



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* ENFEKSİYONU
TEŞHİS EDİLEN KOYUNLARIN GAMA-İTERFERON,
İTERLÖYKİN-10 VE NEOPTERİN DÜZEYLERİ**

Araş. Gör. Ezgi ŞABABOĞLU

DOKTORA TEZİ

VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman
Prof. Dr. Hülya TÜRÜTOĞLU**

BURDUR-2019

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* ENFEKSİYONU
TEŞHİS EDİLEN KOYUNLARIN GAMA-İTERFERON,
İTERLÖYKİN-10 VE NEOPTERİN DÜZEYLERİ

Araş. Gör. Ezgi ŞABABOĞLU

DOKTORA TEZİ

VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Hülya TÜRÜTOĞLU

Bu araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0412-DR-17 proje numarası ile desteklenmiştir.

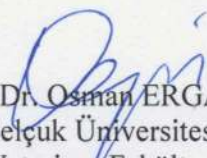
BURDUR-2019

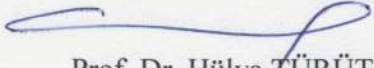
KABUL VE ONAY SAYFASI

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

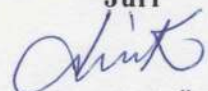
Ezgi ŞABABOĞLU tarafından *Prof. Dr. Hülya TÜRÜTOĞLU* yönetiminde hazırlanan "*Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis Enfeksiyonu Teşhis Edilen Koyunların Gama-interferon, İnterlöykin-10 ve Neopterin Düzeyleri*" başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından *Veteriner Mikrobiyoloji* Anabilim Dalında *Doktora Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

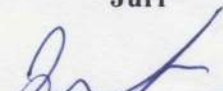
Tez Savunma Sınavı Tarihi 12/ 06/ 2019


Prof. Dr. Osman ERGANİŞ
Selçuk Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Başkan


Prof. Dr. Hülya TÜRÜTOĞLU
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri


Prof. Dr. Mehmet KALE
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri


Prof. Dr. Dilek ÖZTÜRK
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri


Doç. Dr. Zafer SAYIN
Selçuk Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri

ONAY

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu **28.06.2019** Tarih ve **23**. sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Mustafa Doğa TEMİZSOYLU
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

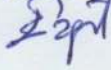
Uzun soluklu doktora öğrenimim ve tez dönemim süresince beni yetiştiren, bana her konuda destek veren, yardım ve tavsiyelerini esirgemeyen, meslek hayatındaki deneyimlerini benimle paylaşan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hülya TÜRÜTOĞLU'na, doktora öğrenimim süresince ilgi ve bilgileri ile bana yardımcı olan Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Dilek ÖZTÜRK, Doç. Dr. Faruk PEHLİVANOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Özlem ŞAHAN YAPICIER'e, tez dönemim süresince bilgi ve deneyimlerini paylaşarak çalışmamda bana yol gösteren Sayın Dr. Graeme Eamens, Dr. Karren Plain, Dr. Suelee Robbe-Austerman, Judith Stabel, Narae Kim, Dr. Iker Agirregomoscorta Sevilla, Doç. Dr. Mohamed Salem, Prof. Dr. Adel Talaat ve Dr. Janet B. Payeur'a, tez çalışmamda desteğini hiç esirgemeyen, değerli bilgilerinden yararlandığım ve referans suşun sağlanmasında yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Zafer SAYIN'a, istatistiksel analizleri gerçekleştiren değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Mustafa Ağâh TEKİNDAL ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Cevat SİPAHİ'ye, moleküler biyoloji alanındaki bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak tez çalışmamın bütün aşamalarında maddi ve manevi desteğini hiç eksik etmeyen çok değerli arkadaşım Uzman Biyolog Orhan YAVUZ'a, saha çalışmalarında yardım eden ve her aşamanın sonucunu benimle birlikte heyecanla bekleyerek destek veren arkadaşım Veteriner Hekim Ali Remzi BAYTAROĞLU'na ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalında görevli Biyolog Mehmet KAYA'ya teşekkür ederim. Ayrıca yaşamım boyunca her türlü maddi ve manevi desteği esirgemeyen, her zaman yanımda olan, bu zorlu süreci benimle birlikte yaşayan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ETİK BEYAN

“Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis Enfeksiyonu Teşhis Edilen Koyunların Gama-interferon, İnterlöykin-10 ve Neopterin Düzeyleri” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Hülya TÜRÜTOĞLU danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim

Öğrencinin Adı Soyadı: Ezgi ŞABABOĞLU

Tarih: 12.06.2019

İmza: 

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN SAYFASI	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	viii
TABLolar	x
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
TÜRKÇE ÖZET	xv
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Etiyoloji	6
2.3. Epidemiyoloji	11
2.4. İmmünite ve Patogenez	17
2.4.1. Doğal Bağışıklık	18
2.4.2. Kazanılmış Bağışıklık	19
2.4.2.1. Erken Evre	19
2.4.2.2. Subklinik Evre	21
2.4.2.3. Klinik Evre	22
2.5. Klinik Belirtiler	25
2.6. Patolojik Bulgular	26
2.7. Tanı Yöntemleri	29
2.7.1. Direkt Tanı Yöntemleri	30
2.7.1.1. Nekropsi ve Histopatoloji	30
2.7.1.2. Bakteriyoskopi	31
2.7.1.3. Bakteriyolojik Kültür	32
2.7.1.4. Moleküler Teşhis	39
2.7.2. İndirek Tanı Yöntemleri	44
2.7.2.1. Hücrese İmmun Yanıtı Ölçen Testler	44
2.7.2.1.1. Gecikmiş Tip Aşırı Duyarlılık Deri Testi	45
2.7.2.1.2. Gama İnterferon (IFN- γ) Testi	45
2.7.2.2. Humoral İmmun Yanıtı Ölçen Testler	48
2.7.2.2.1. Agar Jel İmmünodifüzyon (AGID) Testi	48
2.7.2.2.2. Komplement Fikzasyon Testi (KFT)	48
2.7.2.2.3. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	49
2.8. Koruma ve Kontrol	51
3. GEREÇ VE YÖNTEM	54
3.1. Gereç	54
3.1.1. Çalışma Planı	54
3.1.2. Kan ve Gaita Örnekleri	54
3.1.3. Referans <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> Suşu	55
3.1.4. Rose Bengal Pleyt Test Antijeni	56
3.1.5. Ziehl-Neelsen Boyamada Kullanılan Solüsyonlar	56
3.1.6. Gaita Dekontaminasyonunda Kullanılan Solüsyonlar	57

3.1.6.1. Heksadesilpiridinyum Klorür/ Brain Heart İnfüzyon Solüsyonu	57
3.1.6.2. Vankomisin, Amfoterisin B, Nalidiksik Asit/ Brain Heart İnfüzyon Solüsyonu	57
3.1.7. Besiyerleri	58
3.1.7.1. Herrold's Egg Yolk Agar	58
3.1.7.2. Modifiye Middlebrook 7H10 Agar	59
3.1.7.3. Mikobaktin J	59
3.1.7.4. Yumurta Sarısı Emülsiyonu	60
3.1.7.5. Middlebrook OADC Zenginleştirme Solüsyonu	60
3.1.8. Gama İnterferon ELISA Kiti	60
3.1.9. <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> Antikor ELISA Kiti	63
3.1.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Malzemeler	64
3.1.10.1. Dışkı Ekstraksiyon Kiti	64
3.1.10.2. Kültürden DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasal Maddeler	65
3.1.10.3. DNA Amplifikasyonu için Kullanılan Malzemeler	66
3.1.10.4. Agaroz Jel Elektroforez için Kullanılan Malzemeler	67
3.1.11. PZR-Restriksiyon Endonükleaz Analizi için Kullanılan Malzemeler	67
3.1.12. Koyun Spesifik İnterlöykin-10 ELISA Kiti	68
3.1.13. Koyun Spesifik Neopterin ELISA Kiti	70
3.2. YÖNTEM	72
3.2.1. Klinik Bulguların Değerlendirilmesi	72
3.2.2. Rose Bengal Pleyt Testi	72
3.2.3. Bakteriyoskopi	73
3.2.4. İzolasyon İşlemleri	74
3.2.4.1. Gaita Örneklerinin Dekontaminasyonu	74
3.2.4.2. Besiyerlerine İnokülasyon ve İnkübasyon	74
3.2.5. IFN- γ ELISA	75
3.2.5.1. Tam Kan Kültürünün Hazırlanması	75
3.2.5.2. Plazma Örneklerinin Toplanması	75
3.2.5.3. Testin Uygulanması	77
3.2.5.4. Testin Geçerlilik Kontrolü	78
3.2.5.5. Örnek Sonuçlarının Hesaplanması ve Değerlendirilmesi	78
3.2.6. <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> Antikor ELISA	79
3.2.6.1. Testin Uygulanması	79
3.2.6.2. Testin Geçerlilik Kontrolü	79
3.2.6.3. Örnek Sonuçlarının Hesaplanması ve Değerlendirilmesi	80
3.2.7. PZR	80
3.2.7.1. Gaitadan DNA İzolasyonu	80
3.2.7.2. Kültürden DNA İzolasyonu	81
3.2.7.3. İzole Edilen DNA'ların Absorbans Tayini	81
3.2.7.4. DNA'nın Amplifikasyonu	82
3.2.7.5. Elektroforez ve Görüntüleme	82
3.2.7.6. Nested PZR	83
3.2.7.7. DNA Dizi Analizi	83
3.2.8. PZR-REA	84

3.2.8.1. IS1311 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu	84
3.2.8.2. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi	84
3.2.8.3. Elektroforez ve Görüntüleme	85
3.2.8. Sitokin Düzeyleri Ölçülecek Plazma ve Serum Örneklerinin Seçimi	85
3.2.9. IFN- γ Düzeylerinin Belirlenmesi	85
3.2.10. IL-10 Düzeylerinin Belirlenmesi	86
3.2.10.1. Testin Uygulanması	86
3.2.10.2. Testin Geçerlilik Kontrolü ve Örnek Sonuçlarının Hesaplanması	86
3.2.11. NP Düzeylerinin Belirlenmesi	87
3.2.11.1. Testin Uygulanması	87
3.2.11.2. Testin Geçerlilik Kontrolü ve Örnek Sonuçlarının Hesaplanması	88
3.2.12. İstatistiksel Analizler	88
4. BULGULAR	90
4.1. Klinik Bulgular	90
4.2. Rose Bengal Pleyt Testi	90
4.3. Bakteriyoskopi	91
4.4. Kültür	92
4.5. IFN- γ ELISA	94
4.6. Antikor ELISA	96
4.7. Gaita Örneklerinin PZR Analizi	97
4.8. DNA Dizi Analizi	101
4.9. <i>Map</i> Kolonilerinin PZR ile Doğrulanması	104
4.10. PZR-REA	105
4.11. Tanı Yöntemlerinin Karşılaştırması	106
4.12. Sitokin Düzeyleri	117
4.12.1. IFN- γ Düzeyi	117
4.12.2. IL-10 Düzeyi	118
4.12.3 NP Düzeyi	119
4.12.4. Antikor ve Sitokin Düzeylerinin Karşılaştırılması	120
5. TARTIŞMA	124
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	143
KAYNAKLAR	144
ÖZGEÇMİŞ	169

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Mikobakterilerde hücre duvarının yapısı	7
Şekil 3.1.	<i>Map</i> 'in izolasyonu için kullanılan besiyerleri	59
Şekil 3.2.	<i>Map</i> 'e karşı oluşan IFN- γ yanıtını belirlemek için kullanılan kit	61
Şekil 3.3.	<i>Map</i> 'e karşı gelişen antikorları araştırmada kullanılan ELISA kiti	63
Şekil 3.4.	Direkt gaitadan DNA izolasyonu yapmak amacıyla kullanılan dışkı ekstraksiyon kiti	64
Şekil 3.5.	Koyunlarda IL-10 düzeyini belirlemede kullanılan ELISA kiti	69
Şekil 3.6.	IL-10 için ELISA testinde kullanılan standartların sulandırması	69
Şekil 3.7.	Koyunlarda neopterin düzeyini belirlemede kullanılan sandviç ELISA kiti	71
Şekil 3.8.	Kan ve antijenlerin eklendiği 24 kuyucuklu doku kültürü pleyti	76
Şekil 3.9.	Steril mikropleyttten anti IFN- γ antikorları ile kaplı ELISA mikropleytine örneklerin aktarılması	77
Şekil 3.10.	IL-10 düzeyinin hesaplanmasında kullanılacak örnek standart eğri	87
Şekil 4.1.	Paratüberküloz yönünden pozitif olarak değerlendirilen ve VKS'u 1 olarak belirlenen koyunlar	91
Şekil 4.2.	Gaita örneklerinde ZN boyama yöntemi ile AFB'lerin mikroskopik görüntüsü (1000X)	92
Şekil 4.3.	HEYM ve modifiye Middlebrook 7H10 besiyerlerinin yüzeyinde gözlenen mantar (1) ve <i>Bacillus</i> sp. (2) kolonileri	93
Şekil 4.4.	<i>Map</i> 316 F referans suşunun HEYM (1) ve modifiye Middlebrook 7H10 agar (2) yüzeyinde gelişen kolonileri	94
Şekil 4.5.	Modifiye Middlebrook 7H10 agar yüzeyinde <i>Map</i> şüpheli koloniler	94
Şekil 4.6.	Koyun plazma örneklerinin IFN- γ ELISA sonucu	95
Şekil 4.7.	Koyun kan serumu örneklerinin ELISA sonuçları	97
Şekil 4.8.	P90/P91 (400 bp) primer çifti kullanılarak uygulanan PZR sonuçları	98
Şekil 4.9.	150C/921 (229 bp) primer çifti kullanılarak uygulanan PZR analizi sonuçları	99
Şekil 4.10.	Nested PZR sonuçları	99
Şekil 4.11.	<i>Map</i> spesifik IS900 gen bölgesine yönelik 150C/921 ve P90/91 primer çiftleri ile uygulanan PZR ve nested PZR sonuçları	100
Şekil 4.12.	İzole edilen 5 <i>Map</i> izolatının 150C/921 (229 bp) primer çifti kullanılarak uygulanan PZR analizi sonuçları	105
Şekil 4.13.	IS1311 gen bölgesine yönelik uygulanan PZR analizinde 608 bp'de bant saptanan DNA örnekleri	106
Şekil 4.14.	IS1311 gen bölgesi pozitif bulunan PZR ürünlerinin REA sonuçları	106
Şekil 4.15.	Paratüberküloz pozitif ve negatif olarak belirlenen hayvanların IFN- γ ortalama OD değerleri	118
Şekil 4.16.	Koyun kan serumu örneklerinin ELISA ile IL-10 sonuçları	119

Şekil 4.17.	Koyun kan serumu örneklerinin IL-10 düzeylerinin hesaplanmasında kullanılan standart eğri	119
Şekil 4.18.	Koyun kan serumu örneklerinin ELISA ile NP sonuçları	120
Şekil 4.19.	NP düzeyinin hesaplanmasında kullanılan standart eğri	120
Şekil 4.20.	Paratüberküloz pozitif ve negatif koyunların antikor, IFN- γ , IL-10 ve NP ortalama OD değerleri	121
Şekil 4.21.	Paratüberküloz pozitif ve negatif hayvanların teşhis testlerine göre antikor ve sitokin düzeyleri	122
Şekil 4.22.	Paratüberküloz pozitif hayvanların teşhis testlerine göre antikor ve sitokin düzeyleri	123



TABLÖLAR

Tablo 2.1.	Paratüberküloz teşhisinde kullanılan yöntemlerin hastalığın evresine göre sensitivite ve spesifiteleri	30
Tablo 3.1.	Koyun kan ve gaita örneklerinin alındığı köyler ile sürü ve örnek sayıları	55
Tablo 3.2.	Kan örneklerinin alındığı koyunların yaşları ile sürü büyüklüklerinin dağılımı	55
Tablo 3.3.	<i>Map</i> 'in IS900 gen bölgesini çoğaltmak için PZR analizinde kullanılan primer dizileri	67
Tablo 3.4.	PZR-REA'de kullanılan primer dizileri	68
Tablo 3.5.	Koyunlarda VKS'nun değerlendirilmesi	72
Tablo 3.6.	ZN yöntemiyle boyanan preparatların değerlendirmesi	73
Tablo 3.7.	Kan örnekleri ile antijenlerin 24 kuyucuklu doku kültürü pleytine dağıtılması	76
Tablo 3.8.	Toplanan plazma örneklerinin steril ve boş bir mikropleyte aktarımı	76
Tablo 3.9.	NP düzeyinin hesaplanması için standart eğrinin çizilmesinde kullanılan formül	88
Tablo 4.1.	Kan ve gaita örneklerinin alındığı koyunların VKS'ları ile yaş ve ishal durumları	90
Tablo 4.2.	Gaita ve gaita sedimentinden hazırlanan preparatların ZN boyama sonuçları	92
Tablo 4.3.	Paratüberküloz yönünden incelenen koyun işletmelerinin IFN- γ ELISA ve antikor ELISA sonuçları	95
Tablo 4.4.	Paratüberküloz yönünden incelenen koyunların yaş gruplarına göre IFN- γ ELISA sonuçları	96
Tablo 4.5.	Paratüberküloz yönünden incelenen koyunların yaş gruplarına göre antikor ELISA sonuçları	97
Tablo 4.6.	Gaita örneklerinde PZR ile paratüberküloz yönünden pozitiflik saptanan işletmeler ile koyun sayıları	100
Tablo 4.7.	Paratüberküloz yönünden incelenen koyunların yaş gruplarına göre PZR sonuçları	101
Tablo 4.8.	PZR analizinde pozitif olarak belirlenen 2 örneğin DNA dizi analizi	102
Tablo 4.9.	Nested PZR ile pozitif olarak belirlenen örneğin 1. ve 2. PZR ürünlerinin DNA dizi analizi	103
Tablo 4.10.	P90/P91 primer çifti ile 500 bp'de non-spesifik bant gözlenen bir örneğin DNA dizi analizi	104
Tablo 4.11.	Tanı testlerine göre paratüberküloz pozitif saptanan sürü ve koyun sayıları	107
Tablo 4.12.	Kültür yöntemi ile <i>Map</i> izole edilen 5 koyunun diğer test sonuçları	107
Tablo 4.13.	Paratüberküloz yönünden incelenen 150 koyunun test sonuçları	108
Tablo 4.14.	Tanı testlerine göre paratüberküloz pozitif saptanan koyun sayıları	116

Tablo 4.15.	Tanı testlerine göre paratüberküloz pozitif saptanan koyunların yaş, ishal durumu ve VKS sonuçları	117
Tablo 4.16.	Paratüberküloz yönünden pozitif saptanan 40 koyunun test sonuçlarına göre ortalama antikor ve sitokin OD değerleri	123



