangıç testi olarak kullanılabilirliği belirtilmiştir (Gilardoni ve ark. 2012, OIE. 2013, Quinn ve ark. 2005).

Paratüberkülozun erken dönemlerinde interferon-gama salgılandığından, subklinik dönemdeki hayvanları teşhis etmede interferon-gama testinden de yararlanılabilmektedir. Spesifik antijen ile 1,5-3 günlük bir inkübasyon süresince hassas hale getirilen lenfositler tarafından üretilen interferon-gama ölçümüne dayanan bir test olan gama interferon testi, aslında sığır tüberkülozunun teşhisi için geliştirilmiştir (OIE. 2013).

2.10 Tedavi

Paratüberkülozda tedavi girişimleri isoniazid, isoniazid + rifampin, isoniazid + etambutol, ya da bu üç ilacın ortak kullanılması şeklinde yapılmış, ancak başarısız olmuştur (Gezon ve ark. 1988). Yine de bazı tedavi reçeteleri bireysel vakalarda tedavi devam ettikçe hastalığın klinik bulgularını hafifletmiştir. Buna rağmen nekropside toplanan dokulardan hazırlanan kültürlerden etken izole edilebilmektedir. Mevcut reçetelerden biri streptomisin sülfat (0,5 g intramüsküler) + isoniazid (25 mg peros) + sodyum aminosalisilatın (850 mg peros) günlük olarak altı ay boyunca verilmesidir (Zahinuddin M. ve Sinha RP. 1984).

2.11 Koruma ve Kontrol

Hastalığın bilinen etkili bir tedavi yöntemi yoktur (OIE. 2013 , Yardımcı H. 2006 , Ayele ve ark. 2001). Paratüberküloz hastalığının kontrol altına alınması ya da eradike edilmesi; çoğunlukla subklinik seyretmesi, inkübasyon periyodunun uzun olması ve özellikle enfeksiyonun subklinik seyrettiği hayvanlarda doğru teşhise götüren testlerin yetersiz olması gibi nedenlerden dolayı oldukça zordur. Sığır sürülerinde, hastalığı kontrol etmek için hastalığın yayılmasını önleyici hijyenik önlemlerin alınması, enfekte hayvanların sürüden çıkarılması ve aşılamalara dayanır. Klinik semptom gösterenler ile klinik veya laboratuvar sonuçlarına göre subklinik enfekte olduğu tespit edilen hayvanlar sürüden çıkarılmalıdır. Ayrıca çiftlik veya sürü düzeyinde subklinik enfekte hayvanlar, 6 aylık aralıklarla yapılan PZR ve gaita kültürü gibi moleküler teknikler ile etkenin tespit edilmesi veya serolojik/alerjik testler ile saptanarak sürüden ayrılmalıdır. Hastalığa karşı adjuvantlı inaktif aşılar bulunmaktadır ve bazı ülkelerde aşılama kontrol tedbirlerinin bir parçası olarak yer almaktadır. Sığırlarda aşılama ile klinik olgu sayısı azaltılabilir. Ancak aşılama yoluyla bir sürüden hastalığın elimine edilmesi söz konusu değildir. Ayrıca aşıları hayvanlar genellikle tüberküline duyarlı hale geleceğinden, bu durum hastalığın yanlış teşhis edilmesine ve hastalığın daha fazla yayılmasına sebep olmaktadır. Aşılama, küçük ruminantlarda hastalığın kontrol altına alınmasında, hijyenik bakım tedbirleri ile birlikte uygulanan en yaygın işlemdir (Harris NB. ve Barletta RG. 2001, Whittington ve ark. 1998, Akay Ö. 1997, Quinn ve ark. 2005, Ayele ve ark. 2001).

Bu çalışmada, önemli ekonomik kayıplara neden olan kronik enfeksiyöz bir hastalık olan Paratüberkülozun Şanlıurfa'daki sığırlarda seroprevalansının ELISA ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Serumların Toplanması

Bu çalışmada 2018 Sonbahar ile 2020 Yaz ayları arasında Şanlıurfa Merkez ilçelerinden 27 işletmeden Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerine gelen toplam 465 adet sığır serumu çalışmanın materyalini oluşturdu. Serum örnekleri, 2 yaşından büyük, paratüberküloz yönünden aşılanmamış hayvanlardan alındı.

Çalışma için sığırlardan IV yolla Vena jugularis'ten alınan kan, antikoagülsüz tüplere alındı ve kan örnekleri 3000 devir/dakika hızla santrifüj edilerek serumları ayrılarak, çalışma yapılincaya kadar -20 °C'de saklandı.

3.1.2 Çalışmada kullanılan malzemeler

- 10 µl, 100 µl ve 200 µl'lik tek veya çok kanallı mikropipetörler
- Tek kullanımlık pipet uçları
- 96 gözlü mikropilaka okuyucu (Biobase EL10A, Elisa Reader)
- Distile su
- Otomatik yıkama sistemi (Biobase Mw9622, mikropileyt yıkayıcı)
- Mikropileyt karıştırıcı (Biosan MR-12)
- Paratüberküloz ELISA mikropileytleri: Kullanıma hazır ve paratüberküloz kaplı 96 kuyucuklu 5 adet pileyt.
- Pozitif Kontrol: 1 adet kullanıma hazır paratüberküloz ile reaksiyona giren pozitif kontrol. 1 x 0.5 ml.
- Negatif Kontrol: 1 adet kullanıma hazır paratüberküloz ile reaksiyona girmeyen negatif sığır serumu 1x 0.5 ml.
- Wash Buffer : 1 x100 ml 1 adet 20 kat konsantre. 1 kısım buffer 19 kısım distile suda çözündürülür.
- Sample Buffer : 1 adet kullanıma hazır 1x100 ml. 20 kat konsantre. 1 kısım buffer 19 kısım distile suda çözündürülür.
- Substrat Solüsyonu: 1 adet kullanıma hazır 1x60 ml.
- Stop Solüsyonu : Kullanıma hazır, 1x60 ml 1 adet.

3.2 Yöntem

3.2.1 ELISA (Enzim Linked Immunosorbent Assay) Testinin Yapılışı:

Serum örneklerinden paratüberküloza spesifik antikorların belirlenmesi için ticari ELISA kiti (IDEXX Paratuberculosis Screening Ab Test, Netherlands) kullanılmıştır (Şekil 1). Örnekler arasındaki inkübasyon sürelerindeki farklılıkları önlemek için, çok kanallı bir pipet kullanarak bir ELISA mikropalakasına aktarmadan önce, test ve kontrol örneklerini içeren 96 kuyucuklu bir mikrotitrasyon pleyti örneklerin pre dilüsyonunda kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Kullanılan *Mycobacterium paratuberculosis* antikor test kiti.

Test prosedürü üreticilerin talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Bu talimatlara göre;

1. Tüm malzemeler test yapılmadan önce oda sıcaklığına (18-26°C) getirilmiştir. Tüm reaktifler ters yüz edilerek homejen hale gelmeleri sağlanmıştır. Pleytlere göre örneklerin yerleri belirlenmiştir.
2. Yıkama solüsyonu (20 x) 1: 20 oranında distile su ile seyreltilerek hazırlanmıştır (Ör: 100 µl. yıkama solüsyonu (20x) + 1900 µl . distile su).
3. Serum örneği Sample diluent (N12) ile 1:20 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır. (Ör: 10 µl. Serum örneği +190 µl. Sample diluent).

4. Konjugat Buffer 1: 100 oranında dilusyon buffer (N1) ile sulandırıldı.
5. Pozitif ve negatif kontrol 1: 20 oranında dilusyon buffer ile (N12) seyreltilmiştir.
6. Serum örnekleri ve kullanıma hazır pozitif ve negatif kontroller mikroplyet kuyucuklarına 100 µl olacak şekilde konulmuştur.
H11 ve H12 gözlerine pozitif kontrolden 100 µl konulmuştur.
H10 gözüne negatif kontrolden 100 µl konulmuştur. ve mikroplyet karıştırıcıda 45 dakika süreyle oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır.
7. İnkübasyondan sonra mikroplyet 4 kez daha önceden hazırlanan 300 µl yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır.
7. Tüm kuyucuklara 100 µl konjugat konulmuştur. Kuyular plastik filme örtülüp 30 dakika boyunca oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır.
8. Süre bitiminde 3 kez 300 µl yıkama sıvısı kullanılarak yıkama işlemi gerçekleştirildi.
9. Bütün kuyucuklara 100 µl TMB substrat (N9) konulmuştur. Sonrasında pleyt plastik filme örtülüp oda ısısında 10 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır.
10. Her kuyucuğa 100 µl kullanıma hazır stop solüsyonu (N3) eklenmiştir.
11. 450 nm'de kuyucukların absorbansı ELISA Reader (Biobase EL10A) ile ölçülmüştür

3.2.2 ELISA ile sonuçların değerlendirilmesi

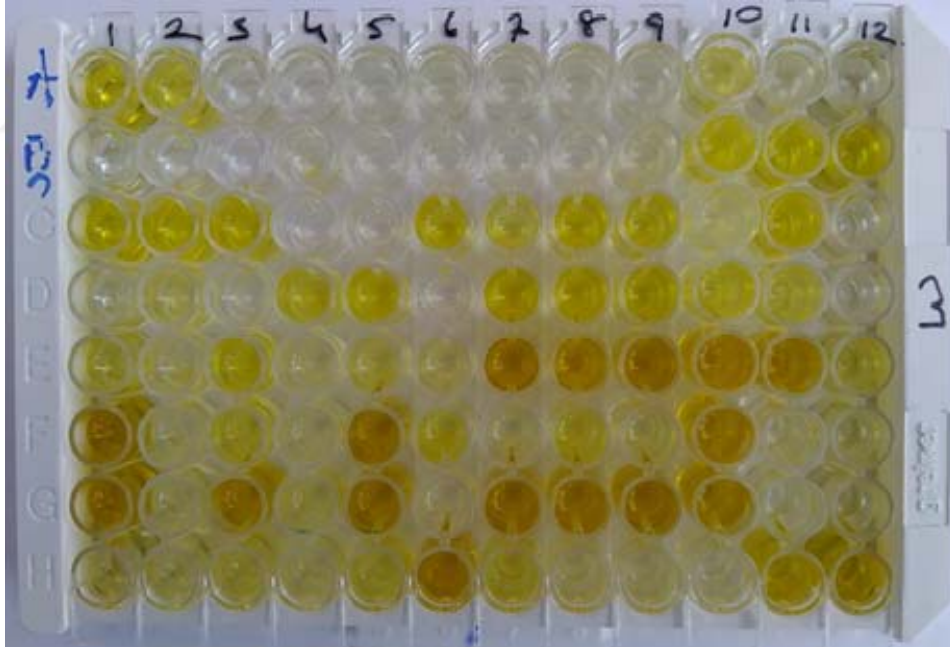
Bu testin geçerli sayılması için, Pozitif (P) kontrol serumlarına ait optik dansite (OD) değerlerinin aritmetik ortalaması hesaplanarak testin geçerliliği değerlendirildi. Bu değer $P_{cx} \geq 0.35$ olması gerekmektedir. Her bir serum örneği için % S/P değeri; $\% S/P = 100 \times (\text{Örnek A}) - (\text{Negatif kontrol A}) / P_{cx} - \text{Negatif kontrol A}$ formülü ile değerlendirildi. $S/P \% \leq 45$ ise örnek negatif, $S/P \% \geq 55$ ise örnek pozitif ve $S/P \% = 45-55$ arasında ise örnek şüpheli olarak kabul edildi.

3.2.3 İstatistiksel analiz

Verilerin istatistiksel analizinde gruplar arasındaki farkın anlamlılık derecesine göre SPSS paket programı ile ki-kare testi kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

Bu testte mikrokuyucuklar paratüberküloz'a spesifik antijen ile kaplanmıştır. Test edilecek örnekler ve kontroller kuyulara eklenir, eğer Anti- paratüberküloz antikorları varsa, bir antijen-antikor kompleksi oluşur. Kuyucuklar yıkandıktan sonra kuyucuklara peroksidaz (HRP) enzimi ile işaretli anti-antikor olarak konjugat eklenir. İnkubasyon esnasında Anti- Mycobacterium paratuberculosis antikorlarına konjugat bağlanarak, bir antijen-antikor-konjugat kompleksi oluşturur. Fazla konjugatın yıkamayla ortadan kaldırılmasından sonra substrat solüsyonu (tmb) eklenir. Ortaya çıkan renk yoğunluğu, test edilecek örnekte bulunan spesifik antikorların miktarına bağlıdır. Antikorların varlığında, durdurma çözeltisinin eklenmesinden sonra mavi olan renk sarıya döner (Şekil 2). Antikor yokluğunda renk değişimi görülmez. Mikroplakalar, ELISA okuyucusu ile 450 nm'de okunarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar kit prospektüsünde bulunan kriterlere göre değerlendirilmiştir. ELISA okuyucusundan okutulan değerler üretici firmanın test protokolünde geçen formüle göre hesaplanmıştır.



Şekil 4.1. ELISA pleytlerinde sığır serumlarının antijen-antikor reaksiyonu sonucunda vermiş oldukları renk reaksiyonu.