SİMGELER ve KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AFB	Asit-fast bakteri
AGID	Agar jel immunodifüzyon (agar gel immunodiffusion)
AM	Arabinomannan
B	Bizon tipi <i>Map</i>
BAC	Benzalkonyum klorür
BHI	Brain-heart infüzyon
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Baz çifti, base pair
C	Sığır (cattle) tipi <i>Map</i>
°C	Santigrat derece
CD	Değişim kümesi (cluster of differentiation)
CD4+ Th	CD4+ yardımcı T (helper) lenfosit
CD8+ Tc	CD8+ sitotoksik (cytotoxic) T lenfosit
CH₃COONa	Sodyum asetat
CO₂	Karbon dioksit
CTAB	N-asetil-N, N, N-trimetil amonyom bromür
DC	Dentritik hücre
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksi nükleotid trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
g	Gravite
GALT	Bağırsak ile ilişkili lenfoid doku (gut-associated lymphoid tissue)
G+C	Guanin+Sitozin (Guanine+Cytosine)
gr	Gram
HCl	Hidroklorik asit
HEYM	Herrold's egg yolk agar
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HPC	Heksadesilpiridinyum klorür
HPC/BHI	Heksadesilpiridinyum klorür/brain heart infüzyon
HRM	Yüksek çözünürlüklü eritme analizi (high-resolution melt)
HRP	Horsradish peroksidaz
H₂SO₄	Sülfürik asit
IFN	İnterferon
IgG1	İmmunoglobulin G1
IgG2	İmmunoglobulin G2
IL	İnterlöykin
IS	İnseriyon sekansı
IS1311	İnseriyon sekansı 1311
IS900	İnseriyon sekansı 900
IU	İnternasyonel ünite
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KDa	Kilodalton

KFT	Komplement fikzasyon testi
K₂HPO₄	Dipotasyum hidrojen fosfat
KH₂PO₄	Potasyum dihidrojen fosfat
Kob	Koloni oluşturan birim
LAM	Lipoarabinomannan
LAMP	Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (loop-mediated isothermal amplification)
l	Litre
LJ	Lowenstein Jensen
M	Marker
Maa	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> kompleks
mAh	Miliamper-saat
Mah	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
ManLAM	Mannoz ile kaplı lipoarabinomannan
Map	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
Mas	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>
Mb	Megabaz çifti
mg	Miligram
MHC	Büyük doku uyuşum kompleksi (major histocompatibility complex)
ml	Mililitre
mm	Milimetre
M. phlei	<i>Mycobacterium phlei</i>
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogram
NK	Negatif kontrol
nm	Nanometre
NO₂	Azot dioksit
NP	Neopterin
OA	Oksalik asit
OADC	Oleik albümin dekstroze katalaz (oleic albumin dextrose catalase)
OD	Optikal dansite
PBMC	Periferal kan mononükleer hücreleri (peripheral blood mononuclear cells)
PAMP	Patojen ile ilişkili moleküler yapılar (pathogen associated molecular patterns)
PBS	Fosfat tamponlu tuzlu su (phosphate buffered saline)
PFGE	Pulsed-field jel elektroforez (pulsed-field gel electrophoresis)
pg	Pikogram
pH	Potansiyel hidrojen
PK	Pozitif kontrol
PPD	Pürifiye protein derivatı
PRR	PAMP'ları tanımakla görevli reseptörler (pattern recognition receptors)
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PZR-REA	Polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon enzim analizi

RFLP	Restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism)
rpm	Dakikadaki devir sayısı (revolutions per minute)
RT-PZR	Real-time PZR
S	Koyun (sheep) tipi <i>Map</i>
SD	Standard sapma
SDS	Sodium dodesil sülfat
TAE	Tris-asetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGF-β	Transforme büyüme faktörü-beta (transforming growth factor-beta)
Th	Yardımcı (helper) T hücresi
TLR	Toll benzeri reseptörler (toll-like receptors)
TMB	Tetrametilbenzidin
TNF	Tümör nekrozis faktörü (tumor necrosis factor)
Treg	Düzenleyici T hücreleri (regulatory T cells)
U	Ünite
UV	Ultraviyole
v/v	Hacimce yüzde
VAN	Vankomisin, amfoterisin B ve nalidiksik asit
VAN/BHI	Vankomisin, amfoterisin B, nalidiksik asit/brain heart infüzyon
VKS	Vücut kondüsyon skoru
VNTR	Değişken sayılı tandem tekrarları (variable number of tandem repeats)
w/v	Hacimde ağırlıkça yüzde
ZN	Ziehl-Neelsen
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
γδ T	Gama-delta T hücreleri
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre

ÖZET

***Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Enfeksiyonu Teşhis Edilen Koyunların Gama-interferon, İnterlöykin-10 ve Neopterin Düzeyleri**

Paratüberküloz, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (*Map*) tarafından oluşturulan, kronik, granülomatöz enterit ile karakterize bir hastalıktır. Hastalığın evrelerine göre tanıda farklı testler kullanılmaktadır. Bu çalışma ile koyunlarda interferon gama (IFN- γ) ELISA, antikor ELISA, Ziehl-Neelsen (ZN) boyama, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve kültür yöntemleri ile hastalığın araştırılması ve pozitif ve negatif olarak belirlenen koyunlarda antikor, IFN- γ , interlöykin-10 (IL-10) ve neopterin (NP) düzeylerinin karşılaştırılması amaçlandı. Bu amaçla, Burdur ilinde 15 koyun sürüsünde 2 yaş ve üzerindeki *onar* hayvandan olmak üzere toplam 150 kan ve gaita örneği alındı. Kan serumu örnekleri *Map*'e karşı gelişen antikorlar, plazma örnekleri ise IFN- γ yönünden ELISA ile incelendi. Gaita örnekleri ise ZN boyama, PZR ve kültür için kullanıldı. Dekontaminasyon sonrası gaita örneklerinin HEYM ve modifiye Middlebrook 7H10 agar besiyerlerine ekimleri yapıldı. Aynı gaitalardan izole edilen DNA örnekleri *Map*'e spesifik iki primer çifti (P90/P91 ve 150C/921) kullanılarak klasik ve nested PZR ile incelendi. Gaita ve *Map* izolatlarından elde edilen DNA örnekleri IS1311 gen bölgesine yönelik uygulanan PZR işleminden sonra restriksiyon endonükleaz analizi (REA) ile tiplendirildi. Pozitif ve negatif olarak belirlenen *kırkar* koyunun antikor, IFN- γ , IL-10 ve NP düzeyleri ortalama optik dansite (OD) değerlerine göre karşılaştırıldı. Çalışmadaki 150 koyundan 73'ünün enfekte olduğu belirlendi. PZR-REA ile enfeksiyona neden olan *Map*'in koyun tipi olduğu tespit edildi. Testlerin hepsinde pozitif sonuç veren bir koyun tespit edilemedi ve en yüksek pozitiflik oranları ZN boyama (%27,33) ve PZR (%26,66) ile saptandı. Bunu sırasıyla IFN- γ ELISA (%22), antikor ELISA (%10,67) ve kültür (%3,33) yöntemleri izledi. Kültür sonuçları ile karşılaştırıldığında; ZN boyama, PZR, IFN- γ ve antikor ELISA testlerinin sensitivite ve spesifiteleri sırasıyla %80-%74, %60-74, %20-%77, %20-%89 olarak hesaplandı. Paratüberküloz yönünden pozitif ve negatif olarak değerlendirilen hayvanların yaş grupları arasında istatistiksel olarak bir fark ($p>0,05$) saptanmazken, diyare bulgusu ve vücut kondüsyon skorları arasındaki fark ($p<0,01$) anlamlı bulundu. Pozitif hayvanların antikor, IFN- γ , IL-10 ve NP düzeyleri negatif hayvanlardan daha yüksek bulunmasına rağmen, istatistiksel olarak önemli fark antikor, IFN- γ ve IL-10 düzeylerinde belirlendi ($p<0,01$). Pozitif hayvanlar arasında IL-10 düzeylerinin ($p>0,05$) aksine, antikor, IFN- γ ve NP düzeyleri farklı bulundu ($p<0,01$). Sonuç olarak; koyunlarda paratüberkülozun hastalığın evresine bağlı olarak 2 yaş kadar erken bir dönemde IFN- γ ELISA, antikor ELISA, ZN boyama, PZR veya kültür yöntemleri ile tespit edilebileceği, ancak hastalığın klinik aşamasında ZN boyama veya sensitivitesi ve spesifitesi daha yüksek bulunan PZR gibi yöntemlerin kullanılabileceği kanısına varıldı. Diğer taraftan pozitif ve negatif hayvanlarda IL-10 düzeylerinin çok farklı bulunması ve enfeksiyonun her döneminde serumda ölçülebilir olması nedeniyle IFN- γ gibi tanı amacıyla bu sitokinden de yararlanılabileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: IFN- γ , IL-10, Koyun, Neopterin, Paratüberküloz, Teşhis

ABSTRACT

Gamma-interferon, Interleukin-10 and Neopterin Levels of Sheep Diagnosed with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Infection

Paratuberculosis is a disease caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (*Map*) and characterized by chronic granulomatous enteritis. Different tests are used in the diagnosis according to the stage of the disease. The purpose of the present research was to investigate paratuberculosis infection in sheep by interferon gamma (IFN- γ) ELISA, antibody ELISA, Ziehl-Neelsen (ZN) staining, polymerase chain reaction (PCR) and culture methods and to compare the antibody, IFN- γ , interleukin -10 (IL-10) and neopterin (NP) levels between animals determined as positive and negative for paratuberculosis. Two years and older sheep were included in the study. Ten sheep from each of 15 sheep farms were selected randomly in Burdur province and total 150 blood and fecal samples were collected. Blood serum samples were examined for antibodies against *Map* and plasma samples were analyzed by ELISA for IFN- γ . Stool samples were used for ZN staining, PCR and culture. After decontamination, stool samples were planted on HEYM and modified Middlebrook 7H10 agar media. The DNA samples extracted from the fecal samples were analyzed by classical and nested PCR using two *Map* specific primer pairs (P90/P91 and 150C/921). DNA samples obtained from stool samples and *Map* isolates were typed by restriction endonuclease analysis (REA) after PCR procedure for IS1311 gene region. The levels of antibody, IFN- γ , IL-10 and NP in 40 sheep determined as positive and 40 sheep determined as negative were compared based on the mean optical density (OD) values. Of the 150 sheep in the study, 73 were found to be infected. The type of *Map* was determined to be sheep type by PCR-REA. None of 73 sheep were positive for all of the tests and the highest rate of positivity was determined by ZN staining (27,33%) and PCR (26,66%). This was followed by IFN- γ ELISA (22%), antibody ELISA (10,67%) and culture (3,33%). According to the culture results; the sensitivity and specificity of the ZN staining, PCR, IFN- γ and antibody ELISA tests were calculated as 80-74%, 60-74%, 20-77%, 20-89% respectively. There was no statistically significant difference ($p>0,05$) between the age groups of animals determined as positive and negative for paratuberculosis, whereas the difference between diarrhea and body condition scores was significant ($p<0,01$). Although antibody, IFN- γ , IL-10 and NP levels of positive animals were higher than negative animals, statistically significant difference was determined in antibody, IFN- γ , and IL-10 levels ($p<0,01$). In positive animals, except IL-10 levels ($p>0,05$), the difference was determined in antibody, IFN- γ and NP levels ($p<0,01$) between animals groups constituted according to test results. As a result; It was concluded that paratuberculosis can be detected by IFN- γ ELISA, antibody ELISA, ZN, PCR or culture methods in sheep as early as 2 years old depending on the stage of the disease, but ZN staining or PCR methods with higher sensitivity and specificity can be used in the clinical stage of the disease. On the other hand, since IL-10 levels were found to be very different between positive and negative animals and measurable in serum at every period of the infection, it was thought that this cytokine could be used for diagnosis as IFN- γ .

Key Words: Diagnosis, IFN- γ , IL-10, Sheep, Neopterin, Paratuberculosis

1. GİRİŞ

Paratüberküloz, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (*Map*) tarafından oluşturulan kronik, progresif, granülomatöz enteritis ile karakterize ve Dünya çapında ciddi ekonomik kayıplara neden olan bir hastalıktır (Arsenault ve ark., 2014; Eamens ve ark., 2015; Manning ve Collins, 2010b; OIE, 2008; OIE, 2018; Ott ve ark., 1999; Wadhwa ve ark., 2013; Yardımcı, 2006). *Map*'in sığır, koyun, keçi, bizon, beyaz kuyruklu geyik, Kanada geyiği, alpaka, lama, deve, manda ve dağ keçisi, tavşan, tilki, maymun, porsuk, çakal, kuş, kedi ve rakun gibi birçok evcil veya yabani hayvanda hastalık oluşturabileceği bildirilmiştir (Arsenault ve ark., 2014; Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; OIE, 2018; Wadhwa ve ark., 2013; Yardımcı, 2006). Ruminantlarda enfeksiyonun erken, subklinik ve klinik olarak tanımlanan farklı evrelerden oluştuğu (Clarke, 1997; Singh ve ark., 2013a; Wadhwa ve ark., 2013), erken veya subklinik evrede klinik bulgu görülmediği (Clarke, 1997; Maroudam ve ark., 2015; Wadhwa ve ark., 2013), ancak subklinik evrenin geç dönemi ile klinik evrede sürekli ishal, halsizlik, kas erimesi ve süt üretiminde azalma gibi klinik belirtilerin gözlenebileceği belirtilmiştir (Clarke, 1997; Eamens ve ark., 2015; Maroudam ve ark., 2015; Whittington ve ark., 2017).

Enfeksiyonun erken döneminde hücresel immun yanıtın baskın olduğu (Coussens ve ark., 2004; Gillan ve ark., 2010; Khalifeh ve Stabel, 2004a; Magombedze ve ark., 2015; Stabel ve Robbe-Austerman, 2011), enfeksiyon ilerledikçe artan antikor yanıtı ile birlikte hücresel yanıtın azalarak humoral immun yanıtı dönüştüğü rapor edilmiştir (Begg ve Whittington, 2010; Coussens ve ark., 2004; Maroudam ve ark., 2015; Stabel, 2010). Enfekte hayvanlarda hastalığın erken veya subklinik evresinde baskın olan sitokinin interferon-gama (IFN- γ) olduğu belirtilmiş (Coussens ve ark., 2004; Gillan ve ark., 2010; Khalifeh ve Stabel, 2004a; Magombedze ve ark., 2015; Stabel ve Robbe-Austerman, 2011) ve IFN- γ ile uyarılan makrofajlar tarafından üretilen neopterin (NP)'in vücut sıvılarındaki IFN- γ varlığını gösterebileceği ileri sürülmüştür (Maroudam ve ark., 2015; Mikkelsen, 2011; Yeğen, 2004). Hücresel immun yanıtın baskılanmasına bağlı olarak enfeksiyonunun klinik aşamaya geçtiği (Sohal ve ark., 2008; Stabel, 2010; Wadhwa ve ark., 2013), antikor üreten B hücrelerinin arttığı ve bununla orantılı bir şekilde serum antikor düzeylerinin de tespit

edilebilir şekilde yükseldiği (Stabel, 2010; Wadhwa ve ark., 2013) bildirilmiştir. İmmun yanıtın değişimi ile birlikte interlökin-10 (IL-10) gibi sitokinlerin baskın olduğu gözlenmiş (Coussens ve ark., 2004; de Almeida ve ark., 2008; Khalifeh ve Stabel, 2004a; Magombedze ve ark., 2015; Weiss ve ark., 2005) ve IL-10'un IFN- γ üretilmesini baskıladığı ileri sürülmüştür (Coussens ve ark., 2004; de Almeida ve ark., 2008; Khalifeh ve Stabel, 2004a; Magombedze ve ark., 2015; Stabel, 2010; Weiss ve ark., 2005).

Paratüberküloz teşhisinde kullanılan testler arasında erken, subklinik ve klinik olmak üzere tanımlanan evrelere göre farklılıklar bulunmaktadır. Klinik bulgu gösteren hayvanlarda; gaita veya bağırsaklardaki patognomonik lezyonlardan hazırlanan preparatlarda yoğun asit-fast bakterilerin (AFB) görülmesi, nekropsi ve histopatolojik bulgular ile gaita ve doku örneklerinde kültür veya polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile etkenin tespit edilmesi veya enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) gibi serolojik testler ile teşhis konulabileceği belirtilmiştir (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; OIE, 2018). Subklinik enfekte hayvanların ise *Map*'e karşı gelişen spesifik antikorların ortaya konulması, gaita ve doku örneklerinde *Map*'in kültür veya PZR ile tespiti veya hücrel immün yanıt düzeyinin ölçülmesi ile saptanabileceği açıklanmıştır (Begg ve Whittington, 2010; OIE, 2008; OIE, 2018). Ancak hastalığın gerek yavaş seyirli olması ve gerekse erken, subklinik ve klinik evrelerinde gelişen immün yanıtın farklılık göstermesi nedeniyle kullanılan testlerden hiçbirinin %100 sensitivite veya spesifiteye sahip olmadığı ve bu nedenle enfeksiyonun her aşamasında hastalığı tespit edebilen bir yöntemin bulunmadığı ileri sürülmüştür (Nielsen, 2010; OIE, 2008; OIE, 2018).

Türkiye'de koyunlarda paratüberkülozun varlığı ilk kez 1968 yılında bildirilmiş (Hakioğlu, 1968) olmasına rağmen, bugüne kadar koyunlarda hastalığın yaygınlığına yönelik az sayıda araştırma mevcuttur (Buyuk ve ark., 2014; Celik ve Turutoglu, 2017). Diğer taraftan koyunlardan izole edilen *Map* izolatlarının üreme ile moleküler özelliklerini ve ayrıca IFN- γ , IL-10 ve NP gibi sitokinlerin hastalığındaki rolünü ortaya koyan bir araştırma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında; Burdur ilinde tesadüfi örnekleme ile seçilen 2 yaş ve üzerindeki koyunlardan kan ve gaita örnekleri alınarak Ziehl-Neelsen (ZN) boyama, IFN- γ ELISA, antikor ELISA, PZR ve

bakteriyolojik kültür yöntemleri ile hastalığın araştırılması, izole edilen etkenin özelliklerinin belirlenmesi ve paratüberküloz yönünden pozitif ve negatif olarak saptanan koyunlarda antikor, IFN- γ , IL-10 ve NP düzeylerinin karşılaştırılması amaçlandı.



2. GENEL BİLGİLER

Paratüberküloz (Johne hastalığı); sığır, koyun ve keçilerin *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) tarafından oluşturulan, zayıflama, ishal gibi klinik belirtiler ile granülomatöz enterokolitis, bölgesel lenfanjitis ve lenfadenitis ile karakterize olan kronik seyirli, enfeksiyöz ve bulaşıcı bir hastalıktır (Eamens ve ark., 2015; Manning ve Collins, 2010b; OIE, 2008; OIE, 2018; Yardımcı, 2006).

2.1. Tarihçe

Robert Koch (1843-1910) tarafından geliştirilen mikroskopi, boyama ve kültür yöntemleri ile ilk defa 1884 yılında tüberkülozun etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)’in saf olarak izole edildiği ve elde edilen sonuçların fotoğraflanarak kalıcı olarak kaydedildiği bildirilmiştir (Manning ve Collins, 2010b). Ayrıca Koch’un tüberkülin antijenlerini üreterek mikobakterilerden ileri gelen hastalıkların teşhisinde yeni teknikler geliştirdiği ifade edilmiş ve bu tekniklerin diğer bir mikobakteriyel enfeksiyon olan paratüberkülozun tanımlanmasında da kullanıldığı açıklanmıştır (Manning ve Collins, 2010b).