Çalışmada sığır kan serumlarının ELISA ile incelenmesi sonucunda 465 sığırın 21 (%4.51)'inde paratüberküloz antikorları saptanmış olup 16 (%3.4)'sıda şüpheli olarak bulunmuştur. Geriye kalan 428 (%92) sığır serumunda ise herhangi bir reaksiyon

gözlenmemiştir. Bu çalışmada kan örneklerinin alındığı yerlere göre pozitiflik oranı, Haliliye bölgesinde %0.4, Eyyübiye Bölgesinde %12.6 olduğu görülürken karaköprü ilçesinde %0 pozitiflik saptanmıştır (Tablo 4.1). Paratüberküloz seroprevalansı ile yer arasındaki ilişkisi istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,000$). Ayrıca, çalışmada toplam 25 farklı işletmeden örnekleme yapılmış olup, sadece pozitif sonuç veren hayvanlar bazında, Şanlıurfa yöresi için sürü prevalansı %16 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.1. Şanlıurfa ilinde paratüberküloz seroprevalansı (sayısal)

İlçe	n (%)	+ (%)	(?) %	(-) %
1. Haliliye	207 (% 44,51)	1 (% 0,48)	1 (%0,48)	205 (% 99,03)
2. Eyyübiye	158 (% 33,97)	20 (% 12,65)	15 (% 9,49)	123 (%77,84)
3. Karaköprü	100 (% 21,52)	-	-	100 (%100)
Toplam	465 (% 100)	21 (% 4,51)	16 (%3,44)	428 (% 92,04)

n; Hayvan sayısı, (+);Pozitif olgu sayısı, (-); negatif olgu sayısı, (?); şüpheli olgu sayısı

Bu çalışmada Holstein ve simental ırkı sığırlardan kan alınmıştır. Holstain ırkında pozitiflik oranı %4.98, simental ırkında ise %3.47 oranında pozitiflik belirlenmiştir (Tablo 4.2). Paratüberküloz seroprevalansı ile ırk arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($P=0.267$).

Tablo 4.2. Şanlıurfa ilinde paratüberkülozun sığırlarda ırka göre dağılımı.

Hayvan Irkı	Pozitif	Negatif	Şüpheli
	n (%)	n (%)	n (%)
1. Holstein (n: 321)	16 (%4,98)	292 (%90,96)	13 (% 4,04)
2. Simental (n: 144)	5 (%3,47)	136 (% 94,44)	3 (%2,08)
Toplam (n: 465)	21 (%4,51)	428 (% 92,04)	16 (% 3,44)

n; Hayvan sayısı

Kan alınan sığırların yaşına göre pozitiflik oranını incelediğimizde 2-3 yaş aralığında 4 (%8.51) pozitif, 3-4 yaş aralığında 5 (%6.66) pozitif ve 4-5 yaş aralığında pozitiflik saptanmazken 5 yaş ve üzerinde 12 (%9.09) pozitiflik saptanmıştır (Tablo 4.3). Paratüberküloz seroprevalansının yaş ile ilişkisi istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır ($P=0.751$).

Tablo 4.3. Şanlıurfa ilinde paratüberkülozun sığırlarda yaşa göre dağılımı.

Hayvan	2-3 yaş			3-4 yaş			4-5 yaş			5 yaş üzeri		
	P (%)	N (%)	Ş (%)	P (%)	N (%)	Ş (%)	P (%)	N (%)	Ş (%)	P(%)	N(%)	Ş(%)
Sığır	4(8,51)	43(%93,61)	0(0)	5(%6,66)	69(%92)	1(%1,33)	0(%)	116(%91,33)	11(%8,66)	12(%9,09)	116(%87,87)	4(%3,03)

n; Hayvan sayısı, P; Pozitif hayvan sayısı, N; Negatif hayvan sayısı, Ş; Şüpheli hayvan sayısı



5. TARTIŞMA

Bu araştırmada Şanlıurfa yöresinde süt sığırlarından alınan serum örneklerinde ELISA ile paratüberküloz etkenine karşı oluşan antikorlar araştırıldı. *Mycobacterium avium subsp* güçlü bir hücre içi patojendir. Paratüberkülozun oluşmasıyla birlikte kandaki antikor seviyesi yükselir. Enfeksiyonun ilerlemesi uzun zaman aldığından dolayı, 2 yaş altındaki sığırlarda etkeni teşhis etmek zordur. Bu nedenle; teşhis için özellikle kan serumunun kullanıldığı prevalans çalışmalarında, 2 yaş altı hayvanlar tercih edilmemektedir. Yapılan çalışmalar sonucu 2 yaş altı sığırlarda ELISA'nın spesifitesi ve sensitivitesinin düşük olduğu saptanmıştır. (Çetinkaya ve ark. 2000; Diequez ve ark. 2009; Nielsen ve Toft, 2009; Öztürk ve ark. 2010).

Başlıca süt ve dışkı ile yayılım gösteren paratüberküloz subklinik evrede sağlıklı olan hayvanlara bulaşmaktadır (Moghadam ve ark. 2010). Enfeksiyon doğumdan hemen sonra olduğu gibi doğum öncesi dönemde de bulaşabilmektedir. Bulaşma en çok meme başından, süttten ve kolostrumdan olmaktadır (Çetinkaya ve ark. 1997; Çetinkaya ve ark. 2000; Yıldırım ve Civelek 2013). Bundan dolayı paratüberkülozun seroprevalansının subklinik evrede ortaya çıkması sürü yönetimi ve sağlığı için önemlidir. (Nielsen ve Troft, 2009; Öztürk ve ark. 2010; Yıldırım ve Civelek 2013).

Orta Anadolu bölgesinde sığırlar için yapılan bir araştırmada paratüberkülozun seroprevalansı mikro CFT ve tüp CFT metodlarıyla değerlendirilmesi yapılmış ve sırasıyla %2.3 ve %2.7 olarak rapor edilmiştir (Vural ve Atala 1988). Türkiye'nin genelinde 2 yaş ve üzeri sığırlardan basit tesadüfi örnekleme ile 8873 kan serumunun ELISA ile incelendiği bir çalışmada 409 örnek pozitif bulunmuş ve Türkiye genelinde gerçek bireysel prevalans %3.7 olarak tespit edilmiştir (Atala ve Akçay 2001). Uşak ilinde 3-7 yaşlı 200 Holştayn süt sığırının incelendiği bir çalışmada, dışkıda subklinik paratüberkülozun prevalansı; ZN boyama ile %17, PCR ile %9.5, Nested PCR ile %20 olarak rapor edilmiştir. Süt örneklerinde ise prevalans; ZN boyama ile %15.5, Outher PCR ile %5.5, Nested PCR ile %17.5 olarak tespit edilmiştir (Yıldırım ve Civelek, 2013). Elazığ yöresinde yapılan çalışmada seroprevalans süt örneklerinde PCR ile %5 olarak kayda geçilmiştir. Kültür yöntemiyle ise prevalansı %3.4 olarak rapor edilmiştir (Çetinkaya ve ark. 2000). Kars ilinde yapılan çalışmada paratüberküloz seroprevalans %3.5 olarak tespit edilmiştir (Makav ve Gökçe, 2013). Kırklareli ilinde 23 farklı çiftlikten rastgele olarak seçilmiş 400 süt sığırından serum örnekleri toplanmış ve ELISA yöntemi ile subklinik paratüberküloz'un seroprevalansı %1.5 tespit edilmiş

olup, 6 hayvan şüpheli (%1.5) ve 388 hayvan ise negatif (%97) olarak rapor edilmiştir. ELISA ile pTB seroprevalansı Burdur yöresinde %6.2 olarak tespit edilmiştir (Öztürk ve ark. 2010). Ardahan yöresindeki süt sığırlarında Ardahan merkez ve ilçelerinden rastgele seçilen 11 odak ve bu odaklardaki 22 işletmeden alınan toplam 400 hayvandan paratüberküloz'un prevalansının belirlenmesi amacıyla ELISA yapılmış ve sonuçta 17 (%4.25)'sinde paratüberküloz pozitif bulunmuştur.

Trakya bölgesinde paratüberkülozun prevalansı ile ilgili iki çalışma yapılmıştır. İkiz ve ark. (2005) iki yaş üstü sığırlarda rastgele örnekleme yöntemiyle seçilen 96 dışkı numunesini PCR yöntemiyle taramış ve Trakya bölgesinde bu hastalık etkenine rastlanmadığını rapor etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda alınan dışkı numunelerinin Trakya bölgesindeki ayrı çiftliklerden alındığı rapor edilmiş olup, kesin olarak coğrafi yer bildirim (il, ilçe vb.) belirtilmemiştir. Özpınar ve ark. (2015) ise çalışmalarını Edirne ili Keşan ilçesindeki köylerde yapmışlardır. Araştırmada 30 süt çiftliğinden 2 yaş ve üzeri sığırlarda 270 dışkı numunesini ve köylerde bulunan süt tanklarından 45 süt örneği toplamışlardır. Yapılan çalışma neticesinde alınan örneklerden paratüberküloz DNA'sına rastlanmadığı belirtilmiştir.

Paratüberkülozis yönünden farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar bulunmuştur. McKenna ve ark. (2004) Mezbahaya sevk edilen süt sığırlarında %16.1, Singh et al. (2008) Hindistan, Pencap'ta %2.71, İspanya'daki süt sürülerinde %4.03 (Diéguez ve diğerleri, 2007), Kıbrıs'ta süt sığırlarında %28.6 (Slana ve ark. 2009), Slovenya'da, %2.77 (Ocepek ve diğerleri, 2002), Belçika'da süt sığırlarında %18 (Boelaert ve diğerleri, 2000), İran'ın Urmiye eyaletinde %3.7 (Yousof ve diğerleri, 2003) ve Amerika Birleşik Devletleri'nde (Fernández-Silva ve diğerleri, 2014) %1.6 ila %55 oranında pozitiflik belirlenmiştir. Pakistan'da Ahmed ve ark (2020) yaptıkları çalışmada, sığır ve mandalarda sırasıyla %31.8 ve %37.8 paratüberküloz prevalansı tespit etmişlerdir. Sharma ve ark. (2019) Nepal'de Ekim - Aralık 2016 yılında yaptıkları çalışmada 184 kan örneğini ELISA ile incelemişler ve %4.89 oranında pozitiflik saptamışlardır. Paratüberküloz ile yaş, ırk, parite, vücut kondisyon skoru ve lokasyon arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığını ancak daha yaşlı ve düşük vücut kondisyon skoru olan sığırlarda daha yüksek prevalans saptamışlardır.

Bu çalışmada Şanlıurfa bölgesinde toplamda 465 serumun ELISA ile incelenmesiyle %4.51 oranında paratüberküloz seroprevalans saptanmıştır. Bu çalışmada tespit edilen pozitiflik oranı bazı çalışma (Sharma ve ark. 2019: Atala ve

Akçay 2001: Çetinkaya ve ark. 2000: Makav ve Gökçe 2013: Singh et al. 2008; Diéguez ve diğerleri 2007: Oceppek ve diğerleri, 2002: Yousof ve diğerleri, 2003) bulgularına benzer görülürken diğer çalışmalardan (Ahmed ve ark. 2020; Slana ve ark. 2009; Mc Kenna ve ark. 2004; Boelaert ve diğerleri, 2000) farklı bulunmuştur. Paratüberküloz infeksiyonu üzerine birçok faktörün etkili olabileceği paratüberküloz prevalansındaki farklılıkların, iklim, beslenme, barınma koşulları, çiftliklerin konumuna, numune alma prosedürleri gibi faktörlerden etkilenebileceğini bildirilmiştir. (Çetinkaya ve ark. 1997; Mc Kenna ve ark. (2004).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda çiftlik prevalansına yeteri kadar önem verilmediği görülmektedir. Bir işletmede tek bir hayvanda bile etkenin tespit edilmiş olması hastalığın bulaş riski açısından oldukça önemlidir. Bu çerçevede Öztürk ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada Burdur yöresinde hastalığın sürü prevalansını %58 olarak, Makav ve Gökçe (2013) Kars yöresinde %41.6 olarak bildirmişlerdir. Ozsvari ve ark. (2020) Macaristan'da yaptıkları çalışmada gerçek çiftlik prevalansının %89 olduğunu belirtmişlerdir. Avrupa'da yapılan çalışmalarda gerçek çiftlik prevalansının İrlanda'da% 23-34 (Mc Aloon et al. 2016), İtalya'da %70 civarında (Pozzato et al. 2011) ve Danimarkada %75-92 (Verdugo et al. 2015) olduğu bildirilmiştir. Vilar ve ark (2015), Kuzeydoğu Brezilya'da yaptığı çalışmada %6.7 - %100 (ortalama %20) oranında sürü prevalansı saptamıştır.

Bu çalışmada ELISA ile yapılan seroprevalans sonucu Şanlıurfa ilinde %4.51 oranında pozitiflik saptanmasına karşın, toplam 25 farklı işletmeden örnekleme yapılmış olup, sadece pozitif sonuç veren hayvanlar bazında, Şanlıurfa yöresi için sürü prevalansı %16 olarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda Paratüberkülozun prevalansının artması çiftlikteki hayvan sayısı ile doğru orantılı olduğu bildirilmiştir (Nielsen, 2008; Öztürk ve ark. 2010; Pozzato ve ark. 2011). Bu çalışmadaki çiftlik prevalansı Vilar ve ark. (2015)'nin oranına benzerken diğer çalışmalardan düşük bulunmuştur. Çalışmada düşük oranların, örnek alınan işletmelerin küçük olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Vazquez et al. (2013) İspanya'da yaptıkları çalışma 7-8 yaş aralığında düşük prevalans, 3-4 yaşındakilerde %16.5 gibi yüksek bir prevalans buldukları çalışmada hastalığın yaşa bağımlı olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda paratüberküloz belirlenen 12 pozitif ve 4 şüpheli vakanın 5 yaşından büyük olduğu belirlenmekle birlikte paratüberküloz

seroprevalansının yaş ile ilişkisi istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır ($P=0.751$). Bizim çalışmamıza benzer olarak yapılan çalışmalarda (sharma ve ark. 2019, Stabel, 2006) Paratüberküloz açısından farklı yaş gruplarında anlamlı bir fark kaydedilmediği bildirilmiştir.