Mikobakteriyoloji öncesi dönemde; sığırlarda “aşırı zayıflama” hastalığına dikkat çekilmiş ve bu hastalığa ait raporların ilk kez 1805 yılında Le Frang van Berkey, 1807 yılında Edward Skellet ve yaklaşık yirmi yıl sonra da (1829) W. A. Cartwright tarafından yayınlandığı açıklanmıştır (Manning ve Collins, 2010b). Hastalık tanımlanırken insanlardaki tüberkülozu yansıtan ifadeler kullanıldığı, ancak aralarında bir ilişki olduğuna dair bilgilere yer verilmediği bildirilmiştir (Manning ve Collins, 2010b). Hastalığın etkeni ile klinik özelliklerinin ilk kez 1895 yılında Alman bilim insanları olan Dr. Heinrich Albert Johne ve Dr. Langdon Frothingham tarafından tanımlandığı bildirilmiştir (Chiodini, 2005; Manning ve Collins, 2010b; Singh ve ark., 2013a). Johne ve Frothingham’ın kronik ishal sonucu ölen bir sığırın bağırsak mukozasında kalınlaşma ve mezenterik lenf yumrularında büyüme saptadıkları, bağırsağın histolojik muayenesinde lökosit ve epiteloid hücre infiltrasyonlarında artış ile birlikte *Mtb*’e benzer aside dirençli bakteriler gözledikleri açıklanmıştır (Chiodini, 2005; Manning ve Collins, 2010b). Bağırsak dokusundan hazırlanan inokulumun

enjekte edildiği kobaylarda tüberküloz etkeninin aksine hastalık oluşmadığının gözlenmesi üzerine aynı araştırmacılar tarafından hastalığa “pseudotüberkülozis enteritis” adının verildiği ve hastalığa kanatlı hayvanlarda tüberküloza neden olan *Mycobacterium avium*’un yol açmış olabileceğinin düşünüldüğü ifade edilmiştir (Chiodini, 2005; Manning ve Collins, 2010b). Nitekim 1902 yılında Dr. Herman Markus tarafından *M. avium*’un enteritise yol açığının belirtildiği bildirilmiştir (Manning ve Collins, 2010b). 1906 yılında bu hastalıktan şüpheli hayvanların avian tüberkülin antijenine karşı dermal yanıt verdiğinin Bernhard Bang tarafından tesadüfen saptandığı ve hastalığın teşhisinde kullanılmaya başlandığı açıklanmıştır (Chiodini, 2005; Manning ve Collins, 2010b). Aynı yıl içinde hastalığın Bang tarafından “*enteritis chronica bovis pseudotuberculosis*” olarak tanımlandığı (Manning ve Collins, 2010b) ve John Mc Fadyean tarafından ise Dr. Johne’a izafeten “Johne hastalığı” (Johne’s disease) teriminin ilk kez kullandığı belirtilmiştir (Chiodini, 2005; Manning ve Collins, 2010b; Singh ve ark., 2013a). Takip eden yıllarda kültür için biyolojik ortam sağlanamadığından hastalık etkeninin izole edilemediği, ancak 1912 yılında Frederick William Twort tarafından tesadüfen yeni bir kültür yönteminin keşfedildiği bildirilmiştir (Chiodini, 2005; Manning ve Collins, 2010b). Twort tarafından steril olmayan ortamda yapılan kültür işlemlerinde büyük kontamine kolonilerin (*Mycobacterium phlei*) etrafında küçük kolonilerin ürediğinin gözlemlendiği, besiyerine gerekli gıdayı dâhil edebilmek için ısı ile inaktive edilmiş *M. phlei* katılması ile Johne hastalığına neden olan bakterinin izole edildiği ve araştırmacı tarafından hastalığın etkeninin “*Mycobacterium enteriditis chronicae pseudotuberculosis bovis, Johne*” olarak isimlendirildiği bildirilmiştir (Chiodini, 2005; Manning ve Collins, 2010b). Daha sonra hastalığın etkeni *Mycobacterium paratuberculosis*, hastalığın adı ise paratüberküloz veya “Johne hastalığı” (Johne’s disease) olarak kabul edilmiştir (Chiodini, 2005). Geçmişte hastalığın etkeni için *M. paratuberculosis* ile eş anlamlı olarak *Mycobacterium johnei* kullanılmış, 1990 yılına gelindiğinde *M. paratuberculosis*’in *M. avium* kompleksine ait olduğu ortaya konularak *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) olarak yeniden isimlendirilmiştir (Chiodini, 2005).

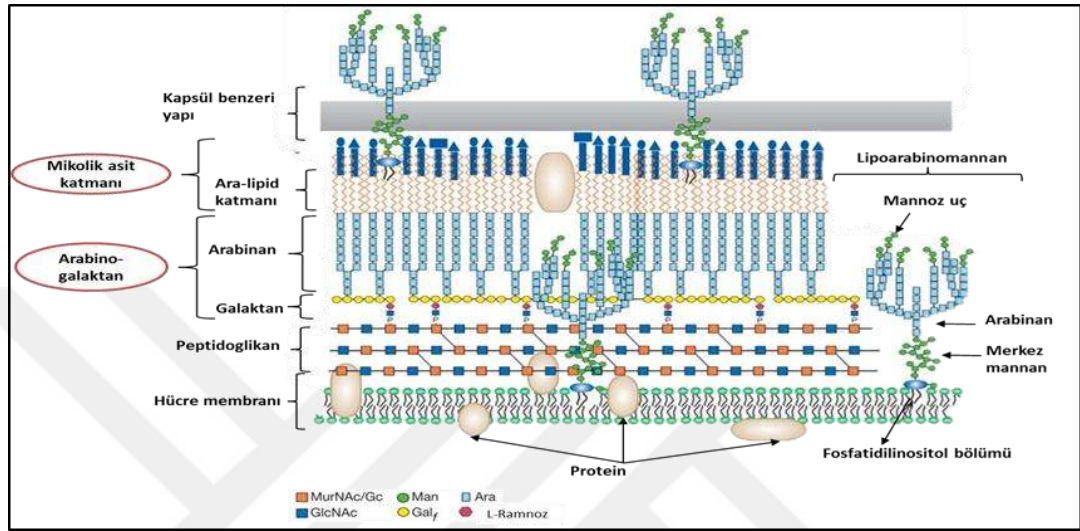
Johne hastalığının 1908 yılında Dr. Leonard Pearson tarafından ilk kez Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde de rapor edilmesi ile hastalığın Almanya ile sınırlı kalmadığı anlaşılmıştır (Chiodini, 2005; Manning ve Collins, 2010b). 1913 yılında düzenlenen Amerikan Veteriner Hekimliği Derneği toplantısında doktora tez konusu paratüberküloz olan Dr. Meyer'in hastalığın kontrolü için gerekli adımlar atılmazsa çok ciddi ekonomik kayıplara yol açacağını ifade ettiği açıklanmıştır (Manning ve Collins, 2010b). Hastalığın varlığı 1920 yılından itibaren Afrika ve Asya, 1930 yılından itibaren de Güney Amerika ülkelerinde bildirilmeye başlanmış ve 1970'li yıllara gelindiğinde hastalığın tüm dünya çapında yaygın ve çok önemli bir hastalık olduğu kabul edilmiştir (Chiodini, 2005; Manning ve Collins, 2010b).

2.2. Etiyoloji

Mikobakteriler taksonomik olarak; *Actinobacteria* sınıfı, *Corynebacteriales* takımı ve *Mycobacteriaceae* familyasında bulunan *Mycobacterium* cinsi içerisinde yer almaktadır (Anonim, 2018a). Mikobakteriler genel olarak Gram pozitif, ince, çomak şeklinde, karakteristik olarak aside dirençli, yavaş üreyen bakterilerdir (OIE, 2008; OIE, 2018; Saviola ve Bishai, 2006). Bu cinsin üyeleri 0,2-0,7 x 1-10 µm büyüklüğünde, düz veya hafif eğimli çomak görünümündedir. Mikobakteriler kapsülsüz, hareketsiz ve sporsuz olup, aerobik koşullarda ürerler. Üremeleri oldukça yavaştır ve kolonileri optimal üreme ısısında (37°C) 2-60 günde ya da daha geç sürede görünür hale gelir (OIE, 2008; OIE, 2018; Saviola ve Bishai, 2006; Turenne ve Alexander, 2010). Kolonileri genellikle pembe, turuncu veya sarı renkte olup, yüzeyleri pürüzlü ve mattır. *Map* gibi bazı türler *in vitro* koşullarda mikobaktin J'ye ihtiyaç duyarken, *Mycobacterium leprae* gibi bazı türler *in vitro* koşullarda üretilemez (Saviola ve Bishai, 2006).

Mikobakterilerin hücre duvarında birçok katman ile birlikte toplam kuru ağırlığının %20-40'ını oluşturan lipid tabaka bulunmaktadır (Şekil 2.1). Hücre duvarında bulunan bu lipid yapıyı mikolik asit olarak bilinen uzun zincirli yağ asidi esterleri oluşturmakta ve mikolik asitler hücre duvarına arabinogalaktan aracılığı ile bağlanmaktadır. Bakteriye balmumu özelliği kazandıran lipid yapı; bakterinin çevresel koşullara, antiseptiklere, asit ve alkole dirençli hale gelmesine yol açar (Saviola ve

Bishai, 2006). Aynı zamanda bakterinin boyayı almasını da engellediği için mikobakterilerin boyanmasında genellikle Ziehl-Neelsen (ZN), Konrich veya auramin-O boyasının kullanıldığı boyama yöntemlerinden yararlanılır (Arda, 2006; Saviola ve Bishai, 2006).



Şekil 2.1. Mikobakterilerde hücre duvarının yapısı (Anonim, 2019).

Mikobakterilerde tür ayırımının niasin üretimi, nitrat redüksiyonu, katalaz testi, üre ve pirazinamid hidrolizi, asit fosfataz testi, tween 80 hidrolizi, arilsülfataz testi gibi bazı biyokimyasal testler ile birlikte koloni morfolojisi ve pigment üretimine göre yapılabileceği belirtilmiştir (Ribón, 2012). Mikobakterilerin üreme hızlarına ve oluşturduğu pigmente göre Runyan tarafından dört gruba ayrıldığı bildirilmiştir (Harris ve Barletta, 2001; Sohal ve ark., 2007; Turenne ve Alexander, 2010). Bu klasifikasyona göre yavaş üreyen türler (7 günden fazla) Runyon I-II ve III, hızlı üreyen türler (7 günden az) ise IV grubunda yer almıştır. Runyon I (fotokromojenler) grubunda bulunan mikobakteri türlerinin (*Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium asiaticum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium simiae*) ışık varlığında sarı-turuncu pigment ürettiği, Runyon II (skotokromojenler) grubunda yer alanların (*M. scrofulaceum*, *M. gordonae*) ışıktan bağımsız olarak sarı koloniler oluşturduğu, Runyon III (non-kromojenler) grubunda yer alan *M. avium* subsp. *avium* (Maa), *M. avium* subsp. *hominissuis* (Mah), *Map*, *M. terrae* ve *M. ulcerans* kolonilerinin pigmentsiz, açık sarı veya krem renginde olduğu ve ışığa maruz kaldıklarında koloni

renğinin değışmediğı, Runyon IV (abuk üreyenler) grubunda yer alan mikobakteri türlerinin (*Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium thermoresistibile*) ise pigment oluşturmadığı ifade edilmiştir (Brown-Elliott ve Wallace, 2002; Ribn, 2012; Rogall ve ark., 1990).

İnsanlarda ve hayvanlarda hastalık yapan patojen mikobakteriler temel olarak; *M. tuberculosis* kompleks ve *M. avium* kompleks (MAC) olarak iki gruba ayrılmaktadır. *M. tuberculosis* kompleks grubunda bulunan *M. bovis* subsp. *bovis* ve *M. bovis* subsp. *caprae* ruminantlarda, *M. tuberculosis*, *M. africanum* (subtip I, II) ve *M. canetti* insanlarda, *M. microti* ise hem kemirgen ve hem de insanlarda enfeksiyona yol açmaktadır (Saviola ve Bishai, 2006; Yardımcı, 2006). *M. tuberculosis* kompleks yeleri DNA homolojisi bakımından %95-100 oranında benzerlik göstermektedirler (Ribn, 2012; Rogall ve ark., 1990; Turenne ve Alexander, 2010; Whittington, 2010). MAC grubu *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. chimaera*, *M. arosiense*, *M. colombiense*, ve *M. vulneris*’ten oluşmaktadır (Turenne ve Alexander, 2010). *M. avium*, *Maa*, *Map*, *M. avium* subsp. *silvaticum* (*Mas*) ve *Mah* olmak üzere dört alt tre ayrılmaktadır (Harris ve Barletta, 2001; Möbius ve ark., 2015; Turenne ve Alexander, 2010). *Map*’in *Maa*, *Mas* ve *Mah* türlerinden fenotipik olarak mikobaktin bağımlılığına, genotipik olarak ise yer değıştirebilen bir insersiyon sekansı (IS) olan IS900’e göre ayrılabildiği belirtilmiştir (Harris ve Barletta, 2001). *Map* ile *Maa* ve *Mas* arasında %99 oranında genetik benzerlik bulunmasına rağmen, *Map*’in *in vitro* ortamda mikobaktine ihtiyaç duyması ve daha yavaş üremesi gibi bazı farklı fenotipik özelliklere sahip olduğu açıklanmıştır (Harris ve Barletta, 2001; Turenne ve Alexander, 2010; Whittington, 2010).

Gram-pozitif, asit-fast, küçük (0,5 x 1,5 m) omak şeklinde bir bakteri olan *Map*’in çok yavaş ürediği (Clarke, 1997) ve sıvı kültürdeki generasyon süresinin 1,3-4,4 gün arasında değıştiği bildirilmiştir (Whittington, 2010). Demiri bağlayan ve üreme için gerekli olan mikobaktin J’yi birçok mikobakteri türü üretmesine rağmen, *Map* tarafından üretilmediği açıklanmıştır (Eamens ve ark., 2015; Whittington, 2010). *Map*’in hücre duvarı, lipid yapı bakımından zengindir ve bu sayede *Map* yüksek sıcaklıklara direnç gösterebilmekte ve pastörize edilmiş sütte canlı kalabilmektedir.

Ayrıca, bu yapı bakterinin düşük pH'da veya tuz ve klorid gibi kimyasalların bulunduğu ortamlarda canlı kalabilmesine ve antibiyotiklere karşı direnç göstermesine katkı sağlamaktadır (Rowe ve Grant, 2006). Lipid açısından zengin hücre duvarı, mikobakteriye canlı kalma avantajı sağlasa da, hücre duvarından besin alımının kısıtlanması nedeniyle bakterinin yavaş üremesine sebep olduğu ileri sürülmüştür (Domingue ve Woody, 1997). Yakın zamanda *Map*'in spor benzeri yapı oluşturan yeni bir morfoloji tanımlanmış ve pastörizasyon gibi elverişsiz koşullarda *Map*'in hayatta kalmasında bu yapının etkili olduğu düşünülmüştür (Lamont ve ark., 2012). *Map*'in hücre duvarında lipoarabinomannan (LAM) ve arabinomannan (AM) bulunduğu ve virülens ile ilişkili LAM'ın oldukça immunojenik olduğu açıklanmıştır (Woo ve Czuprynski, 2008). *Map*'in endo ve ekzotoksini bulunmamasına rağmen, bakterinin parçalanması ile açığa çıkan maddelerin toksik özellik gösterdiği belirtilmiştir (Fratti ve ark., 2001; Singh ve ark., 2013a; Woo ve Czuprynski, 2008). *Map* suşları tarafından humoral immun yanıtı uyaran (Woo ve Czuprynski, 2008), hastalığın patogenezisinde önemli rol oynayan (Gumber ve Whittington, 2009; He ve De Buck, 2010; Hughes ve ark., 2007) ve ısı stresi ile ilişkili olarak bakterinin çevrede veya konakçıda canlı kalabilmesini sağlayan (Gumber ve Whittington, 2009) bazı proteinlerin üretildiği de bildirilmiştir.

Tek sirküler sekansa sahip *Map*'in genom büyüklüğünün yaklaşık 5 megabayt, %G+C oranının ise yaklaşık %66-67 olduğu (Harris ve Barletta, 2001; Saviola ve Bishai, 2006) ve %G+C oranı yönünden *Nocardia* sp., *Rhodococcus* sp., *Corynebacterium* sp. gibi aside dirençli bakterilere benzerlik gösterdiği ifade edilmiştir (Saviola ve Bishai, 2006). Referans *Map* K-10 suşu genomunun yaklaşık %1,5 veya %72,2 kilobaytının IS'ları, multigen aileleri ve ekspresyonu değişmeyen temel genler de dâhil olmak üzere tekrarlayan DNA yapısından oluştuğu bildirilmiş (Li ve ark., 2005), bu genlerden bazılarının (F57, *hspX*, ISMav2, ISMpa1, ISMap02, IS900, IS1311) moleküler araştırmalarda hedef bölge olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (Bölske ve Herthnek, 2010; Paustian ve ark., 2010). Karşılaştırılan *Map* genomlarının nükleotid dizilimlerinde farklılıklar belirlenmiş ve bu farklılıkların yer değiştirebilen genetik elementler ile ilişkili olduğu ve yerleştikleri bölgelerde büyük polimorfizmlere yol açtıkları rapor edilmiştir (Paustian ve ark., 2010; Stevenson,

2015). İnsersiyon, delesyon, inversiyon, translokasyon ve duplikasyon şeklindeki polimorfizmlerin izolatların genotip yapılarında önemli değişikliklere neden olduğu belirtilmiştir (Bannantine ve ark., 2012; Stevenson, 2015). *Map*'in K-10 ve S397 suşlarının IS1311, IS900, ISMav2, IS_MAP02, IS_MAP04 ve REP13E12'nin homologları da dâhil toplam 58 kopyadan oluşan 19 farklı IS içerdiği açıklanmıştır (Bannantine ve ark., 2012; Stevenson, 2015). IS'larının genler arasına girerek minimum düzeyde değişikliklere yol açabileceği gibi düzenleyen veya kodlayan gen bölgelerinin de içine girebileceği ve böylece genin işlevini bozabileceği bildirilmiştir (Stevenson, 2015). Nükleotid dizilimlerinde spontan mutasyonlara bağlı değişiklik olabileceği gibi mikroorganizmanın ultraviyole (UV) ışığı gibi çevresel faktörlere maruz kalmasının da mutasyonlara yol açabileceği belirtilmiştir (Stevenson, 2015).

IS900 restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP) ve IS1311 polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon enzim analizi (PZR-REA) kullanılarak *Map* suşları tip 1, tip 2 ve tip 3 olarak sınıflandırılmış ve tip 1 (S, koyun suşu) ve tip 3'ün (*intermediate* suş) koyunları, tip 2'nin ise (C, sığır suşu) sığırları enfekte ettiği açıklanmıştır (Marsh ve ark., 1999; Möbius ve ark., 2015). Bizonlardan izole edilen bir başka *Map* suşu (B tipi) tanımlanmış (Sohal ve ark., 2010; Whittington ve ark., 2001) ve Hindistan'da izole edilen B tipinin ABD'de izole edilenlerden farklı olduğu rapor edilmiştir (Sevilla ve ark., 2005). Tekrarlayan dizilerden S ve C suşlarını ayırt etmek için yararlanılmış olmasına rağmen (Bannantine ve ark., 2012; Stevenson, 2015), IS elementlerinin S veya C tipine spesifik olduğuna dair henüz bir kanıt bulunamadığı (Bannantine ve ark., 2012; Stevenson, 2015) ve IS900'ün kopya sayısının C tipi suşlar arasında bile farklılık gösterdiği (Green ve ark., 1989) rapor edilmiştir. Genotipik farklılıkların yanı sıra, sığır ve koyun tiplerinin pigment özelliği, üreme hızı, demir kullanımı ve sitokinleri indükleyebilme gibi farklı fenotipik özellikleri ile birbirinden ayrılabilmesi ileri sürülmüştür (Janagama ve ark., 2006; Janagama ve ark., 2010; Whittington ve ark., 2011). C tipi suşun S tipi suşa göre daha hızlı ürettiği ve inkübasyondan sonra 6-12 haftada kolonilerin gözlemlendiği, S tipinin ise daha yavaş ürettiği, pigmentli kolonilerin ancak 16 haftadan sonra görüldüğü bildirilmiştir (Juste ve ark., 1991).