Bu çalışmada 16 (%4.98) holştayn, 5 (%3.47) simental inek pozitif bulunmasına rağmen, paratüberküloz seroprevalansı ile ırk arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($P=0.267$). Burdur yöresinde paratüberküloz'un prevalansı Holştayn ırkı sığırlarda %6.2 olarak belirlenmiştir (Öztürk ve ark. 2010). Kars yöresinde yapılan bir çalışmada %35.7'si simental ve melezi, %50'si montofon ve melezi ve %14.3'ü yerli ırk ve melezi paratüberküloz yönünden pozitif olduğu bildirilmiştir (Makav ve ark. 2013). Çetinkaya ve ark. (1997), Jersey ve Guernsey ırklarında paratüberküloz hastalığı'nın Friesian veya diğer türlere göre daha yaygın olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda ırklar arasındaki farkın istatistiki olarak anlamlı bulunmamasına rağmen diğer çalışmalarda görülen farkın Türlerle göre sonuçların değişkenlik göstermesi türe özgü duyarlık ve kros reaksiyonla ilişkilendirilmekle birlikte nedeni tam olarak bilinmediği bildirilmiştir (Osterstock ve ark. 2010; Roussel ve ark. 2005).

Manisa ilinde toplanan serum örneklerinden paratüberküloz seroprevalansının ELISA yöntemi ile belirlendiği bir çalışmada, Manisa Merkezde %13, Turgutlu'da %28, Alaşehir'de %20, Kula'da %38, Akhisar'da %26 ve Salihli'de %22 oranında hastalık bildirilmiştir (Berberoğlu ve Civelek, 2016). Mısırdaki Selim ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada bölgeler arasındaki farkın istatistiki olarak anlamlı olduğunu bulmuşlardır. Bölgesel farklılığın paratüberküloz hastalığının aralıklı saçılımı, sağlıklı ve hasta hayvanların aynı bölgede serbest hareketinden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada Haliliye ilçesinde 1 (%0.48) Eyyübiye ilçesinde 20 (%12.65) pozitiflik saptanırken Karaköprü ilçesinde pozitiflik saptanamamıştır. Paratüberküloz seroprevalansı ile yer arasındaki ilişkisi istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,000$). Çalışmamızda ilçeler arasındaki farkın nedeninin ilçeler içinde pozitif hayvanların serbest hareketi ve hijyen eksikliklerinden dolayı bulaşma olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile Şanlıurfa ilinde Sığırlarda paratüberküloz seroprevalansı araştırılmıştır. Çalışmada ELISA ile 465 sığırdan alınan serum örneklerinin 21'inde (%4.51) paratüberküloz yönünden bireysel seropozitiflik saptanmıştır. Sürü prevelansı ise % 16 olarak bulunmuştur.

Şanlıurfa ilinde %4.51 oranında seroprevalans saptanması Türkiye'nin farklı bölgelerinde olduğu gibi Şanlıurfa yöresinde de hastalığın bulunduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca hastalığın zoonotik olduğu düşünüldüğünde halk sağlığının da etkilenebileceği söylenebilmektedir.

Çalışma sonuçları, subklinik paratüberkülozun ülke ekonomisi ve insan sağlığına neden olduğu zararların ortaya konmasına yönelik yerel düzeyde bir çalışma olup, ülke genelinde bu tarz araştırma yapılmasının hastalığa karşı etkili koruma ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Sonuç olarak hastalıktan korunmak amacıyla gerek Şanlıurfa ilinde gerekse ulusal düzeyde Paratüberküloz ile ilgili daha fazla çalışma gerçekleştirilmesinin hayvancılık ekonomisine fayda sağlayacağı ve infeksiyonun sürü ve fert prevelansının daha rasyonel olarak değerlendirilmesine olanak tanıyacağı kanısına varıldı.

7. KAYNAKLAR

1. Alaçam E, Şahal M, Görgül S, İmren H. Y, Tuncer Ş. D. Sığır Hastalıkları 1997; 66-68.
2. Sezginer Rİ. Sığırların paratüberkülozu. Ehli hayvanlarda intani hastalıklar. II, 1928; 252-259.
3. Hakioglu F. Bir koyunda tespit edilen paratüberküloz vakası (ilk tebliğ). Pendik Vet Kontrol ve Araşt Enst Derg. 1968; 1(2):144-145.
4. Alibaşoglu M, Ertürk E, Yücel N. Türkiyede rastlanan ilk keçi paratüberküloz olayları üzerinde patolojik incelemeler. Ankara Univ.Vet Fak. 197 3;20:43-63.
5. Pickup, RW, Rhodes G, Arnott S. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in the cat chmentaera and water of theriver Taff in 11. South Wales, United Kingdom, and i spot entia relation ship to clustering of Crohn's disease in thecity of Cardiff. Appl Environ Microbiol. 2004; 71:2130-9.
6. Nakase, H, Nishio A, Tamakı H. Specific anti bodies against recombinant protein of insertion element 900 of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Japan esepatients with Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2006; 12:62-9.
7. Alibaşoglu M, Demirer F, Yücel N. Paratüberkülozda Alerjik Reaksiyonların Patolojik Bulgularla Uygunluk Derecesi Üzerine Araştırma. A.Ü. Vet. Fak. Derg, 1969; 16:236-256.
8. Çetinkaya B, Erdoğan HM, Morgan KL. Risk factors for Bovine Paratuberculosis. II. The multiple analysis of risk ractors for Bovine Paratuberculosis. Turk J Vet Anim Sci, 1997; 21:303-306.
9. Osterstock JB, Sinha S, Seabury CM, Cohen ND. Effect of classifying disease states in genetic association studies for paratuberculosis. PrevVet Med. 2010; 95:41-49.
10. Andrews AH. Bovine Medicine: Black well Scientific Publication London, 1992.
11. Nacy N. ve Buckley M. Mycobacterium Avium Paratuberculosis: Infrequent Human Pathogen or Public Health Threat? This report is based on a colloquium, sponsored by the American Academy of Microbiology, convened Salem, Massachusetts. 2007 june; 15-17 in

12. Scanu AM, Bull TJ, Cannas S, Jeremy D, Sanderson, Leonardo A, SechiDettori G, Zanetta S, Taylor H. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in cases of irritable bowel syndrome and comparison with Crohn's disease and Johne's disease: common neural and immune pathogenicities. J Clin Microbiol. 2007; 45(12):3883-90.
13. Dalziel TK. Chronic interstitial enteritis. BMJ 1913; 25:1068-1070.
14. Güner A. Crohn hastalığının etiolojisinde Mycobacterium Paratuberculosis (Mycobacterium Avium Sbsp. Paratuberculosis)'in rolü ve besinlerle bulaşma riski. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. 2004; 13(1):48-54.
15. Harris NB, Barletta RG. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in veterinary medicine. Clin Microbiol Rev. 2001; 14(3):489-512.
16. Gilardoni LR, Paolicchi FA, Mundo SL. Bovine paratuberculosis: a review of the advantage sanddis advantages of different diagnostic tests. Rev Argent Microbiol. 2012; 44:201-215.
17. OIE. Paratuberculosis (Johne's Disease) Chapter 2.1.11. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2013; 276-291.
18. Whittington RJ, Marsh I, Turner MJ, McAllister S, Choy E, Eamens GJ, Marshall DJ, Ottaway S. Rapid detection of Mycobacterium paratuberculosis in clinical samples from ruminant and spiked environmental samples by modified BACTEC 12B radio metric culture and direct confirmation by IS900 PCR. J Clin Microbiol. 1998; 36:701-707.
19. Akay Ö. Aside-dirençli bakteriler. Editörler: Arda M, Minbay A, Aydın N, Akay Ö, Özgür M, Leloğlu N, Kahrama M, İlğaz A, Diker S. Özel Mikrobiyoloji, 4. baskı, Medisan Yayın Serisi No:26, Ulus, Ankara; 1997; 26:179-202.
20. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Veterinary Microbiology and Microbial Disease, Black well Publishing, Oxford, UK. 2005; 97-105.
21. Yardımcı H. Mycobacterium infeksiyonları. Editörler: Aydın N, Paracıklıoğlu J. Veteriner Mikrobiyoloji, İlke-Emek Yayınları, Ankara. 2006; 87-107.
22. Whittington RJ, Marshall DJ, Nicholls PJ, Marsh IB, Reddacliff LA. Survival and dormancy of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in the environment. Appl Environ Microb. 2004; 70(5):2989-3004.

23. Collins MT, Socket DC, Goodger WJ, Conrad TA, Thomas CB, Carr DJ. Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for bovine paratuberculosis in Wisconsin. *J Am Vet Med Assoc*; 1994; 204:636-41.
24. Jakobsen MB, Alban L, Nielsen SS. A cross-sectional study of paratuberculosis in 1155 Danish dairy cows. *Prev Vet Med*. 2000; 46:15-27.
25. Van Leeuwen JA, Keefe GP, Tremblay R. Seroprevalence of infection with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, bovine leukemia virus and bovine viral diarrhoea virus in Maritime Canada dairy cattle. *Can Vet J*, 2001; 42:193-8.
26. Hacker U, Huttner K, Konoe M. Untersuchungen zur serologischen Prävalenz und zu Risikofaktoren der Paratuberkulose in Milchviehbetrieben in Mecklenburg-Vorpommern. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*. 2004; 117:140-4.
27. Holmstrom A, Stanlund S. Control of paratuberculosis in livecattle and semen imported to Sweden 1995-2004. In: 8th International Colloquium on paratuberculosis. Copenhagen, Denmark, 2005.
28. Patterson DSP, Allen WM. Chronic mycobacterial enteritis in ruminants as a model of Crohn's disease. *Proc Roy Soc Med*. 1972; 65(11):998–1001.
29. Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Thayer WR, Merkal RS, Coutu JA. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *Digest Dis Sci*. 1984; 29(12):1073–1079.
30. Windsor PA, Whittington RJ. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet J*. 2010; 184:37-44.
31. Doré E, Paré J, Côté G, Buczinski S, Labrecque O, Roy JP, Fecteau G. Risk factors associated with transmission of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis to calves with in dairy herd: A systematic review. *J Vet Intern Med*. 2012; 26:32–45.
32. Duman G.K. AB Üyeliği Yolunda Türkiye'de Hayvan Sağlığı, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. http://abdgm.tarim.gov.tr/ABU_files/Tezler/tezgulcin.pdf. 2005.
33. Atala N, Akçay E. Türkiye genelinde sığır paratüberkülozu prevalansının ELISA ile araştırılması. *Etlik Vet Mik Derg*. 2001; 12:39-48.
34. Nielsen SS, Toft N. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev Vet Med*. 2009; 88:1-14.

35. Vural B, Atala N.İç Anadolu bölgesinde sığırlardaki paratüberkülozisin mikro-komplement fikzasyon ve tüp komplement fikzasyon testi ile serolojik olarak tetkiki. *Etlık Vet Mikrobiyol Derg.* 1988; 6:87-97.
- 36.Çetinkaya B, Muz A, Ertaş B, Öngör H, Sezen Y, Gülcü B. Süt ineklerinde paratüberküloz prevalansının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanması. *Türk J Vet Anim Sci.* 2000; 24:371-379.
37. İkiz S, Bağcigil AF, Ak S, Özgür NY, Loaz A : Paratuberculosis in cattle in Turkey detected by PCR. *Medycyna Wet.* 2005; 61:881-883.
38. Öztürk D, Pehlivanoglu F, Tok AA, Gunlu S, Guldali Y, Turutoglu H. Sero prevalence of paratuberculosis in the Burdur province (Turkey), in dairy cattle using the enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA). *Israel J Vet Med.* 2010; 65:53-57.
39. Makav M, Gökçe E. Kars yöresi sığırlarında subklinik paratüberkülozun seroprevalansı. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2013; 19:913-916.
40. Borum AE, Çatık S, Mecitoğlu Z, Demir G, Ülgen M, Şentürk S. ELISA ve fekal bakteriyoskopi ile sığırlarda paratüberküloz prevalansının belirlenmesi. *Etlık Vet Mikrobiyol Derg.* 2014; 25:1-5.
41. Büyük F, Celebi O, Akca D, Otlı S, Tazegül E, Gülmez A, Şahin M. Estimated apparent and true prevalences of paratuberculosis in sheep herds of the Kars Region in Northeastern Turkey. *Vet Med-Czech.* 2014; 59:331–335.
42. Özpınar H, Tekiner ĞH, Karaman O, Kurt Y. Investigation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) in fecal and bulk milk samples from dairy farms in Trace Region of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2015; 21:247-252.
43. Mc Kenna SLB, Keefe GP, Barkema HW, Mc Clure J, Van Leeuwen JA, Hanna P, Sockett DC. Cow-level prevalence of paratuberculosis in culled dairy cows in Atlantic Canada and Maine. *J. Dairy Sci.* 2004; 87:3770-3777.
44. Hasonova L, Treka I, Babak V, Rozsypalova Z, Pribylova R, Pavlik I. Distribution of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in tissues of naturally infected cattle as affected by age. *Vet Med-Czech.* 2009; 54:257-269.
45. Muskens J, Barkema HW, Russchen E, van Maanen K, Schukken YH, Bakker D. Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in the Netherlands. *Vet Microbiol.* 2000; 77:253-261.