2.3. Epidemiyoloji

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*'in sığır, koyun, keçi, bizon, beyaz kuyruklu geyik, Kanada geyiği, alpaka, lama, deve, manda ve dağ keçisi gibi evcil veya yabani ruminantlarda ve tavşan, tilki, maymun, porsuk, çakal, kuş, kedi, rakun gibi ruminant olmayan türlerde hastalığa neden olduğu bildirilmiştir (Arsenault ve ark., 2014; OIE, 2008; OIE, 2018).

Genetik faktörlere bağlı olarak hayvan ırkları arasında hastalığa karşı direncin farklı olabileceği ileri sürülmüştür (Djønne, 2010; Hickey ve ark.; 2003; Kirkpatrick, 2010). Sığır ırkları arasında önemli fark bulunduğu rapor edilmesine rağmen (Kirkpatrick, 2010), genetik yatkınlık henüz tam ortaya konulamamıştır (Clarke, 1997; Wadhwa ve ark., 2013). Hickey ve ark. (2003), 2348 Romney ve 1297 Merinos ırkı koyunun nekropsi kayıtlarını incelemiş ve hastalığın görülme oranının Merinos koyunlarında (%4,78) Romney koyunlarından (%3,49) daha yüksek olduğunu belirtmiştir. Toll-benzeri reseptör (*toll-like receptor*, TLR), büyük doku uyuşum kompleksi (*major histocompatibility complex*, MHC), interlöykin-10R α (IL-10R α), interferon-gamaR2 (IFN- γ R2), IL-12R β 1, IL-12R β 2, IL-23R gibi bazı genlerin genetik direnç/duyarlılık ile ilişkili olabileceği belirtilmiş olmasına rağmen, Jersey ve Holstein ırkı sığırlarda IFN- γ , IL-12, IL-23 genlerinin ekspresyonunda önemli bir fark saptanamamıştır (Mallikarjunappa, 2013). Singh ve ark. (2012) ise Jamunapari keçilerinin MHC-II moleküllerindeki polimorfizmin paratüberküloza karşı direnç ve duyarlılıkla ilişkili olabileceğini belirtmiştir.

Neonatal dönemde veya 6 aydan küçük yaşta olan buzağların paratüberküloza oldukça duyarlı oldukları belirtilmiştir (Windsor ve Whittington, 2010). Enfekte hayvanın kolostrum ve sütünü tüketen veya *Map* içeren dışkı ile bulaşık süt veya yemle beslenen buzağların fekal-oral yolla enfekte olabileceği bildirilmiştir (OIE, 2008; OIE, 2018; Sohal ve ark., 2008; Whittington ve ark., 2004; Whittington ve Windsor, 2009). Antikorlara bağlanarak antikorların Fc reseptörleri vasıtasıyla hücreye girebilen bazı viruslarda olduğu gibi etkenin kolostrumda bulunan *Map*'e spesifik antikorlar aracılığıyla yavruları enfekte edebileceği ileri sürülmüştür (Arsenault ve ark., 2014). Fetus, uterus, plasenta, erkek genital organları, sperma ve hatta dondurulmuş

spermadan *Map*'in izole edilmiş olmasının vertikal bulaşmaya işaret kabul edilebileceği belirtilmiştir (Ayele ve ark., 2004; Maroudam ve ark., 2015; Whittington ve Windsor, 2009). Solunum yolu ile bulaşma Corner ve ark. (2004) tarafından rapor edilmiş ve kurumuş dışkıdan etrafa yayılan toz parçacıkları veya su damlacıkları ile hayvanların etkeni alabilecekleri ileri sürülmüştür (Corner ve ark., 2004; Eisenberg ve ark., 2011). Sorge ve ark. (2013) ise etkeni sığır salyasında tespit etmiştir. Ancak gerek direkt aerosol (Corner ve ark., 2004; Eisenberg ve ark., 2011) ve gerekse salya aracılığıyla bulaşmanın (Sorge ve ark., 2013) başka çalışmalarla da desteklenmesi gerektiği açıklanmıştır.

İlerleyen yaşla birlikte sığırların paratüberküloza karşı dirençli hale geldikleri belirtilmiştir (Arsenault ve ark., 2014; Rankin, 1962). Yeni doğanlarda minimal enfektif dozun yetişkinlere oranla daha düşük olabileceği bildirilmiştir (Djønne, 2010). Genç hayvanlarda düşük rumen pH'sının duyarlılığı arttırabileceği, ruminant olgunlaştıkça rumen pH'sının artması ile birlikte enfeksiyona karşı direnç gelişebileceği belirtilmiştir (Richards, 1989). Bununla birlikte, ergin hayvanların yüksek *Map* yüküne sahip bir çevreyle karşılaştıklarında enfekte olma olasılıklarının bulunduğu da ileri sürülmüştür (Rankin, 1962). Dışkı ile atılım özellikle enfeksiyonun subklinik (10^4 koloni oluşturan birim (kob)/g dışkı) ve klinik (10^{6-8} kob/g dışkı) aşamalarında olmaktadır (White ve ark., 2010; Whitlock ve ark., 2005; Whittington ve ark., 2000). Dışkı ile çevreye yayılan etken dış ortamda uzun süre canlı kalmaktadır (White ve ark., 2010). Nispeten kalın olan hücre duvarı olumsuz çevre koşullarına karşı korunma sağlamakta ve etken toprak veya suda uzun süre üremeden canlı kalabilmektedir (White ve ark., 2010). Ayrıca Lamont ve ark. (2012), *Map*'in spor benzeri yapı oluşturduğunu ve böylece çevrede daha uzun süre canlı kalabildiğini ileri sürmüştür. *Map*'in gübre, toprak ve musluk suyunda sırasıyla 9, 11 ve 17 aya kadar yaşayabildiği (Gay ve Sherman, 1992), kontamine topraktan 12 aya kadar izole edilebildiği (Rowe ve Grant, 2006) ve gölgede 55 haftaya kadar canlı kalabildiği, ancak güneş ışığı ve ısıya maruz kaldıkça canlı kalma süresinin azaldığı (Whittington ve ark., 2004) rapor edilmiştir. Ayrıca, kontamine topraklardaki çimlerden de izole edilmiş ve etkenin toprak yüzeyine tutunma eğiliminde olabileceği düşünülmüştür (Salgado ve ark., 2011; Whittington ve ark., 2004). Bu nedenle toprak yüzeyi ve

meralar duyarlı hayvanlar için rezervuar ve bulaşma kaynağı olarak kabul edilmiştir (Grant, 2010). Diğer taraftan toprak pH'sının da hastalıkla ilişkili olduğu ve özellikle asidik toprağa sahip bölgelerde klinik paratüberküloz prevalansının daha yüksek oranda saptandığı bildirilmiştir (Dhan ve ark., 2009; Richards, 1989).

Serbest yaşayan amiplerde etkenin varlığı bildirilmiş ve su kaynaklı bulaşmada önemli rol oynayabilecekleri ileri sürülmüştür (Grant, 2010; White ve ark., 2010). *Map*'in içme sularında bulunabileceği gibi (Manning ve Collins, 2010a) beton, plastik, galvazinli veya paslanmaz çelik suluklarda biyofilm oluşturabildiği (Cook ve ark., 2010) de açıklanmıştır. Kontamine dışkı ile temas eden ruminant dışındaki hayvanlar ile insektlerin hastalığın yayılmasında vektör olarak görev yapabilecekleri (White ve ark., 2010) ve özellikle yabani tavşanların hastalık etkenini yakın çevredeki çiftliklere taşıyarak hastalığın yayılmasında rol oynayabilecekleri belirtilmiştir (Djønne, 2010). Etken solucan ve böcek larvalarında tespit edilmiş (Whittington ve ark., 2001), böcek ve sineklerin dışkıdan *Map*'i alarak yakın temas ile hayvanlara taşıyabilecekleri açıklanmıştır (Fischer ve ark., 2006).

Ruminant paratüberkülozu ile insanların Crohn hastalığında görülen klinik bulgular ile ince bağırsaklardaki histopatolojik lezyonların büyük oranda benzerlik gösterdiği bildirilmiş (McNees ve ark., 2015; Naser ve ark., 2014) ve Crohn hastalığı olan insanların %50-100'ünden *Map*'in izole edilebileceği veya PZR ile DNA'sının tespit edilebileceği ileri sürülmüştür (Naser ve ark., 2014). Nitekim birçok araştırmacı tarafından Crohn hastalığı olgularından *Map*'in izole edildiği (Chiodini ve ark., 2012; Windsor, 2015) veya moleküler olarak *Map* DNA'sının (Chiodini ve ark., 2012; Green ve ark., 1989; Kanazawa ve ark., 1999; Naser ve ark., 2014) tespit edildiği bildirilerek, *Map*'in Crohn hastalığının etiyolojik ajanı olabileceği varsayılmıştır. Diğer taraftan klinik bulgu gösteren insanlar ile hayvanlardan izole edilen *Map* izolatlarının tüm genom sekansları karşılaştırılmış ve benzer bulunarak enfeksiyonun zoonoz olabileceği ileri sürülmüştür (Wynne ve ark., 2011). Ayrıca enfekte hayvanların dışkılarının yanı sıra sütleri ile de etkeni çıkardıkları tespit edilmiş ve enfekte hayvanlardan elde edilen süt ve bu sütler ile hazırlanan ürünlerin insanlar için potansiyel bir bulaşma kaynağı olabileceği bildirilmiştir (Chiodini ve ark., 2012; Naser ve ark., 2014; OIE, 2008; OIE, 2018; Wynne ve ark., 2011).

Hollanda'da 1805 ve İngiltere'de ise 1829 yılında sığırlarda aşırı zayıflık ile birlikte kronik ishal vakaları rapor edilmiş olmasına rağmen, paratüberkülozun ilk kez 1895 yılında John ve Frothingham tarafından tanımlandığı ve takip eden yıllarda Hollanda, Danimarka, Fransa, Norveç, İngiltere, ABD, Belçika ve İsviçre gibi birçok ülkede tespit edildiği bildirilmiştir (Barkema ve ark., 2010). Enfeksiyonun ruminant popülasyonuna sahip tüm kıtalarda bildirildiği (Nielsen ve Toft, 2009) ve hiçbir ülke veya bölgenin hastalıktan ari olduğuna dair veri bulunmadığı açıklanmıştır (Manning ve Collins, 2010a; Nielsen ve Toft, 2009). Norveç ve İsveç gibi ülkelerde sığırların enfeksiyondan ari olduğu ileri sürülmesine rağmen, her iki ülkede de pozitif vakaların saptandığı belirtilmiştir (Barkema ve ark., 2010). Avrupa ve Kuzey Amerika'daki sığır sürülerinin tahminen %50'sinden fazlasının enfekte olduğu ve bu nedenle paratüberkülozun endemik bir hastalık olarak kabul edilmesi gerektiği ileri sürülmüştür (Nielsen ve Toft, 2009). Hastalığın endemik seyrettiği ülkelere çok sayıda süt ineğinin ihraç edildiği dikkate alındığında, oranlar farklılık gösterse bile her ülkede enfeksiyonunun mevcut olmasının olasılık dahilinde olduğu açıklanmıştır (Barkema ve ark., 2010). 1990'ların başında süt endüstrisinde önemli yere sahip ülkelere sığırlar için sürü düzeyinde prevalans yaklaşık %10 olarak hesaplanmıştır (Barkema ve ark., 2010). Daha sonraki yıllarda Almanya (Böttcher ve Gangl, 2004), Fransa (Nielsen ve Toft, 2009), Belçika (Boelaert ve ark., 2000), Hollanda (Muskens ve ark., 2000), Danimarka (Nielsen ve Toft, 2009), İtalya (Sechi ve ark., 2013), İrlanda (Good ve ark., 2009), İngiltere (Cetinkaya ve ark., 1998), Kanada (Tiwari ve ark., 2009) ve ABD (Wells ve Wagner, 2000) gibi ülkelere prevalansın %17-74 arasında değiştiği rapor edilmiştir. Günümüzde hastalık için öngörülen seroprevalansın dünya çapında %15 ile %78, Avrupa ülkelerinde ise %0 ile %75 arasında değişebileceği ileri sürülmüştür (Fernández-Silva ve ark., 2014; Nielsen ve Toft, 2009). Nielsen ve Toft (2009), *Map* enfeksiyonu için mevcut prevalans çalışmalarında genellikle kullanılan testin sensitivite ve spesifitesi dikkate alınmadığından elde edilen sonuçların görünen prevalans değerlerini verdiğini belirtmiş ve Avrupa ülkelerinde yapılan prevalans çalışmalarını kapsamlı bir şekilde değerlendirerek sığırlarda sürü düzeyinde görünen prevalansın %3 ile %68 arasında değiştiğini hesaplamıştır. Kullanılan testin sensitivite ve spesifitesi dikkate alınarak sığırlarda sürü düzeyinde gerçek prevalansın

araştırıldığı bazı çalışmalarda oranlar ABD için %91 (Lombard ve ark., 2013), Danimarka için ise %70 (Nielsen ve ark., 2000) olarak rapor edilmiştir.

Küçük ruminantlarda paratüberkülozun varlığı; Fas (Benazzi ve ark., 1996), Hindistan (Bhat ve ark., 2018), Türkiye (Buyuk ve ark., 2014; Celik ve Turutoglu, 2017; Hakioglu, 1968), Avustralya, Avusturya, İsviçre, Fransa, Yunanistan, Norveç, Hırvatistan (Djønne, 2010; Nielsen ve Toft, 2009), İspanya (Sevilla ve ark., 2002), Portekiz (Coelho ve ark., 2008b), Slovenya (Ocepek ve ark., 2002), Kanada (Arsenault ve ark., 2003), ABD (Robbe-Austerman ve ark., 2006a,b), Yeni Zelanda (Verdugo 2013) ve Şili (Salgado ve ark., 2007) dâhil olmak üzere birçok ülkede bildirilmiştir. Koyunlarda paratüberkülozun Kuzey ve Güney Amerika, Avustralya, Orta Doğu, Asya, Afrika ve Avrupa ülkelerinde görüldüğü belirtilmiştir (Barkema ve ark., 2010). Koyunlar için yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip tanı testlerinin olmayışı ve koyunun değerine kıyasla hastalık teşhisinin yüksek maliyet gerektirmesi gibi nedenlere bağlı olarak koyunlarda paratüberküloz prevalansı yeterince araştırılmamış ve sığırlarda olduğu gibi dünya genelinde değerlendirilememiştir (Barkema ve ark., 2010). Bununla birlikte, koyunlarda prevalansın ülke veya coğrafik bölgeye göre farklılık göstermekle birlikte %2 ile %32 arasında değişebileceği ifade edilmiştir (Begg ve Whittington, 2010; Nielsen ve Toft, 2009). Sürü prevalansı küçük ruminantlar için Slovenya'da %11,6 (Ocepek ve ark., 2002), Hindistan'ın Keşmir Vadisi'nde %31,5 (Bhat ve ark., 2018) ve Avustralya'da %2,4-%4,4 arasında (Begg ve Whittington, 2010) belirlenmiştir. Ancak Avusturalya'da koyun sürüsünün bulunduğu bölgeye göre prevalansın önemli ölçüde değiştiği ve özellikle Yeni Güney Galler bölgesinde genel olarak %6-10 olmasına rağmen, bazı yerlerde %29-%39'a kadar yükseldiği açıklanmıştır (Begg ve Whittington, 2010). Tahmini bireysel prevalans koyunlarda Kanada'da %3 (Arsenault ve ark., 2003), İspanya'da %8-10 (Sevilla ve ark., 2002), koyun ve keçilerde Slovenya'da %3,5 (Ocepek ve ark., 2002), Latin Amerika ve Karayip ülkelerinde ise %16 (Fernández-Silva ve ark., 2014) olarak belirlenmiştir. Coelho ve ark. (2007, 2008b), Portekiz'de hastalığın tahmini bireysel prevalansını ELISA ve PZR ile araştırdıkları çalışmalarında oranların sırasıyla %6,4 ile %15,4 arasında değiştiğini bildirmiştir. Kullanılan testlerin sensitivite ve spesifitelerini dikkate alan Nielsen ve Toft (2009), sürü düzeyinde prevalansın

İsviçre’de %24, İspanya’da %29 olacağını ileri sürmüştür. Sürü düzeyinde gerçek prevalans oranları Yeni Zelanda’da %75, (Verdugo, 2013), İtalya’da %73,7 (Rita ve ark., 2011), Portekiz’de %46,7 (Coelho ve ark., 2007), Kıbrıs’ta %52 (Liapi ve ark., 2011) ve Kanada’da %66,8 (Bauman ve ark., 2016b) olarak bildirilmiştir. Koyunlarda sürü içi prevalans konusu ayrıntılı olarak incelenmemiş olmakla beraber Güney Amerika’da %2,3 veya altında (Giannitti ve ark., 2018), Kanada’da ise %48 (Bauman ve ark., 2016b) olarak hesaplandığı bildirilmiştir. Sürü içi prevalansın yüksek olduğu sürülerde ölüm oranının yıllık %5-%15 arasında olacağı (Reddacliff ve ark., 2006) ve ölüm oranı %6,2 ile %7,8 arasında olan çiftliklerde ise yaklaşık %6,4-%8,5 oranında yıllık ekonomik kayıp gözleneceği ifade edilmiştir (Bush ve ark., 2006).

Keçilerde yapılan çalışmalarda; paratüberkülozun bireysel prevalansı Şili’de %9,1 ile %14,6 arasında (Kruze ve ark., 2006; Salgado ve ark., 2007), Suudi Arabistan’da %1,11 (Al-Dubaib ve Mahmoud, 2008), Latin Amerika ve Karayip ülkelerinde ise %3,7 (Fernández-Silva ve ark., 2014) olarak bildirilmiştir. Keçilerde sürü prevalansı Hindistan’ın Keşmir Vadisi’nde %35,7 (Bhat ve ark., 2018) olarak belirlenirken, ABD’nin Missouri eyaletinde bireysel, sürü-içi ve sürüler-arası görünen prevalans sırasıyla %1,9; %2 ve %36 olarak saptanmış, hastalığın gerçek prevalansı ise sırasıyla %1,4; %3 ve %54,7 olarak hesaplanmıştır (Pithua ve Kollias, 2012).

Türkiye’de ise paratüberkülozun ilk kez 1928 yılında Sezginer tarafından sığırlarda teşhis edildiği ve 1932 yılında da Akçay ve Erbil tarafından patolojisine yönelik incelemeler yapıldığı belirtilmiştir (Alibaşoğlu ve ark., 1969; Alibaşoğlu ve ark., 1973). Koyunlarda hastalık ilk kez 1968 yılında Hakioğlu (1968), keçilerde ise 1973 yılında Alibaşoğlu ve ark. (1973) tarafından bildirilmiştir. Daha sonraki yıllarda sığır, koyun ve keçilerde hastalığın teşhisi üzerine birçok araştırma yapılmıştır (Alibaşoğlu ve ark., 1973, Atala ve Akçay, 2001; Aydoğan ve ark., 2013; Celik ve Turutoglu, 2017; Cetinkaya ve ark., 2000; Vural ve Atala, 1988). Hastalığın prevalansı üzerine çalışmalar genellikle sığırlara yönelik olarak yapılmış (Atala ve Akçay, 2001; Celik ve Turutoglu, 2017; Cetinkaya ve ark., 2000; Gumussoy ve ark., 2015; İkiz ve ark., 2005; Makav ve Gokce, 2013; Vural ve Atala, 1988; Yıldırım ve Civelek, 2013) ve Türkiye genelinde sığırlarda bireysel prevalansın %2,3 ile %8 arasında değiştiği açıklanmıştır (Atala ve Akçay, 2001; Cetinkaya ve ark., 2000; Makav ve Gokce, 2013;

Ozturk ve ark., 2010; Vural ve Atala, 1988). Atala ve Akçay (2001), Türkiye genelinde sığırlarda paratüberküloz prevalansını %4,6 olarak tespit etmiş olmalarına rağmen, Nielsen ve Toft (2009), 1990-2007 yılları arasında Avrupa’da sığırlar üzerinde yapılmış çalışma sonuçlarını testlerin sensitivitelelerini dikkate alarak değerlendirdiklerinde Türkiye’de gerçek prevalansın %20 olacağını ileri sürmüştür. Sığırlarda hastalığın bireysel ve sürü prevalansı sırasıyla Burdur ilinde %6,2 ve %58,3 (Ozturk ve ark., 2010), Kars ilinde ise %3,5 ve %41,6 (Makav ve Gokce, 2013) olarak açıklanmıştır. Ayrıca sığırlarda prevalans oranları Amasya ve Samsun’da 2012, 2013 ve 2014 yıllarında sırasıyla %2,4; %21,5 ve %50 (Tutuncu ve ark., 2018), Afyon’da %31,8 (Borum ve ark., 2014) ve Manisa’da %21,72 (Berberoğlu ve Civelek, 2016) olarak bildirilmiştir. Serolojik çalışmaların yanı sıra sığırlarda etkenin teşhisine yönelik çalışmalar da yapılmıştır. Elazığ ilinde 500 inek süt örneğinin %3,4’ünde etken izole edilirken, %5’inde PZR ile pozitiflik saptanmış (Cetinkaya ve ark., 2000), Uşak ilinde ise PZR ile 200 gaita örneğinin %20’si, süt örneklerinin ise %17,5’i pozitif olarak tespit edilmiştir (Yıldırım ve Civelek, 2013). Bununla birlikte Batı Anadolu ve Trakya’da sığırlardan alınan gaita ve süt örneklerinde PZR ile etkene spesifik DNA’ya rastlanmadığı rapor edilmiştir (Ikiz ve ark., 2005; Özpınar ve ark., 2015). Koyunlarda ise hastalığın seroprevalansı konusunda sadece iki çalışmaya rastlanmıştır (Buyuk ve ark., 2014; Çelik ve Turutoglu, 2017). Kars ilinde bireysel, sürü-içi ve sürüler-arası görünen prevalans sırasıyla %6,2; %10,2 ve %57,7 olarak saptanmış, hastalığın gerçek prevalansı ise sırasıyla %8,3; %14,6 ve %90 olarak hesaplanmıştır (Buyuk ve ark., 2014). Burdur ilinde ise bireysel, sürü-içi ve sürüler-arası görünen ve gerçek prevalans oranları sırasıyla koyunlarda %48-%100, %48-%100, %100-%100, keçilerde ise %24-%35,9; %25,7-%38,6; %93,3-%100 olarak rapor edilmiştir (Çelik ve Turutoglu, 2017).

2.4. İmmünite ve Patogenez

Ruminantlarda *Map*’in en önemli giriş yolu sindirim kanalı olup, mukozal yüzeylerden bakterinin vücuda girişi enfeksiyonun şekillenmesi için ilk adımdır (Stabel, 2010). Konakçı tarafından sindirim yoluyla alınan etken bağırsak ile ilişkili lenfoid dokuya (gut-associated lymphoid tissue, GALT) yerleşir ve burada makrofajlar tarafından fagosite edilir. *Map* için ilk hedef özel bir epitel hücresi olan M hücreleridir

ve bu hücreler lenfatik sisteme girişte kapı görevi görmektedir (Sohal ve ark., 2008; Stabel, 2010). Ayrıca *Map*'in enterositler aracılığıyla da intestinal mukozaya girdiği ve dentritik hücreler (DC) ile intestinal lümeninden lenf düğümlerine göç ettiği rapor edilmiştir (Stabel, 2010). *Map* basillerinin intestinal epitelyal katmanı geçtikten sonra subepitelyal ve intraepitelyal makrofajlar veya DC'ler tarafından sindirildiği açıklanmıştır (Singh ve ark., 2013a; Stabel, 2010). Endositozda görevli fagositik hücrelerin üzerinde *Map*'in moleküler yapılarını (*pathogen associated molecular patterns*, PAMP) tanıyan reseptörlerin (*pattern-recognition receptors*, PRR) bulunduğu ve *Map*'i bağlamada görevli bu PRR'ler arasında komplement, mannoz, β -integrin, Fc γ , transferrin ve bazı TLR'ler ile sürfaktan proteinleri ve mannoz bağlayan lektinlerin yer aldığı bildirilmiştir (Arsenault ve ark., 2014; Sohal ve ark., 2008).

2.4.1. Doğal Bağışıklık

Mikobakterilerin öldürülmesinde en önemli doğal direnç mekanizmasının makrofaj aktivasyonu olduğu bildirilmiştir (Sohal ve ark., 2008). PRR'lerin PAMP'ları bağlayarak hücrelerarası sinyal yollarını aktive ettiği ve böylece immun sistem hücrelerinin yangıyı uyaran molekülleri salgılamasına yol açtığı açıklanmıştır (Tizard, 2009). Makrofaj aktivasyonunun etken ile makrofaj ve DC'ler üzerinde mevcut olan başta TLR'ler olmak üzere makrofaj yüzey reseptörlerinin birleşmesine bağlı olduğu ileri sürülmüştür (Tizard, 2009). Lipopolisakkaritleri tanıyan TLR'ler tarafından aktive olan monosit ve makrofaj gibi mononükleer fagositler tarafından bakterinin sindirildiği, hücre içinde ise otofaji uyarılarak antimikrobiyal peptidler, reaktif oksijen/nitrojen ara ürünleri aracılığı ile mikroorganizmanın öldürüldüğü açıklanmıştır (Woo ve Czuprynski, 2008). Bununla birlikte hücre içi bir bakteri olan *Map*'in, makrofajlar içinde hayatta kalmak için farklı mekanizmalar kullandığı bildirilmiştir (Arsenault ve ark., 2014; Clarke, 1997; Pieters, 2001; Singh ve ark., 2013a; Sohal ve ark., 2008; Stabel, 2010). *Map*'in konakçı immun sistemi tarafından tanınmasını engellemek için makrofajlarda normal fagozom olgunlaşmasını engellediği ve apoptozisi önleyerek makrofajların mikrobisidal etkisinden kurtulduğu ve böylece bu hücrelerin içinde uzun süre yaşayabildiği bildirilmiştir (Arsenault ve ark., 2014; Clarke, 1997; Pieters, 2001; Singh ve ark., 2013a; Sohal ve ark., 2008; Stabel, 2010). Makrofaj ve fagositik lökositlerde doğal direncin esas mekanizmasını

fagozomun bakterisidal fagolizozoma dönüşmesi oluşturmaktadır (Esen, 2005). *Map*'in fagozom membranını etkileyerek fagozomun olgunlaşmasını ve fagozom lizozom füzyonunu direk olarak engellediği açıklanmıştır (Arsenault ve ark., 2014; Clarke, 1997; Pieters, 2001; Singh ve ark., 2013a; Sohal ve ark., 2008; Stabel, 2010). Ayrıca bakterinin makrofaj içinde canlı kalabilmek için fagozom asitleşmesini engellediği, MHC molekülünün ekspresyonunu azalttığı ve sinyal iletim yollarını etkilediği de rapor edilmiştir (Arsenault ve ark., 2014; Clarke, 1997; Pieters, 2001; Singh ve ark., 2013a; Sohal ve ark., 2008; Stabel, 2010). Alzuherri ve ark. (1997), *Map* ile enfekte koyun makrofajlarının yüzeyinde MHC sınıf II moleküllerinin üretimini azaldığını ve bu sayede *Map*'in hücre içinde yaşayarak enfeksiyonun kalıcı hale geldiğini ileri sürmüştür, daha sonra yapılan çalışmalar (Berger ve Griffin, 2006; Weiss ve ark., 2004) bu görüşü desteklemiştir.

2.4.2. Kazanılmış Bağışıklık

2.4.2.1. Erken Evre

Enfeksiyonun erken evresinde gelişen hücresel immün yanıtın çok önemli olduğu bildirilmiştir (Begg ve ark., 2011; Pieters, 2001; Singh ve ark., 2013a). Bu evrede aktive olan makrofajlar tarafından IL-1, tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ve IL-12 gibi sitokinlerin üretildiği, bu sitokinlerin yanı sıra IL-6, IL-8 ve IL-10 gibi diğer sitokinlerin düzeyinde de artış gözlemlendiği (Coussens ve ark., 2004; Sohal ve ark., 2008; Stabel, 2010; Wadhwa ve ark., 2013; Weiss ve ark., 2004) rapor edilmiştir. Paratüberkülozun erken aşamasında CD4+T hücrelerinin çok önemli rol oynadığı açıklanmıştır (Baquero ve Plattner, 2016; Clarke, 1997; Stabel, 2010; Wadhwa ve ark., 2013). *Map*'in makrofajlar tarafından hücre içine alınıp işlendikten sonra MHC sınıf-II antiijenleri ile makrofaj yüzeyinden sunulması ile birlikte IL-1 düzeyinin arttığı ve üretilen IL-1 aracılığıyla CD4+T hücreleri aktive olarak hücresel immün yanıtın başladığı belirtilmiştir (Baquero ve Plattner, 2016; Clarke, 1997; Sohal ve ark., 2008; Stabel, 2010). Aktive olan T hücreleri de IL-2 üreterek gerek CD4+ yardımcı (Th) ve gerekse CD8+ sitotoksik T (Tc) hücrelerinin klonal çoğalmasına yol açtığı belirtilmiştir (Baquero ve Plattner, 2016; Sohal ve ark., 2008; Stabel, 2010).

Aktive olan makrofajlar tarafından CD4+T hücrelerini enfeksiyon bölgesine toplayan IL-12 ve bazı kemokinlerin salgılandığı, intrasellüler yerleşmiş *Map*'e karşı hücrel immun yanıtı aktive etmede görevli CD4+T hücrelerinin Th1 veya Th2 şeklinde alt tiplerine dönüştüğü, Th1 hücrelerinin aktive olması ile IFN- γ , IL-2 ve TNF- α sentezinin gerçekleştiği bildirilmiştir (Clarke, 1997; Sohal ve ark., 2008; Stabel, 2010). Gerek doğal veya gerekse deneysel enfekte hayvanlarda hastalığın erken veya subklinik evresinde baskın olan IFN- γ 'nın Th1 aracılığıyla gelişen immun yanıtta rol oynayan ana sitokin olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (Coussens ve ark., 2004; Gillan ve ark., 2010; Khalifeh ve Stabel, 2004a; Magombedze ve ark., 2015; Stabel ve Robbe-Austerman, 2011). Sentezlenen IFN- γ 'nın makrofajlara IL-12 salgılanması ve yangısal değişikliklerin gelişmesini teşvik etmek üzere etki ettiği bildirilmiştir (Clarke, 1997; Stabel, 2010). Diğer taraftan B hücrelerinin de CD4+T hücrelerine antijen sunarak daha fazla IFN- γ sentezlenmesini sağladığı belirtilmiştir (Wadhwa ve ark., 2013). IFN- γ 'nın T hücreleri ile makrofajların aktivasyonunun yanı sıra DC matürasyonunda, MHC sınıf I ve II moleküllerinin üretiminde ve makrofajlar tarafından azot ve reaktif oksijenin üretilmesinde önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Arsenault ve ark., 2014; Clarke, 1997; Singh ve ark., 2013a; Sohal ve ark., 2008). Mikobakteriyel enfeksiyonlarda CD4+T hücreleri IFN- γ 'nın birincil kaynağı gibi görülmesine rağmen, CD8+T ve gama-delta T ($\gamma\delta$ T) hücrelerinin de IFN- γ ürettiği bildirilmiş (Baquero ve Plattner, 2016; de Almeida ve ark., 2008; Sohal ve ark., 2008; Wadhwa ve ark., 2013), ancak *Map* antijenlerine karşı $\gamma\delta$ T hücreleri tarafından salgılanan IFN- γ miktarının CD4+T veya CD8+T hücreleri tarafından üretilen miktarlardan daha düşük düzeyde olduğu ileri sürülmüştür (Lybeck ve ark., 2013; Sohal ve ark., 2008; Stabel, 2010; Wadhwa ve ark., 2013). Özellikle 6 aylıktan küçük ruminantlarda baskın olan $\gamma\delta$ T hücrelerinin paratüberkülozun erken aşamasında önemli rol oynadıkları ileri sürülmüştür (Baquero ve Plattner, 2016; de Almeida ve ark., 2008; Plattner ve ark., 2009; Sohal ve ark., 2008; Wadhwa ve ark., 2013). Genç ruminantların gastrointestinal kanalında $\gamma\delta$ T hücrelerinin daha fazla bulunduğu ve bu hücrelerin enterik etkenlerin invazyonuna karşı mukozal bağışıklıkta rol oynayabilecekleri açıklanmıştır (Begg ve Whittington, 2010). Deneysel bir çalışmada (Plattner ve ark., 2009), canlı *Map* içeren inokulum verilen buzağılarda $\gamma\delta$ T hücrelerinin hastalığın erken döneminde enfeksiyon bölgesine göç ettikleri

gösterilmiştir. *Map*'e maruz kalan kuzuların GALT'unda $\gamma\delta$ T hücrelerinde artış saptandığı ve çok sayıda bakteri içeren lezyonların bulunduğu koyunlarda ise CD4+T hücrelerinin sayısı azalırken, $\gamma\delta$ T hücrelerinin aynı sayıda kaldığı açıklanmıştır (Begg ve Whittington, 2010; Clarke, 1997). IFN- γ ile uyarılan makrofajlar tarafından üretilerek vücut sıvılarına salınan bir sitokin olan NP ise hücrel immunitenin bir göstergesi olarak kabul edilmiş ve NP konsantrasyonunun vücut sıvılarındaki IFN- γ varlığını gösterebileceği ileri sürülmüştür (Maroudam ve ark., 2015; Yeğen, 2004). Bununla birlikte *Map* ile enfekte ve enfekte olmayan sığırlarda IFN- γ ve NP düzeyleri arasında bir korelasyon saptanmadığı bildirilmiş ve *Map* enfeksiyonunda NP'nin rolünün açıklanabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğuna işaret edilmiştir (Mikkelsen, 2011).

2.4.2.2. Subklinik Evre

Enfeksiyonun erken evresinde CD4+T hücrelerinin en etkili T hücresi olduğu bildirilmiş olmasına rağmen (Clarke, 1997; Stabel, 2010; Stabel ve Robbe-Austerman, 2011), Stabel ve ark. (2007) enfeksiyonun hem subklinik ve hem de klinik aşamasındaki sığırlarda CD4+ ve CD8+T hücrelerinde eşit oranda bir artış saptadıklarını rapor etmişlerdir. Bununla birlikte, başlangıçta düşük seviyede olan CD8+T hücrelerinin sığırlar enfekte edildikten 18 ay sonra daha aktif hale geldikleri ve enfeksiyonun geç döneminde daha etkin bir rol aldıkları açıklanmıştır (Stabel, 2010).

Paratüberkülozun bilinen en önemli özelliği ince bağırsağın orta ve alt segmentlerinde granülomların oluşmasıdır (Clarke, 1997; Krüger ve ark., 2015; Sing ve ark., 2013; Stabel, 2010). $\gamma\delta$ T hücrelerinin, IFN- γ üretimini arttırarak veya makrofajların lezyon bölgesine toplanmasını sağlayarak granülomların oluşumunda rol oynadığı ve böylece enfeksiyonu sınırlandırdıkları ileri sürülmüştür (Krüger ve ark., 2015; Plattner ve ark., 2009; Sohal ve ark., 2008; Stabel, 2010). Granülomların içinde *Map* içeren makrofaj ve dev hücrelerin bulunduğu ve granülomların etrafının CD8+ ve CD4+T hücreleri tarafından çevrelendiği bildirilmiştir (Lybeck ve ark., 2013; Sohal ve ark., 2008; Wadhwa ve ark., 2013). Bu aşamada $\gamma\delta$ T hücreleri ve CD4+T hücreleri tarafından üretilen TNF- α 'nın en önemli sitokin olduğu açıklanmıştır

(Koets ve ark., 2015; Sohal ve ark., 2008; Wadhwa ve ark., 2013). TNF- α 'nın makrofajları toplayarak enfeksiyonun kontrol altına alınmasına yardımcı olduğu, ancak makrofajlar tarafından üretilen IL-10'un CD4+T hücrelerini baskılayarak IFN- γ üretimini azalttığı ve IFN- γ düzeyinin azalması nedeniyle yeni toplanan makrofajlarda *Map*'in öldürülemediği ve dolayısıyla da makrofajların kalıcı olarak enfekte olma eğiliminde olduğu açıklanmıştır (Arsenault ve ark., 2014; Koets ve ark., 2015; Singh ve ark., 2013a; Sohal ve ark., 2008; Wadhwa ve ark., 2013). Ayrıca yine bu aşamada; sitotoksik T hücre popülasyonundan olan $\gamma\delta$ T hücreleri CD4+T hücre proliferasyonunu baskılayarak, CD8+T hücre proliferasyonunun devam ettiği ve humoral immün yanıtın sınırlı olduğu belirtilmiştir (Sohal ve ark., 2008; Stabel, 2010). $\gamma\delta$ T ve CD4+T hücrelerinden salınan IFN- γ düzeyi de yeterli olmadığından immünglobülin IgG1'in IgG2'ye dönüşmediği ve IgG1 tip yanıtın devam ettiği açıklanmıştır (Sohal ve ark., 2008).

Makrofajlar hücre içinde az sayıda bakteriyi tolere edebilirken, çok sayıda *Map*'in makrofajlar için sitotoksik olması ve apoptozise yol açması nedeniyle etkenin makrofajlarda üremesinin engellenmesi gerektiği ileri sürülmüştür (Begg ve Whittington, 2010). Berger ve Griffin (2006), sığır ve diğer türlere oranla *Map* ile enfekte koyun makrofajlarında apoptozis görülme oranının daha az ve %10'un altında kaldığını rapor etmiştir. TNF- α 'nın apoptozisi oldukça güçlü bir şekilde uyardığı bildirilmiş olmasına rağmen (Singh ve ark., 2013a; Sohal ve ark., 2008), *Map* ile enfekte koyun makrofajlarında TNF- α üretimi ile apoptozis arasında bir ilişkinin gözlenmediği ve apoptozisin şekillenmesinde TNF- α dışında başka faktörlere de ihtiyaç duyulabileceği ileri sürülmüştür (Berger ve Griffin, 2006). Diğer taraftan klinik ve patolojik herhangi bir bulgu göstermeyen, ancak ileum mukozasının son kısmından PZR ile *Map* tespit edilen koyunlarda TNF- α düzeyi oldukça yüksek saptanmıştır (Nalubamba ve ark., 2008; Smeed ve ark., 2007).