46. Boelaert F, Walravens K, Biront P, Vermeersch JP, Berkvens D, Godfroid J. Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Vet Microbiol.* 2000; 77:269-281.
47. Good M, Clegg T, Sheridan H, Yearsely D, O'Brien T, Egan J, Mullooney P. Prevalence and distribution of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle herds in Ireland. *Irish Vet J.* 2009; 62:597-606.
48. Denzin N, Gehrman B, Ewert B, Rohde H. Estimation of the prevalence at animal level of paratuberculosis in female cattle of Saxony-Anhalt (Germany). *Veterinary Sci Dev.* 2011; 1(10):42-46.
49. 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 Vet J.* 2012; 2:196-200.
50. Hailat NQ, Hananeh W, Metekia AS, Stabel JR, Al-Majali A, Lafi S. Pathology of subclinical paratuberculosis (Johne's Disease) in Awassi sheep with reference to its occurrence in Jordan. *Vet Med-Czech.* 2010; 55:590-602.
51. Sikandar A, Cheema AH, Adil M, Younus M, Zaneb H, Zaman MA, Tipu MY, Masood S. Ovine paratuberculosis-a histopathological study from Pakistan. *J Anim Plant Sci.* 2013; 23:749-753.
52. Khamesipour F, Doosti A, Sebdani MM. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis varlığının dondurulmuş boğa semen örneklerinde ve sığır, koyun ve deve kan örneklerinde nested-PCR ile taranması. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 2014; 20:681-686.
53. Klee W. Paratuberkulose (Johnesche Krankheit). In: Dirksen HD, Stöber M, eds *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. Blackwell, Berlin. 2004; 4:586-91.
54. Whitlock RH, Sweeney RW, Fyock TL. MAP Super shedders: another factor in the control of Johne's disease. In: 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark. 2005; 42.
55. Bolton MW, Grooms DL, Kaneene JB. Faecal shedding of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis in calves: implication for disease control and management. In: 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark. 2005; 128.
56. Baumgartner W, Khol JL. Paratuberculosis (Johne disease) in Ruminant songong story. *Slowvetres.* 2006; 43: 5-10.

57. Smith S, Bradford P. Johnes Disease In: Large Animal Internal Medicine. 2001; 3:779-782.
58. Mecitoğlu Z, Demir G. Sığırlarda paratüberkülozun tanısına ilişkin problemler. J Fac. Vet. Med. 2012; 1:19-23.
59. Stricklands J, Scott HM, Mc Jordan ER. Effects of seasonal climatic conditions on the diagnosis of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in dairy cattle. J Dairy Sci. 2005; 88:2432-40.
60. Blood DC, Radostits OM, Gay CC. Johnes Disease (Paratuberculosis) In: Veterinary Medicine. 2000; 9:920-933.
61. Sharma G, Singh SV, Sevilla I, Singh AV, Whittington RJ, Juste RA, Kumar S, Gupta VK, Singh PK, Sohal JS, Vihan VS. Evaluation of 31 İndigenous milk ELISA with m-culture and m-PCR for the diagnosis of bovine Johnes's Disease (BJD) in lactating Indian dairy cattle. Res. Vet. Sci. 2008; 84:30-37.
62. Behr MA. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. Mc Gill University, Montreal, Canada and D M Collins, Ag Research, New Zealand ISBN:978 1 84593 2010; 613-6 .
63. Köhler H, Geue L, Conraths F.J. Zur Paratuberkulose-Situation in Deutschland. Amtstierärztl. Dienst Lebensmittel kontr. 2003; 1:40-44.
64. Benedictus G, Dijkhuizen AA, Stelwagen J. Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. Vet. Rec. 1987; 15:142-146.
65. Otto SL, Wells S.J. ve Wagner B. A. Herd-level economic losses associated with Johnes's disease on US dairy operations. Prev. Vet. Med. 1999; 40:179-192.
66. Stabel J. R. Johnes's disease: a hidden threat. J. Dairy Sci. 1998; 81:283-288.
67. Ayele WY, Machackova M, Pavlik I The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. Vet Med-Czech. 2001; 46:205-224.
68. Diéguez FJ, Arnaiz I, Sanjuan MJ, Vilar MJ, Lopez M, Yus E. Prevalence of serum antibodies to Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis in cattle in Galicia (North West Spain). Prev Vet Med. 2007; 82:321-326.
69. Crossley BM, Zagmutt-Vergara FJ, Fyock TL, Whitlock RH, Gardner IA. Fecal shedding of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis by dairy cows. Vet Microbiol. 2005; 107:257-263.

70. Nielsen SS, Toft N. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon-g assay and faecal culture techniques. *Vet Microbiol.* 2008; 129:217-235.
71. Muskends J, Mars MH, Elbers AR, Van Maanen K, Bakker AD. The results of using faecal culture as confirmation test of paratuberculosis-seropositive dairy cattle. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2003; 50:231-41.
72. Botcher J, Gangl A. *Mycobacterium avium* ssp. Paratuberculosis combined serological testing and classification of individual animals and herds. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2004; 51:443-8.
73. Collins MT, Wells SJ, Petrini KR. Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005; 12:685-92.
74. Nielsen SS, Nielsen KK, Huda A. Diagnostic techniques for paratuberculosis. *Bull Int Dairy Fed.* 2001; 362:5-15.
75. Yıldırım D, Civelek T. Prevalence of subclinical paratuberculosis in dairy cattle in Uşak Region. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2013; 19(1):121-126.
76. Whitlock HR, Wells SJ, Sweeney RW, Van Tiem J. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet Microbiol.* 2000; 77:387-398.
77. De Juan L, Alvarez J, Romero B, Bezos J, Castellanos E, Aranaz A, Mateos A, Dominguez L. Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis strains isolated from cattle and goats. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72:5927-5932.
78. Reddacliff LA, Vadali A, Whittington RJ. The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis isolated from tissues and faeces. *Vet Microbiol.* 2003; 24:71-282.
79. Juste RA, Garrido JM, Geijo M, Elguezabal N, Aduriz G, Atxaerandio RI. Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immuno sorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in cattle and sheep. *J Vet Diagn Invest.* 2005; 17:354-9.
80. Buergelt CD, Williams JE. Nested PCR on blood and milk for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis DNA in clinical and subclinical bovine paratuberculosis. *Aust Vet J.* 2004; 82:497-503.

81. Sevilla I, Aduriz G, Garrido JM, Geijo MV, Juste RA . A preliminary survey on the prevalence of paratuberculosis in dairy cattle in Spain by bulk milk PCR. Proceedings of the Seventh International Colloquium on Paratuberculosis, Bilbao, Spain. 2002; 332-336.
82. Sukumar B, Gunaseelan L, Porteen K, Prabu K. Goat milk as a non-invasive sample for confirmation of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis by IS900 PCR. *J Adv Vet Anim Res.* 2014; 1:136-139.
83. Moravkova M, Hlozek P, Beran V, Pavlik I, Preziuso S, Cuteri V. Strategy for the detection and differentiation of *Mycobacterium avium* species in isolates and heavily infected tissues. *Res Vet Sci.* 2008; 85:257-264.
84. Ireng LM, Walravens K, Govaerts M, Godfroid J, Rosseels V, Huygen K, Gala JL. Development and validation of a triplex real-time PCR for rapid detection and specific identification of *M. avium* subsp. paratuberculosis in faecal samples. *Vet Microbiol.* 2009; 136:166-172.
85. Coelho AC, Pinto ML, Silva S, Coelho AM, Rodrigues J, Juste RA . Seroprevalence of ovine paratuberculosis infection in the Northeast of Portugal. *Small Rum Res.* 2007; 71:298-303.
86. Woodbine KA, Schukken YH, Green LE, Ramirez-Villaescusa A, Mason S, Moore SJ, Bilbao C, Swann N, Medley GF. Seroprevalence and epidemiological characteristics of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis on 114 cattle farms in south west England. *Prev Vet Med.* 2009; 89:102-109.
87. Nielsen SS. : Transtions in diagnostic tests used for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infections in cattle. *Vet Microbiol.* 2008; 132:274-282.
88. Diéguez FJ, Gonzales AM, Menendez S, Vilar MJ, Sanjuan ML, Yus E, Arnaiz I. Evaluation of four commercial serum ELISAs for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in dairy cows. *Vet J.* 2009; 180:231-235.
89. Khol JL, Geisbauer E, Wassertheurer M, Revilla-Fernandez S, Damoser J, Österreicher E, Dünser M, Kleb U, Baumgartner W. Outcome of three commercial serum ELISA and faecal detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in consecutive samples from a cattle herd withlow prevalence of paratuberculosis (Johne's disease). *Transbound Emerg Dis.* 2012; 59:197-207.
90. Khol JL, Damoser J, Baumgartner W. Hygienemaßnahmen zur Bekämpfung der Ausbreitung von Paratuberkulose in Rinderbetrieben. *Klauentierpraxis.* 2005; 13:137-8.

91. Jubb TF, Sergeant ES, Callinan AP, Galvin J. Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect John's disease in Victorian dairy cattle herds. *Aust Vet j.* 2004; 82:569-73.
92. Gezon HM, Bither HD, Gibbs HC, Acker EJ, Hanson LA, Thompson JK, Jorgenson RD. Identification and control of paratuberculosis in a large goat herd. *Am J Vet Res.* 1988; 49(11):1817–1823.
93. Zahinuddin M, Sinha RP. Effects of antituberculosis agents on *Mycobacterium johni* in infected goats. *Indian Vet J.* 1984; 61:574–577.
94. Moghadam, M.T., Sarv, S., Moosakhani F., Badiie, A. Detection of *Mycobacterium avium* Subspecies paratuberculosis in Milk and faecal Samples in Dairy Cattle by PCR and Nested-PCR. *Journal of Animal Veterinary Advances.* 2010; 9(24):3055-3061.
95. Pozzato N, Capello K, Comin A, Toft N, Nielsen S.S, Vicenzoni G, Arrigoni, N. Prevalence of paratuberculosis infection in dairy cattle in Northern Italy. *Prev Vet Med.* 2011; 102:83-86.
96. Berberoğlu M. Civelek, T. Seroprevalence of Subclinical Paratuberculosis in Dairy Cattle in Manisa Region of Turkey. *Kocatepe Vet J.* 2016; 9(3):194-196.
97. Sharma, M. L. Prajapati, M. & Panth, Y. Demonstration of Circulating Antibodies of *Mycobacterium avium* Subspecies paratuberculosis in Cattle of Rupandehi District, Nepal. *Nepalese Veterinary Journal.* 2019; 36:23-29.
98. Muskens J. Elbers, A. Van Weering, H. And Noordhuizen, J. Herd management practices associated with paratuberculosis seroprevalence in Dutch dairy herds. *Zoonos. Publ. Hlth.* 2003; 50:372-377.
99. Vazquez, P. Garrido, J.M. and Juste, R.A. Specific antibody and interferon-gamma responses associated with immunopathological forms of bovine paratuberculosis in slaughtered Friesian cattle. *Plos. One.* 2013; 8:64568.
100. Stabel, J. Host response to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: a complex arsenal. *Anim. Hlth. Res. Rev.* 2006; 7:61-70.
101. Singh, S. Singh, A. Singh, R. Sharma, S. Shukla, N. Misra, S. Singh, P. Sohal, J. Kumar, H. And Patil, P. Sero-prevalence of bovine John's disease in buffalo and cattle population of North India using indigenous ELISA kit based on native *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis 'Bison type' genotype of goat origin. *Comp. Immunol Microbiol Infect Dis.* 2008; 31:419-433.

102. Slana, I. Liapi, M. Moravkova, M. Kralova, A. And Pavlik, I. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in cowbulk tank milk in Cyprus detected by cultur and quantitative IS900 andF57 real-time PCR. *Prev. Vet. Med.* 2009; 89:223-226.
103. Ocepek, M. Krt, B. Pate, M. andPogacnik, M. Seroprevalence of paratuberculosis in Sloveniabetween 1999 and 2001. *Slovenia Vet. Res.* 2002; 39:179-185.
104. Yousof, B.G. Farajivand, A. and Ramin, A. Study on theprevalence of subclinica cattle Johnhe’s Disease in the Urmiaabattoir. *Iran. J. Vet. Res.* 2003; 7:123-131.
105. Fernández-Silva, J.A. Correa-Valencia, N.M. and Ramírez, N.F., 2014. Systematic review of the prevalence of paratuberculosis in cattle, sheep, and goats in Latin America and the Caribbean,trop.Anim. Hlth. Prod. 2014; 46:1321-1340.
106. Roussel AJ, Libal MC, Whitlock RL, Hairgrove TB, Barling KS, Thompson JA: Prevalence of and risk factors for paratuberculosis in purebredbeef cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 2005; 226:773-778.
107. Selim A. Ali, A. F. &Ramadan, E. Prevalence and molecular epidemiology of Johnhe’s disease in Egypti an cattle. *Actatropica.* 2019; 195:1-5.
108. Ozsvari, L. Lang, Z. Monostori, A. Kostoulas, P. &Fodor, I. Bayesianestimation of the true prevalence of paratuberculosis in Hungari and airy cattleherds. *Preventive Veterinary Medicine.* 2020; 183:105-124.
109. Mc Aloon, C. G. Doherty, M.L. Whyte, P. O’Grady, L. More, S.J. Messam, L.L.M. Good, M. MULLOWNEY, P. Strain, S. Green, M.J. 2016a. Bayesianestimation of prevalence of paratuberculosis in dairy herdsenrolled in a voluntary Johnhe’s Disease Control Programme in Ireland. *Prev. Vet. Med.* 2020; 128:95–100.
110. Verdugo, C. Toft, N. Nielsen, S.S. Within- and between-herd prevalence variation of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis infection among control programme herds in denmark. *Prev. Vet. Med.* 2015; 121:282–287.
111. Vilar, A. L. Santos, C. S. Pimenta, C. L. Freitas, T. D. Brasil, A. W. Clementino, I. J. &Azevedo, S. S. Herd-level prevalence and associated risk factors for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in cattle in the State of Paraíba, North eastern Brazil. *Preventive veterinary medicine.* 2015; 121(1-2):49-55.
112. Karatay, M. Akyüz, E. & Gökçe, G. Ardahan Yöresindeki Sığırlarda Paratüberküloz’un Seroprevalansı. *Kocatepe Veterinary Journal.* 2020; 13(4):327-331.