2.4.2.3. Klinik Evre

Hücrel immün yanıtın baskılanmasına bağlı olarak enfeksiyonunun klinik aşamaya geçtiği belirtilmiştir (Sohal ve ark., 2008; Stabel, 2010; Wadhwa ve ark., 2013). Klinik bulguların görülmesiyle birlikte immün yanıtın Th1'den Th2 aracılığıyla

gelişen immün yanıtı dönüştüğü gözlenmiştir (Coussens ve ark., 2004; Maroudam ve ark., 2015; Stabel, 2010). Antikor üreten B hücrelerinin arttığı ve bununla orantılı bir şekilde serum antikor düzeylerinin de tespit edilebilir şekilde yükseldiği bildirilmiştir (Stabel, 2010; Wadhwa ve ark., 2013). İmmün yanıtın değişimi ile periferik mononükleer kan hücrelerinde (PBMC), ileum ve ilgili lenf nodüllerinde IL-10, transforme büyüme faktörü-beta (TGF- β), IL-4 gibi anti-enflamatuar sitokinlerin baskın olduğu gözlenmiştir (Coussens ve ark., 2004; de Almeida ve ark., 2008; Khalifeh ve Stabel, 2004a; Magombedze ve ark., 2015; Weiss ve ark., 2005), IL-4 ve IL-10'un CD4+Th1 hücreleri tarafından IFN- γ üretilmesini baskıladıkları belirtilmiştir (Coussens ve ark., 2004; de Almeida ve ark., 2008; Khalifeh ve Stabel, 2004a; Magombedze ve ark., 2015; Stabel, 2010; Weiss ve ark., 2005). Mikobakteriyel enfeksiyonlarda granülom oluşumuna katkı sağlayan IL-4'ün, koruyucu hücreli immün yanıtı etkili olmayan humoral immün yanıtı geçiş sırasında düzeyinin arttığı ve özellikle klinik evrede IgG1 antikorları ile orantılı bir şekilde yükseldiği açıklanmıştır (Stabel, 2010; Wadhwa ve ark., 2013).

Mikobakteriyel enfeksiyonlarda ve özellikle *Map* enfeksiyonu sırasında IL-10'un IL-4'e göre daha önemli bir rol oynadığı bildirilerek, enfekte sığır ve koyunların PBMC'lerinden hazırlanan kültürler ile ileum ve ilgili lenf nodüllerinde IL-10 sentezinin arttığı gözlenmiştir (Coussens ve ark., 2004; Khalifeh ve Stabel, 2004b; Smeed ve ark., 2007). IL-10 üretimindeki artışın CD4+T hücre aktivitesini, IFN- γ , TNF- α , IL-8, IL-12 gibi sitokinler ile MHC sınıf II molekülleri üretiminin baskılandığı tespit edilmiş ve bu immunosupresif aktivitenin *Map*'in hayatta kalma olasılığını arttırdığı ileri sürülmüştür (Khalifeh ve Stabel, 2004a; Khalifeh ve Stabel, 2004b; Weiss ve ark., 2005; Weiss ve Souza, 2008). Subklinik enfekte hayvanlardan toplanan ve *Map* ile uyarılan PBMC kültürlerinde de IL-10 üretiminde artış, buna karşılık IFN- γ düzeyinde azalma gözlenmiştir (de Almeida ve ark., 2008). Diğer taraftan IL-10'un nötralize edilmesini takiben *Map* ile enfekte ve dışarıdan saflaştırılmış Johnin protein derivatı ile uyarılmış PBMC kültürlerinde IFN- γ üretiminde artış gözlemlendiği belirtilmiştir (Magombedze ve ark., 2015). Yapılan çalışmalarda; IL-10'un IL-12 sentezini azaltarak da IFN- γ üretimini baskıladığı (Arsenault ve ark., 2014; de Almeida ve ark., 2008; Weiss ve ark., 2005), makrofaj ile DC'ler tarafından antijen sunulmasını

engellediği (Weiss ve ark., 2005), *Map*'in hayatta kalmasını sağladığı (Khalifeh ve Stabel, 2004a; Khalifeh ve Stabel, 2004b; Weiss ve Souza, 2008) ve enfeksiyonun ilerleyerek klinik aşamaya geçmesine yol açtığı (Magombedze ve ark., 2015) sonuçlarına varılmıştır.

T hücrelerinin bir alt popülasyonu olan ve düzenleyici T hücreleri (regulatory T cells, Treg) olarak bilinen Treg hücrelerinin konakçıda mikobakterilere karşı geliştirecek immun yanıtı baskıladıkları bildirilmiştir (Cope ve ark., 2011; Koets ve ark., 2015; Stabel, 2010; Wadhwa ve ark., 2013). Subklinik aşamada *Map* antijenleri ile uyarılan Treg hücrelerinin immunosupresif sitokinler olan IL-10 ve TGF- β üretimini sağlayarak *Map*'e karşı geliştirecek hücrel yanıtı baskıladıkları ve böylece hastalığın subklinik formdan klinik forma dönüştüğü ifade edilmiştir (de Almeida ve ark., 2008; Stabel, 2010). Nitekim klinik olarak paratüberkülozlu hayvanların ileum, ileo-sekal ve mezenterik lenf düğümlerinde TGF- β ve IL-10'un üretiminde artış gözlenirken, IFN- γ üretiminde azalma saptanmıştır (Khalifeh ve Stabel, 2004b). Benzer değişiklikler *Map* ile enfekte edilmiş PBMC kültürlerine ekzojen olarak TGF- β ve IL-10 ilave edildikten sonra da gözlenmiştir (Khalifeh ve Stabel, 2004a). IFN- γ 'nın ortadan kaldırılması ve TGF- β 'nın aktivasyonu sonucunda Th1 yanıtının Th2 yanıtına dönüştüğü saptanmış, ancak gelişen Th2 yanıtının hücre içi mikobakteriyel enfeksiyonlarda etkisiz olduğu belirtilmiştir (Stabel, 2010).

B hücrelerinin rolü tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen, antikor üretiminin yanı sıra *Map* enfeksiyonunun erken döneminde antijen sunan hücreler olarak görev yaptıkları ve CD4+Th2 hücrelerinin aktivasyonunda görev aldıkları açıklanmıştır (Stabel, 2010). Klinik bulguların görülmesiyle birlikte antikor üreten B hücrelerinin arttığı ve bununla orantılı bir şekilde serum antikor düzeylerinin de tespit edilebilir şekilde yükseldiği ortaya konulmuştur (Clarke, 1997; Stabel, 2010). Paratüberkülozun klinik belirtilerini gösteren ve doğal olarak enfekte olmuş ineklerin, sağlıklı kontrol grubu ve subklinik olarak enfekte hayvanlar ile karşılaştırıldığı bir çalışmada (Waters ve ark., 1999) da klinik olarak enfekte hayvanların B hücre miktarında anlamlı bir artış saptandığı bildirilmiştir. Begg ve Whittington (2010), hasta hayvanlara göre hastalığı atlatabilen koyunlarda B hücre sayısının şaşırtıcı bir

şekilde daha yüksek olduğuna dikkat çekerek, Th2 aracılığıyla gelişen humoral immün yanıtının *Map* enfeksiyonuna karşı korunmada önemli olabileceğini belirtmiştir.

2.5. Klinik Belirtiler

Ruminantlarda paratüberküloz farklı evrelerden oluşmakta ve konakçının patolojik durumlara karşı gösterdiği immün yanıtı bağli olarak bu evreler erken, subklinik ve klinik enfeksiyon evresi olarak sınıflandırılmaktadır (Clarke, 1997; Singh ve ark., 2013a; Wadhwa ve ark., 2013). Hastalığın erken evresi, 2 yaştan küçük ya da düşük konsantrasyonda *Map* basilini sindirim yoluyla alan hayvanlarda görülmektedir (Arsenault ve ark., 2014; Clarke, 1997; Rankin, 1962). Erken ve subklinik evrede enfekte hayvan klinik bulgu göstermeyip sağlıklı görünmektedir (Clarke, 1997; Maroudam ve ark., 2015; Wadhwa ve ark., 2013). *Map* ile enfekte hayvanlarda subklinik evrenin geç dönemi ile klinik dönemde sürekli ishal, halsizlik, kas erimesi ve süt üretiminde azalma gibi klinik belirtiler gözlenmekte ve hastalık en son aşamada ölüme neden olmaktadır (Clarke, 1997; Eamens ve ark., 2015; Maroudam ve ark., 2015; Whittington ve ark., 2017). Aynı zamanda subklinik ve klinik evrede *Map*, dışkı, süt ve kolostrum ile etrafa saçılmaktadır (Clarke, 1997; Manning ve Collins, 2010a; Whittington ve ark., 2017).

Coğrafik bölgede yaygın olan tipe veya diğer hayvan türleri ile birlikte yaşayıp yaşamamasına bağli olarak koyunlarda enfeksiyona neden olan *Map* suşu tipinin değişebileceği (Begg ve Whittington, 2010) ve hastalığa yol açan *Map* tipinin enfeksiyonun şiddeti ile klinik olarak hasta hayvan sayısını etkileyebileceği (Verna ve ark., 2007) ileri sürülmüştür. Birçok ruminant türünde klinik belirtilerin uzun bir subklinik enfeksiyon döneminden sonra geliştiği bildirilmiştir (Eamens ve ark., 2015; Stabel, 2010; Whittington ve ark., 2017). Koyun sürülerinde hastalığın ilk belirtisi olarak hayvanın sürünün gerisinde kaldığı tespit edilmiştir (Clarke, 1997; Eamens ve ark., 2015). Koyunlarda klinik belirtilerin 2 yaşından itibaren ortaya çıkabilen kronik kilo kaybı ile sınırlı olduğu ve çoğu hayvanın 3-5 yaşında hastalığa yenik düştüğü bildirilmiştir (Whitlock ve Buergelt, 1996). İştahın ise hastalığın ileri aşamasında olan hayvanlarda dahi normal olduğu rapor edilmiştir (Whitlock ve Buergelt, 1996). Enfekte sığırlarda başlangıçta aralıklı, fakat sonradan devamlı bir hal alan ishalin

görüldüğü ve genellikle yeşil renkte olan gaitada kan ve mukusun bulunmadığı bildirilmiştir (Begg ve Whittington, 2010; Carrigan ve Seaman, 1990; Clarke, 1997; OIE, 2008). Sığırların aksine, koyunlarda çoğunlukla gaita kıvamının normal olduğu, ishal bulgusunun hastalığın son aşamaları dışında gözlenmediği rapor edilmiştir (Carrigan ve Seaman, 1990; Clarke, 1997). Klinik olarak *Map* ile enfekte 50 koyun üzerinde yürütülen bir çalışmada (Carrigan ve Seaman, 1990), hayvanların yaklaşık %90'ında zayıflama dikkati çekerken, sadece %20'sinde ciddi bir diyarenin gözlemlendiği bildirilmiştir. Bazı çalışmalarda (Nalubamba ve ark., 2008; Smeed ve ark., 2007) ise koyunlar enfekte olmasına karşın hastalığa ilişkin hiçbir klinik belirti gözlenmemiştir. Deneysel enfekte edilen bazı koyunlarda da histolojik bir bulgu saptanmadığı gibi etken izolasyonun da yapılamadığı belirtilmiştir (Begg ve Whittington, 2010). Hastalığın ileri aşamasında olan hayvanların kaşektik olduğu ve bağırsakta meydana gelen fonksiyon kaybı nedeniyle özellikle albümin başta olmak üzere serum proteinlerinin konsantrasyonlarında düşmeye bağlı olarak bazen submandibular ödemin gözlenebileceği bildirilmiştir (Begg ve Whittington, 2010; Clarke, 1997). Ayrıca ileri vakalarda hipoalbüminemi ile birlikte hipokalseminin de saptanabileceği belirtilmiştir (Begg ve Whittington, 2010; Clarke, 1997).

2.6. Patolojik Bulgular

Ruminantlarda paratüberkülozun primer makroskopik lezyonlarının ileum, sekum, kolon, lenf damarları ile lenf düğümlerinde gözlemlendiği belirtilmiştir (Carrigan ve Seaman, 1990; Clarke, 1997; Eamens ve ark., 2015). Enfekte hayvanların çoğunda ciddi lezyonların bulunmadığı, klinik belirtilerin şiddeti ile bağırsakta ortaya çıkan lezyonlar arasında her zaman bir ilişkinin olmadığı bildirilmiştir (Eamens ve ark., 2015). Enfeksiyonun ayırt edici özelliğinin bağırsaktaki granüloamatöz lezyonların olduğu, lezyonların lokal immun yanıtın şiddetine göre değişebileceği ve lezyon içerisinde bulunan hücre tiplerinin enfeksiyonun evresine bağlı olarak farklılık gösterebileceği belirtilmiştir (Stabel, 2010).

Koyunlarda enfeksiyonun ileri dönemlerinde özellikle ileum mukozasının son kısmında kalınlaşma ile birlikte bağırsak duvarında ödem ve mukozada enine çizgilerin görüldüğü bildirilmiştir (Carrigan ve Seaman, 1990; Clarke, 1997; Eamens

ve ark., 2015). Ayrıca koyun, keçi ve geyiklerde bağırsak mukozasında nekrotik odakların tespit edilebileceği de rapor edilmiştir (Brown ve ark., 2007). Mezenteriyal lenf düğümlerinin genellikle büyük ve ödemli olmasının yanında lenf damarlarının kordon şeklinde kalınlaşabileceği açıklanmıştır (Begg ve Whittington, 2010; OIE, 2008; OIE 2018). Koyunlarda nadiren de olsa karaciğer paranzimi boyunca yayılmış mikrogranülomlara rastlanabileceği bildirilmiştir (Carrigan ve Seaman, 1990; Clarke, 1997; Eamens ve ark., 2015). Bazı çalışmalarda (Aydoğan ve ark., 2013; Brown ve ark., 2007; Carrigan and Seaman, 1990), koyun ve keçilerin bağırsak ve mezenteriyal lenf düğümlerinde kazeifikasyon ve kalsifikasyon odaklarının gözlendiği rapor edilmiştir. Bağırsaklarda makrofajlar ile birlikte fokal veya diffuz eozinofil, nötrofil ve lenfosit infiltrasyonları ile bağırsak mukozası ve mezenteriyal lenf düğümlerinin korteksinde multinükleer dev hücrelerinin görülebileceği belirtilmiştir (Carrigan ve Seaman, 1990; Clarke, 1997; Eamens ve ark., 2015). Subklinik evredeki koyunların jejunal Peyer plakları, ileo-sekal valf ve mezenterik lenf düğümlerinde lezyonlara rastlandığı, ince bağırsağın özellikle ileal duvarının lenf düğümlerinden daha fazla etkilendiği bildirilmiş (Dennis ve ark., 2011; Marquetoux ve ark., 2018) ve bağırsak mukozasının mezenterik lenf düğümlerinden daha fazla sayıda etken bulundurduğu açıklanmıştır (Clarke, 1997; Dennis ve ark., 2011). Bu nedenle enfeksiyonun aktif döneminde ve özellikle erken evrelerinde mezenterik lenf düğümlerinden ziyade ileum ve jejunumun histopatolojik muayenesi ile paratüberkülozun daha iyi tespit edilebileceği ileri sürülmüştür (Begg ve ark., 2010; Marquetoux ve ark., 2018). Bazen lamina propria'da makrofaj ve lenfositler ile birlikte az sayıda *Map*'ten oluşan bölgesel yığınlar şekillenebileceği bildirilmiştir (Carrigan ve Seaman, 1990; Clarke, 1997; Eamens ve ark., 2015). Bu tip granümatöz yangısal reaksiyonlar '*paucibasiller*' veya '*tüberküloid*' olarak tanımlanırken, intestinal mukoza ve submukozada çok sayıda *Map* içeren makrofajların bulunması '*multibasiller*' veya '*lepromatous*' olarak adlandırılmıştır (Clarke, 1997; Eamens ve ark., 2015). *Paucibasiller* lezyonlara sahip olanlara kıyasla *multibasiller* lezyonlara sahip koyunların gaita ile etkeni çıkarma olasılıklarının daha yüksek olduğu belirtilmiş (Begg ve Whittington, 2010) ve günde bir gram gaita ile ortalama 10^8 veya 10^{10} sayıda bakteriyi dışarı çıkarabilecekleri ileri sürülmüştür (Begg ve Whittington, 2010; Whittington ve ark., 2000).

Koyunlarda *paucibasiller* veya *multibasiller* lezyon oluşumunun baskın olan immun yanıt ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Clarke, 1997). Dışkı, süt veya doku gibi örneklerde az sayıda etken bulunduran paratüberkülozlu hayvanlarda Th1, çok miktarda bulunduranlarda ise Th2 tip yanıtın daha ağırlıkta olduğu bildirilmiştir (Begg ve Whittington, 2010; Clarke, 1997; Gillan ve ark., 2010). *Paucibasiller* lezyonları olan hayvanların intestinal dokularında yüksek düzeyde IFN- γ ile IL-2 gibi yardımcı (helper) T-1 hücresi (Th1) yanıtı ile ilişkili sitokinlerin üretildiği (Begg ve Whittington, 2010; Clarke, 1997; Smeed ve ark., 2007), lezyonların bulunduğu alanda ve özellikle ince bağırsaklarda CD4+ ile $\gamma\delta$ T hücrelerinin sayısının arttığı ve bu durumun hücrel immun yanıtın aktif olması ile ilişkili olduğu (Clarke, 1997; Baquero ve Plattner, 2016; Plattner ve ark., 2009; Sohal ve ark., 2008; Wadhwa ve ark., 2013) ileri sürülmüştür. Krüger ve ark. (2015), deneysel enfekte edilen oğlakların 3 ay sonra GALT ve bağırsak mukozasında yaygın granülomatöz lezyonlar ile birlikte çok sayıda CD4+ ve $\gamma\delta$ T lenfositleri saptadıkları halde sadece tek bir *Map* tespit ettiklerini bildirmiş ve güçlü bir hücrel yanıtın enfeksiyonu kontrol altına alabileceğine dikkat çekmiştir. *Paucibasiller* lezyona sahip koyunların kan ve bağırsaklarında lenfoproliferatif yanıtlara rastlanabileceği (Kurade ve Tripathi, 2008), hücrel immun yanıtın mezenteriyal lenf düğümleri boyunca farklı olabileceği, en düşük seviyedeki yanıtın ise bağırsağın lamina propriasında tespit edilebileceği bildirilmiştir (Begg ve ark., 2005; Begg ve Whittington, 2010). *Paucibasiller* lezyonların aksine *multibasiller* lezyonlarda daha fazla sayıda makrofajın bulunduğu ve bu lezyonlara sahip koyunlarda lenfosit proliferasyonu belirgin şekilde azalmış iken Th2 hücreleri aracılığıyla gelişen güçlü bir humoral yanıtın şekillendiği açıklanmıştır (Kurade ve Tripathi, 2008). Lezyonlarda bulunan CD4+T hücre sayısının azaldığı (Begg ve Whittington, 2010), CD4+T hücrelerinin azalması sonucu Th1 aracılığıyla gelişen hücrel immun yanıt ve makrofaj aktivasyonunun engellendiği, Th2 yani antikor yanıtının şekillenmesine bağlı olarak makrofajlar tarafından bakteri opsonizasyonunun arttığı ve böylece *Map*'in makrofajlar içinde canlı kalarak çoğaldıkları ileri sürülmüştür (Begg ve Whittington, 2010; Cope ve ark., 2011; Magombedze ve ark., 2015). *Multibasiller* lezyonlarda IL-10, IL-6, IL-8, IL-18, TGF- β 1 ve TNF- α gibi sitokinlerin arttığı (Coussens ve ark., 2004; Smeed ve ark., 2007; Wadhwa ve ark., 2013), IL-2 ve IFN- γ 'nın azaldığı (Clarke, 1997; Smeed ve ark.,

2007) ve sığırların aksine koyunlarda IL-1 α üretiminin artmadığı (Smeed ve ark., 2007) rapor edilmiştir. Bununla birlikte Begg ve ark. (2011), deneysel olarak enfekte edilen koyunların %50'sinde enfeksiyonun erken aşamasında IFN- γ ve antijene spesifik antikor yanıtının birlikte olduğunu, %39'unda immün yanıtın güçlü IFN- γ yanıtından antikor yanıtına dönüştüğünü, %16'sında ise antikor yanıtının engellediğini saptamışlar ve koyunlarda her zaman Th1 yanıtının Th2 yanıtına dönüşmediğini ileri sürmüşlerdir.

Verna ve ark. (2007), koyunlarda farklı *Map* suşları ile hastalığın patolojisi arasındaki ilişkiyi araştırarak, sığır ve koyun tiplerinin farklı patolojik sonuçlara yol açtığını ve koyun tipinin sığır tipine göre daha şiddetli lezyonların oluşmasına sebep olduğunu belirtmiştir. Sığır izolatlarının genellikle mezenterik lenf düğümlerinde fokal fibröz lezyonlara yol açtığını, granülom sayısının daha fazla olduğunu ve granülomlarda nekroz ile birlikte çok sayıda Langhans dev hücresinin bulunduğunu, koyun tipinin ise daha şiddetli ve özellikle intestinal lenfoid dokuda lezyonlara sebep olduğunu, ancak lezyonlarda nekroz yanı sıra dev hücrelere de rastlanmadığını belirtmişlerdir (Verna ve ark., 2007). Verna ve ark. (2007) ile birlikte Stevenson (2015), lezyonlarda dev hücre görülmesinin hayvan türüne değil *Map* tipine bağlı olduğuna ve koyun suşlarından ileri gelen enfeksiyonların karakteristik bir özelliği olmadığına dikkat çekmişlerdir.

2.7. Tanı Yöntemleri

Paratüberkülozun teşhisinde kullanılan tanı yöntemleri, genel olarak direk ve indirek yöntemler olmak üzere iki kategoriye ayrılmaktadır. Nekropsi, histopatoloji, bakteriyoskopi, kültür ve PZR direk, humoral ve hücrel immün yanıt ölçen testler ise indirek tanı yöntemleri içerisinde yer almaktadır (Eamens ve ark., 2015). Ancak kompleks bir patobiyolojiye sahip olan hastalığın gerek yavaş seyirli olması ve gerekse farklı evrelerinde gelişen immün yanıtın farklı olması nedeniyle kullanılan testlerden hiçbirinin %100 sensitivite veya spesifiteye sahip olmadığı ve bu nedenle enfeksiyonun her aşamasında hastalığı tespit edebilen bir yöntemin bulunmadığı ileri sürülmüştür (OIE, 2008; OIE, 2018). Enfeksiyonun teşhisinde kullanılan yöntemlerin hastalığın evresine göre sensitivite ve spesifiteleri tablo 2.1'de verildi (Whittington ve

ark., 2017). Klinik bulgu gösteren hayvanlarda; bağırsaklardaki patognomonik lezyonlardan hazırlanan preparatlarda yoğun AFB'lerin görülmesi, nekropsi ve histopatolojik bulgular ile gaita ve doku örneklerinde kültür veya PZR ile etkenin tespit edilmesi veya serolojik testler ile teşhis konulabileceği belirtilmiştir (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; OIE, 2018). Subklinik enfekte hayvanların ise *Map*'e karşı gelişen spesifik antikorların saptanması, gaita ve doku örneklerinde *Map*'in kültür veya PZR ile tespiti veya hücrel immun yanıt düzeyinin ölçülmesi ile saptanabileceği rapor edilmiştir (Begg ve Whittington, 2010; OIE, 2008; OIE, 2018).

Tablo 2.1. Paratüberküloz teşhisinde kullanılan yöntemlerin hastalığın evresine göre sensitivite ve spesifite (Whittington ve ark., 2017).

Testler	Hastalığın evresi	Sensitivite	Spesifite
Serum ELISA	Subklinik, Klinik	Düşük- Yüksek ^a	Orta- Yüksek
Alerjik deri testi	Erken, Subklinik	Orta- Yüksek	Orta
Interferon gama testi	Erken, Subklinik	Bilinmiyor	Bilinmiyor
Gaitadan froti	Subklinik, Klinik	Düşük	Düşük-Orta
Gaita kültürü	Erken, Subklinik, Klinik	Düşük-Yüksek ^a	Yüksek
Gaitadan PZR	Erken, Subklinik, Klinik	Orta-Yüksek	Yüksek
Dokuların kültürü	Erken, Subklinik, Klinik	Yüksek	Yüksek
Makroskopik bulgu	Klinik	Düşük-Orta	Düşük-Orta
Histopatoloji	Subklinik, Klinik	Orta-Yüksek	Yüksek
Klinik bulgu	Klinik	Düşük-Orta	Düşük-Orta

Sensitivite için kullanılan düşük, orta ve yüksek tanımları sırasıyla %40, %40-70 ve >%70; spesifite için karşılık gelen değerler sırasıyla ise <%80, %80-95 ve >%95'i ifade etmektedir. a: hastalığın klinik evresinde yüksek.

2.7.1. Direk Tanı Yöntemleri

2.7.1.1. Nekropsi ve Histopatoloji

Paratüberkülozda, bağırsağın ve özellikle ileum mukozasının son kısmının kalınlaşarak kıvrımlı bir hal almasının patognomonik bir bulgu olduğu ve ayrıca mezenteriyal lenf düğümlerinin genellikle büyük ve ödemli olmasının yanında lenf damarlarında kordon şeklinde bir kalınlaşmanın görülebileceği belirtilmiştir (Clarke, 1997; Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; OIE, 2018). Bununla birlikte paratüberküloz şüpheli hayvanlarda klinik bulguların şiddeti ile bağırsakta gözlenen lezyonlar arasında her zaman yakın bir ilişki olmadığı açıklanmıştır (Clarke, 1997; Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; OIE, 2018). Histopatolojik lezyonlar ise bağırsak mukoza ve

submukozası ile lenfatikler ve mezenteriyel lenf düğümlerinin korteksinde epitelooid hücreler olarak adlandırılan granüler sitoplazmaya sahip büyük makrofajların kümeleşmesi ile karakterizedir (Clarke, 1997; Eamens ve ark., 2015). *Map* enfeksiyonu ile uyumlu histopatolojik lezyonlarda, bir veya daha fazla dev hücrenin ve/veya epitelooid makrofajın bulunması ile birlikte bağırsağın lamina propria ve/veya lenf düğümünün korteksinde morfolojik olarak *Map* ile uyumlu en az bir AFB'nin gözlenmesi durumunda hastalığın teşhis edilebileceği bildirilmiştir (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; OIE, 2018). Bununla birlikte AFB'lerin her zaman tespit edilemeyeceği ve bu nedenle lamina propria ve/veya lenf düğümünün korteksinde Langhans dev hücreleri ve/veya epitelooid makrofajların gözlenmesinin enfeksiyonu düşündürülen bir bulgu olduğu ileri sürülmüştür (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; OIE, 2018).

Martinson ve ark. (2008), bakteriyolojik kültür ile pozitif saptanan sığırların 78 ileum örneği ile 106 lenf düğümünden hazırlanan kesitlerin ZN boyama ile sırasıyla 7'sinde (%8,97) ve 6'sında (%5,61) AFB'leri gözlediklerini, aynı dokuların immunoperoksidaz boyamasında ise sırasıyla 9'unda (%11,54) ve 5'inde (%4,67) pozitiflik saptadıklarını açıklamışlardır. Aynı araştırmacılar (Martinson ve ark., 2008), ZN ve immunohistokimyasal boyama arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadığına ve her iki testin de bakteriyel kültüre oranla sensitivitesinin (%6) oldukça düşük olduğuna dikkat çekmişlerdir. Koyunlarda yapılan bir çalışmada (Sonawane ve Tripathi, 2018) ise kültür ve PZR ile *Map*'in tespit edildiği ileum ve mezenteriyel lenf yumruları ZN boyama ve indirekt immunoperoksidaz tekniği ile incelenmiş ve immunoperoksidaz tekniğinin sensitivitesi (%95) ZN boyamadan (%80) daha yüksek tespit edilmiştir.

2.7.1.2. Bakteriyoskopi

Klinik olgularda gaita veya doku örneklerinden hazırlanan preparatlar ZN boyama yöntemi ile boyanarak AFB'ler yönünden incelenmektedir (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; OIE, 2018). Bu yöntemde AFB'ler küçük (0,5-1,5 µm), kümeler halinde ve kırmızı renkte boyanırken diğer mikroorganizmalar ve organik materyaller kullanılan boyaya göre yeşil veya mavi renkte boyanmaktadır (Eamens ve ark., 2015;

OIE, 2008; OIE, 2018). Basit, hızlı ve ucuz bir teşhis metodu olmasına rağmen, ZN boyama ile *Map* 'in diğer mikobakteri türlerinden ayırımının yapılamaması, sensitivite ve spesifitesinin de oldukça düşük olması nedeniyle yanlış negatif sonuçlar verebileceği rapor edilmiştir (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; Ris ve ark., 1988; Thoresen ve ark., 1994; Weber ve ark., 2009; Zimmer ve ark., 1999). Ris ve ark. (1988), bakteriyolojik kültür yöntemi ile pozitif olarak belirlenen 177 sığıra ait gaita örneğinin sadece 99 (%56)'unda ZN boyama ile AFB'leri tespit edebildiklerini ve bu nedenle ZN boyamanın güvenilir bir yöntem olmadığını belirtmiştir. Zimmer ve ark. (1999), klinik olarak enfekte sığırlardan alınan gaita örneklerinin %49,3'ünde ve subklinik olarak enfekte sığırların gaita örneklerinin ise sadece %19,3'ünde AFB'lerin görüldüğünü ve yöntemin sensitivitesinin %36,4 olarak tespit edildiğini bildirmiştir. Klinik olarak paratüberküloz şüphesi olan sığırlarda ZN boyama ve ELISA yöntemlerinin karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada (Weber ve ark., 2009), ZN boyamanın sensitivite ve spesifitesinin ELISA testine göre çok daha düşük olduğu ve paratüberkülozun tanısında ZN boyama yöntemi yerine ELISA'nın tercih edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Klinik bulgu gösteren ve paratüberküloz olduğu serolojik, histolojik ve mikrobiyolojik olarak doğrulanan 26 koyundan alınan gaita ve doku örneklerinden hazırlanan ve ZN boyama yöntemi ile boyanan preparatlar incelenmiş ve yöntemin sensitivitesi gaitadan hazırlanan preparatlarda %61,5, doku örneklerinde ise %76,9 olarak hesaplanmıştır (Coelho ve ark., 2008a). Keçilerde yapılan bir çalışmada (Thoresen ve ark., 1994) ise 47 ileum ve mezenteriyal lenf düğümü örneğinden 18'i immunohistokimyasal olarak pozitif bulunurken, ZN boyamada 15, kültürde ise 10 örneğin pozitif olduğu bildirilmiştir. ZN boyama yönteminde tespit edilebilir bakteri limitinin 10^6 bakteri/g doku olduğu ve sadece zarar görmemiş hücrelerin boyandığı, immunohistokimyasal yöntemlerde ise mikroorganizma sayısı az olsa dahi ölü veya kısmen parçalanmış hücrelerdeki antijenlerin de tespit edilebildiği ve bu nedenle ZN boyamadan daha güvenilir olduğu sonucuna varılmıştır (Thoresen ve ark., 1994).

2.7.1.3. Bakteriyolojik Kültür

Bakteriyolojik kültür, teknik olarak zor ve zaman alıcı bir işlem olmasına rağmen, spesifitesinin %100 olduğu ve hastalığın bireysel veya sürü düzeyinde

tanısında altın standart olarak kabul edildiği belirtilmiştir (Begg ve Whittington, 2010; OIE, 2008; OIE, 2018). Canlı hayvanlarda paratüberkülozun tanısı için gaita kültürünün yapılması gerektiği ileri sürülmüş ve gaita kültürü ile hastalığın ileri aşamalarında bulunan hayvanlar tespit edilebilirken, erken aşamadaki hayvanlardan çok azının belirlenebileceği belirtilmiştir (Whitlock ve ark., 2000). Gaita kültürünün klinik aşamada sensitivitesinin %100 olduğu bildirilmiş, ancak klinik bulgular gözlenmeden 6 ay veya daha öncesinde de kültür ile enfekte hayvanların saptanabileceği de açıklanmıştır (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; OIE, 2018). Kültür yöntemi ile bireysel olarak enfekte hayvanlar belirlenebileceği gibi birden fazla hayvandan alınan gaita veya çevreden toplanan örneklerin birleştirilmesi ile sürü düzeyinde tarama yapılabileceği ve böylece maliyetin azaltılabileceği ileri sürülmüştür (Eamens ve ark., 2015; Whittington, 2010). Koyunlarda bu yöntem için 50 hayvanlık bir sayı belirlenmiş ve sürü düzeyinde yapılan serolojik incelemeyle karşılaştırıldığında sensitivitesinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (Eamens ve ark., 2015; Whittington, 2010). Sığır ve keçilerde yapılan çalışmalarda da benzer şekilde olumlu sonuçlar alınmış, koyunların aksine sığırlarda 5, keçilerde ise 25 hayvandan alınan örneğin sürü taramaları için yeterli olabileceği bildirilmiştir (Eamens ve ark., 2015; Whittington, 2010).

Gaita yerine enfekte dokulardan yapılan kültürün sığır, koyun ve keçilerde histopatolojik incelemeden daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir (Eamens ve ark., 2015; Martinson ve ark., 2008; OIE, 2008; OIE, 2018; Whittington ve ark., 1999a). Koyunlarda ise bağırsak dokularından yapılan kültürün hastalığın teşhisinde altın standart olduğu ileri sürülmüştür (Begg ve Whittington, 2010). Ancak kültür işlemlerinde; seçilen izolasyon yöntemi, örneklerin kontaminasyon oranı, testin maliyeti ve izolasyon süresinden kaynaklanan birçok sorunla karşılaşmaktadır (Whittington, 2010). Kültür yönteminin altın standart olarak kabul edilmesinden dolayı paratüberkülozun teşhisinde kullanılan diğer tanısal testlerin (PZR, serolojik testler ve histopatoloji gibi) sensitivite ve spesifitesi konusunda hala belirsizliklerin olduğu bildirilmiştir (Whittington, 2010). Diğer taraftan, paratüberkülozun erken evresinde ELISA veya gaitadan yapılan PZR işlemlerinde kültür yöntemine göre daha fazla sayıda hayvanın pozitif tespit edilmesinin, doğru olmayan bir kültür

protokolünün kullanılmasından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (Whittington, 2010). Klinik olarak paratüberküloz şüphesi olan 30 koyundan 21 (%70)'inin bağırsak ve ilişkili dokularında histopatolojik lezyonların gözlemlendiği, 2 (%6,7)'sinin gaita ve 6 (%20)'sinin bağırsak dokularından yapılan kültürde pozitif saptandığı, PZR ile 24 hayvanın gaita veya dokularında *Map*'in tespit edildiği bildirilmiştir (Coelho ve ark., 2017). Aynı şekilde paratüberküloz şüpheli 14 bizondan toplanan gaita ve bağırsak doku örneklerinden yapılan kültür sonucu 5 gaita ve 12 doku örneğinden izolasyon yapılmış olmasına rağmen, PZR ile tüm hayvanlarda *Map*'in tespit edildiği rapor edilmiştir (Huntley ve ark., 2005).

Kültür yönteminde; klinik örneklerde çok sayıda kontaminant bulunması nedeniyle bunları öldürmek veya baskılamak için örneklerin dekontaminasyon işlemine tabi tutulması, dekontaminasyon sonrasında kalan kontaminant mikroorganizmaları baskılamak için antimikrobiyal maddeler içeren uygun besiyerlerine ekim yapılması, katı besiyerinde *Map* kolonilerinin belirlenmesi veya sıvı ortamda *Map*'in ürettiğine dair bir bulgunun gözlenmesi ve *Map*'in fenotipik ve/veya genotipik olarak identifikasyonu olmak üzere 4 önemli aşama olduğu bildirilmiştir (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; Payeur, 2005; Whittington, 2010). *Map*'i klinik örneklerden izole etmeye yönelik ilk denemelerde, tüberküloz için mevcut dekontaminasyon yöntemlerinin kullanıldığı belirtilmiştir (Whittington, 2010). İlk çalışmalarda dekontaminasyon amacıyla sodyum hipokloritin yaygın olarak kullanıldığı, zamanla sodyum hidroksit (NaOH), sülfürik asit, hidroklorik asit, fenol, benzalkonyum klorür (BAC) ve oksalik asit (OA) ile denemeler yapıldığı bildirilmiştir (Whipple ve ark., 1991; Whittington, 2010). 1980 yılında Kuzey Avrupa'da NaOH ve OA'ten oluşan bir kombinasyonun dekontaminasyon protokolü olarak kabul edildiği ve Lowenstein Jensen (LJ) besiyeri ile birlikte kullanıldığı bildirilmiştir (Whipple ve ark., 1991; Whittington, 2010). İlk kez ABD'de kullanılan bir katyonik kuaterner amonyum bileşiği olan hegzadesilpiridinyum klorür (HPC) ise günümüzde BAC'nin yerini almış ve Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya da dâhil olmak üzere birçok ülkede mevcut protokollerin temelini oluşturmuştur (Whipple ve ark., 1991; Whittington, 2010). HPC ile dekontaminasyon metodunun Herrold's egg yolk medium (HEYM) gibi katı besiyeri veya sıvı kültürler ile birlikte kullanıldığı rapor edilmiştir

(Whipple ve ark., 1991; Whittington, 2010). Aside dirençli bakterilerin saptandığı 20 sığra ait gaita ve doku örnekleri hem NaOH-OA ve hem de HPC ile dekontamine edildikten sonra LJ besiyerine inoküle edilmiş ve sensitivite dekontaminantlara bağlı olarak sırasıyla %70 ve %85 olarak tespit edilmiştir (Collins ve ark., 1990b). En çok kullanılan iki katı besiyeri olan HEYM ve LJ'nin karşılaştırıldığı bir çalışmada (Nielsen ve ark., 2004) ise sadece NaOH-OA ile dekontaminasyon protokolü kullanılmış ve HEYM besiyerinin daha duyarlı olduğu ortaya konulmuştur.

Uygulanan çeşitli dekontaminasyon protokollerinde malaşit yeşili gibi antimikrobiyal boyalar ve/veya bir veya daha fazla sayıda antibiyotik dekontaminasyon solüsyonlarına dahil edildiği rapor edilmiştir (Nielsen ve ark., 2004; Payeur, 2005; Whipple ve ark., 1991; Whittington, 2010). Ancak, vejetatif büyüme evresinde olmayan sporlu kontaminant mikroorganizmaların inaktive edilememesi nedeniyle sporların aktif hale geçtikten sonra öldürülmesini sağlamak amacıyla fekal süspansiyonun antimikrobiyal solüsyonlarla da inkübe edilmesi gerektiği rapor edilmiştir (Eamens ve ark., 2000; Eamens ve ark., 2015; Gumber ve Whittington, 2007; Nielsen ve ark., 2004; Whittington, 2010). Gaita örneklerinde daha yaygın olarak önce HPC ve sonra antimikrobiyal maddeleri içeren yarı-kuvvetli brain-heart infüzyon (BHI) brothun kullanıldığı iki aşamalı bir dekontaminasyon yöntemin uygulandığı bildirilmiş (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; OIE, 2018; Stabel, 1997; Whittington, 2010) ve iki aşamalı inkübasyon şeklinde yapılan dekontaminasyon işleminin kültür duyarlılığını arttırdığı ileri sürülmüştür (Eamens ve ark., 2000; Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; Stabel, 1997; Whittington, 2010). Bu yöntemin süt örneklerinin dekontaminasyonu için de kullanıldığı belirtilmiştir (Eamens ve ark., 2015; Whittington, 2010). Bazı araştırmacılar (Dundee, 2001; Gao, 2005; Sweeney, 1992), tek adımlı sedimentasyon protokolünde %0,75 HPC ile muamelenin süt örneklerinde kontaminasyonu en aza indirmek için uygun olduğunu ve *Map*'e çift adımlı inkübasyondan daha az zarar verdiğini ileri sürmüşlerdir. Aynı yöntemle enfekte hayvanların bağırsak dokularından kolaylıkla *Map*'in izole edildiği (Eamens ve ark., 2015; Whittington, 2010) ve doku örneklerinde kontaminasyon oranının daha düşük olması nedeniyle sadece bir dekontaminasyon aşamasını içeren bir protokolle dahi izolasyon şansının yüksek olabileceği bildirilmiştir (Whittington, 2009;

Whittington, 2010; Whittington ve ark., 1999a). Kan kültürünün rutin olarak yapılmadığı bildirilmekle birlikte (Whittington, 2010), keçilerden alınan kan plazması örnekleri %0,75 HPC ile dekontamine edildikten sonra HEYM besiyerine ekilmiş ve örneklerin %28.6'ından etken izole edilebilmiştir (Singh ve ark., 2010).

Bakteriyolojik kültür için katı ve sıvı besiyerlerinden yararlanılmasına rağmen, katı besiyerlerinin, daha ucuz olması, daha az malzeme gerektirmesi ve kültürde *Map*'in tanımlanmasının daha kolay olması nedeniyle sıvı besiyerlerine göre daha yaygın kullanılmaktadır (Whittington, 2010). Katı besiyerinde *Map*'in primer kolonilerinin inokülasyondan 5 hafta ile 6 ay sonra gözlenebildiği rapor edilmiştir (Eamens ve ark., 2015). Çiftlik hayvanları için katı kültür ortamlarında standart inkübasyon süresinin 12-20 hafta olduğu belirtilmiş (Eamens ve ark., 2015; Stabel, 1997; Whittington, 2010), ancak pigmentsiz koyun suşlarının sığır suşlarına göre daha zor ürettiği ve gözle görünür bir üremenin 12 ay veya daha uzun sürede saptanabileceği bildirilmiştir (Juste ve ark., 1991; Payeur, 2005). Bu nedenle kültürlerin bu sürelerle riayet edilmeden negatif olarak değerlendirilmemesi gerektiği bildirilmiştir (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; Stabel, 1997; Whittington, 2010; Whittington ve ark., 1999a). Sıvı ortamda ise büyümenin daha hızlı olduğu ve inkübasyon için genellikle 8-12 haftanın yeterli olabileceği rapor edilmiştir (Eamens ve ark., 2015; Whittington, 2010).

Mikobakteriler üzerinde çalışan araştırmacıların kültür ortamlarını ve özellikle Dubos gibi yumurta temelli besiyerlerini geliştirmeye yoğunlaştıkları rapor edilmiştir (Eamens ve ark., 2015; Whipple ve ark., 1991; Whittington, 2010). Günümüzde bazı Avrupa ülkelerinde kullanılan LJ ile diğer birçok ülkede kullanılan HEYM besiyerinin *Map* izolasyonu için en uygun besiyerleri olduğu ileri sürülmüştür (Whittington, 2010). Middlebrook 7H10 veya 7H11 agar ile 7H9 broth'un da uygun ortamlar olduğu ancak, *Map*'in üreyebilmesi için yumurta sarısının besiyerlerine eklenmesi gerektiği bildirilmiştir (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; Whittington, 2010). Böylece yumurta sarısının, inokulumla kültür ortamına taşınan dezenfektanların nötrleştirilmesinde rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Eamens ve ark., 2015; Whipple ve ark., 1991; Whittington, 2010). Yumurta sarısının yanı sıra bakterinin metabolizması için gerekli olan yağ asitleri ile diğer gıdaları sağladığı için gliserolün de besiyerlerinde bulunması

gerektiği bildirilmiştir (Payeur, 2005). Diğer taraftan, *Map* izolasyonu için mikobaktin J'nin besiyerinde bulunması gereken temel bileşen olduğu ve mikobaktin bağımlılığının *Map*'i diğer mikobakterilerden ayırmak için kullanılan en önemli özellik olduğu belirtilmiştir (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; Payeur, 2005; Whipple ve ark., 1991; Whittington, 2010). Mikobaktin bağımlılığının; materyal mikobaktinli ve mikobaktinsiz iki besiyerine ekilerek veya *Map*'in mikobaktinsiz besiyerinde subkültürü yapılarak tespit edilebileceği bildirilmiştir (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; OIE, 2018; Payeur, 2005; Whipple ve ark., 1991; Whittington, 2010).

Besiyerlerinin genellikle kontaminant mikroorganizmaların üremesini engellemek için antimikrobiyal maddeler ve kolonilerin tanınmasına yardımcı olması için de boyalar içerdiği belirtilmiştir (Eamens ve ark., 2000; Eamens ve ark., 2015; Gumber ve Whittington, 2007; Nielsen ve ark., 2004; Whittington, 2010; Whittington ve ark., 1999a). Mikobaktin J ile birlikte vankomisin, amfoterisin B ve nalidiksik asit (VAN) içeren HEYM besiyerinin diğer kontaminant mikroorganizmaları baskılayarak *Map*'in üremesini desteklediği ortaya konulmuştur (Payeur, 2005). Kontaminantları kontrol etmek ve kolonilerin görünürlüğünü arttırmak için HEYM besiyerine malaşit yeşilinin de ilave edildiği bildirilmiştir (Payeur, 2005). Yapılan çalışmalarda hem LJ hem de HEYM besiyerine ilave edilen sodyum piruvatın da *Map*'in üremesini kolaylaştırdığı saptanmıştır (Eamens ve ark., 2000; Juste ve ark., 1991; Kim ve ark., 1989). Piruvatın, LJ besiyerinde *Map* kolonilerinin daha büyümesini sağladığı ve aynı zamanda besiyerinde bulunan antibiyotiklerin inhibitör etkilerini de önlediği rapor edilmiştir (Eamens ve ark., 2000; Juste ve ark., 1991; Kim ve ark., 1989; Whittington, 2010).

Geleneksel kültür yöntemlerinin yanı sıra, yumurta sarısı ve mikobaktin J ilave edilmiş BACTEC™ 12B (Middlebrook 7H12) sıvı besiyerinin kullanıldığı radyometrik bir kültür tekniği geliştirilmiştir (OIE, 2008; Whittington, 2010). Bu sıvı kültür sisteminde; karbon kaynağı olarak ilave edilen C¹⁴ ile işaretlenmiş palmitik asitten mikrobiyal solunum yoluyla üretilen C¹⁴ ile işaretli karbon dioksitin (¹⁴CO₂) radyometrik olarak ölçümü yapılarak üreme değerlendirilmektedir (OIE, 2008; Whittington, 2010). Sonuçların daha kısa sürede alındığı bu sistem ile hem koyun hem de sığır suşlarının geleneksel kültür yöntemlerine göre daha iyi teşhis edildiği ileri

sürülmüştür (Eamens ve ark., 2000; Eamens ve ark., 2015; Whittington, 2009; Whittington, 2010; Whittington ve ark., 1999a). *Map*'in izolasyonu için radyoaktif madde içermeyen MGIT ParaTB (Becton Dickinson), ESPII (Difco) ve MB/BacT (Organon Teknika) gibi alternatif sıvı kültür sistemlerinin de olduğu, ancak bu sistemlerin kullanılabilirliğinin hala netlik kazanmadığı rapor edilmiştir (OIE, 2008; OIE, 2018; Whittington, 2010).

İzole edildiği konakçıya göre aralarında genetik farklılıkların olması nedeniyle *Map* suşları tip C (sığır) ve tip S (koyun) olarak adlandırılmıştır (Collins ve ark., 1990a). Ayrıca İngiltere'de sarı-turuncu pigmentli suşların (Clarke, 1997; Whittington, 2010) ve ABD'de bizon suşunun bulunduğu (Sevilla ve ark., 2005) bildirilmiştir. Tüm *Map* tiplerinin mevcut kültür ortamlarının hepsinde üremediği bildirilmiştir (Collins ve ark., 1990a; Whittington, 2010). Tip C suşlarına kıyasla, S veya diğer suşların HEYM'de üremediği veya zayıf ürediği (Collins ve ark., 1990a; Juste ve ark., 1991; Whittington, 2010; Whittington ve ark., 1999a), tip S suşlarının ayrıca LJ ve MGIT ParaTB besiyerlerinde de üremediği veya çok zayıf ürediği bildirilmiştir (Gumber ve Whittington, 2007; Whittington, 2010). Tip S suşları, tip C suşlarına göre daha zor ürediğinden (Whittington ve ark., 1999a) gaita, doku ve süt örneğinden izole edilebilmesi için BACTEC 460 sistemi ile modifiye BACTEC 12B besiyerinin kullanılması önerilmiştir (Gumber ve Whittington, 2007; Whittington, 2010; Whittington ve ark., 1999a). HEYM besiyerinde sıvı kültürden daha sınırlı çeşitlilikte *Map* tipinin ürediği (Grant ve ark., 2005; Sevilla ve ark., 2005; Whittington, 2010), modifiye 7H10 agar, 7H11 agar ve BACTEC 12B besiyerinin ise makul inkübasyon süreleri içinde tüm *Map* suşlarının üremesini sağladığı ileri sürülmüştür (Collins ve ark., 1990b; Eamens ve ark., 2015; Grant ve ark., 2005; Whittington, 2010; Whittington ve ark., 1999a).

Katı ya da sıvı kültürde *Map*'in identifikasyonunun zor olduğu bildirilmiştir (Whittington, 2010). Katı besiyerinde başlangıçta yuvarlak, pürüzsüz ve beyaz olan kolonilerin daha sonra hafifçe yığılma eğilimi gösterip, koloni yüzeyinin buruşmasıyla donuk açık sarı renge dönüştüğü bildirilmiştir (Whittington, 2010). HEYM besiyerinde sığır suşu kolonilerinin çok küçük, dışbükey, yumuşak, başlangıçta renksiz ve yarı saydam renkte olduğu, koloni büyüklüğünün iğne ucu ile 0,25-1 mm

arasında değiştiği ve besiyeri yüzeyinde çok sayıda koloni olduğunda küçük kalma eğilimi gösterdiği, koloni kenarlarının yuvarlak ve düzenli, yüzeyinin ise pürüzsüz ve parlak olduğu, inkübasyon süresince kolonilerin daha büyüyerek kabarık, beyazımsı krem ya da bej renkli hale geldiği, eski kolonilerin 2 mm'ye kadar ulaşabildiği ve koloni morfolojisinin *smooth*'dan *rough*'a doğru değiştiği bildirilmiştir (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; OIE, 2018; Whittington, 2010). Modifiye 7H10 besiyerinde (zellikle eski kültürlerde) sığır suşlarının koloni çaplarının yaklaşık olarak 1 mm olduğu, solgun renkli ve daha az dışbükey görüldüğü ve agarının yüzeyinde HEYM besiyerinden daha zor tespit edildiği bildirilmiştir (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; OIE, 2018; Whittington, 2010). Koyun suşu kolonilerinin ise dışbükey, yumuşak, nemli, parlak, kirli beyazdan soluk beyaza değişen renkte olduğu ve besiyerinin rengine çok benzediği, büyüklüklerinin iğne ucu ile 0,5 mm arasında değiştiği, besiyerinde az sayıda koloni geliştiğinde 1-1,5 mm'ye kadar ulaşabildiği bildirilmiştir (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; OIE, 2018; Whittington, 2010).

2.7.1.4. Moleküler Teşhis

Son yıllarda paratüberkülozun tanısında PZR'nun yeni bir altın standart test olabileceği konusu tartışılmakta ve bu testin sürü taramalarında da kullanılabileceği belirtilmektedir (Chaubey ve ark., 2016; Stevenson, 2010b). Farklı PZR metodları ile gaita, süt ve bağırsak dokusu gibi örneklerde *Map*'in tespit edildiği bildirilmiş olmasına rağmen (Bölske ve Herthnek, 2010; Chaubey ve ark., 2016; Whittington ve ark., 1999b), kompleks bir yapıya sahip olmaları nedeniyle klinik örneklerin DNA ekstraksiyonu aşamasında ve rnek DNA'sında çeşitli inhibitör maddelerin bulunması nedeniyle PZR aşamasında sorunlarla karşılaşılabileceği (Bölske ve Herthnek, 2010; Chaubey ve ark., 2016; Stevenson, 2010b) ve uygulanan DNA izolasyon yöntemine göre testin sensitivite ve spesifitesinin değişkenlik gösterebileceği ileri sürülmüştür (Bölske ve Herthnek, 2010; Chaubey ve ark., 2016). Nested ve real-time PZR (RT-PZR) analizlerinin (sensitivite %93-100, spesifite %100), konvansiyonel PZR analizine (sensitivite %41-50, spesifite %95) göre sensitivite ve spesifitesinin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Albuquerque ve ark., 2017; Fang ve ark., 2002; Gao ve ark., 2009; Schönenbrücher ve ark., 2008). Ayrıca nested PZR (sensitivite %100) ile RT-PZR'nun (sensitivite %93-98) karşılaştırıldığı çalışmalarda (Fang ve ark., 2002;

Schönenbrücher ve ark., 2008) ise her iki yöntemin de benzer sensitiviteye sahip olduğu saptanmıştır.

İlk PZR ürününün ikinci PZR analizi için kalıp DNA olarak kullanıldığı nested PZR analizi ile inhibitör madde oranının azaltılabileceği belirtilmiştir (Bölske ve Herthnek, 2010; Leite ve ark., 2013). Paratüberküloz şüphesi olan 63 sığırdan alınan gaita örneğinin 40'ı kültür ve konvansiyonel PZR, 58'i ise nested PZR ile pozitif olarak saptanmış ve nested PZR analizinin konvansiyonel PZR ve fekal kültüre göre daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (Kumar ve ark., 2012). RT-PZR analizi ile kültür ve ELISA sonuçlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada (Kawaji ve ark., 2011); *Map* ile oral yolla enfekte edilen 38 koyundan 4 ay sonra alınan gaita örneğinin RT-PZR ile 18'i (%47,4), fekal kültür ile sadece biri pozitif saptanmış, inokülasyondan 8 ay sonra ise gaita örneklerinin RT-PZR ile tümünde (%100), kültür ile %34,2'sinde pozitiflik tespit edilmiştir. Bu koyunlardan deneysel enfeksiyondan 8 ay sonra alınan kan serum örneklerinde de ELISA ile %18,9 oranında bir pozitiflik tespit edilmiş ve gaita örneklerine uygulanan RT-PZR'nun gaita kültürü ve ELISA'ya göre daha duyarlı bir yöntem olduğu ve etkenin alımından 4 ay gibi kısa bir süre sonra pozitif hayvanların bu yöntem ile tespit edilebileceği açıklanmıştır (Kawaji ve ark., 2011). Ayrıca döngü aracılı izotermal amplifikasyon (*loop-mediated isothermal amplification*, LAMP) yöntemiyle de gaita örneklerinde *Map*'in tespit edilebileceği bildirilmiştir (Heidarnejhad ve Safi, 2015). LAMP ve ELISA sonuçlarının %80 oranında uyumlu olduğu ve enfeksiyonun erken döneminde *Map* teşhisi için kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Heidarnejhad ve Safi, 2015). Diğer taraftan kültürden izole edilen *Map*'in identifikasyonu için de hızlı ve spesifik bir test olan PZR'nun kullanılabileceğine ve bu teknikte, kültür temelli teşhis testlerinin aksine, identifiye edilen bakterinin doğrulanması için ilave testlere gerek duyulmadığına dikkat çekilmiştir (Stevenson, 2010b). PZR'nun üstün performansa sahip bir test olmasına rağmen, modifiye BACTEC 12B gibi sıvı besiyerlerinde bulunan yumurta sarısının reaksiyonu inhibe edebileceği için PZR öncesinde yumurta sarısının giderilmesi gerektiği belirtilmiştir (Eamens ve ark., 2015).

Green ve ark. (1989) tarafından *Map*'e spesifik tekrarlayan bir insersiyon segmenti olarak IS900'un keşfedilmesinden sonra, PZR ile *Map*'in tespit edilebilmesi

için bu bölgeyi hedefleyen bir dizi primer tasarlanmış (Green ve ark., 1989; Kawaji ve ark., 2007; Millar ve ark., 1996; Vary ve ark., 1990) ve bu primerlerin spesifiteleri farklı *Mycobacterium* sp. ve bakteri suşları kullanılarak araştırılmıştır (Eamens ve ark., 2015; Millar ve ark., 1996; Vary ve ark., 1990). *Map* dışındaki izolatlarda IS900 benzeri sekansların oldukça nadir bulunmasına rağmen, IS900 gen bölgesine yönelik rutin teşhis uygulamalarında testin spesifitesi ile ilgili bazı belirsizliklerin olduğu bildirilmiştir (Eamens ve ark., 2015). Bu duruma *Map* dışındaki bazı mikobakterilerde nükleotid dizisi %94'e varan oranda benzerlik gösteren IS900 benzeri bir bölge bulunmasının yol açabileceği açıklanmıştır (Li ve ark., 2005; Ribón, 2012). IS900 benzeri diziler *M. srofulaceum*, *M. cookie*, *M. xenopi*, *M. terrae* ve *M. chelonae* gibi bazı mikobakterilerde tespit edilmiş ve bu benzerliğe bağlı olarak PZR'nda yanlış pozitif sonuçlar elde edilebileceği rapor edilmiştir (Eamens ve ark., 2015). Konvansiyonel PZR ürününe *AlwI*, *Hae III* veya *Mse I* gibi bir enzim ile restriksiyon endonükleaz analizi (REA)'nin uygulanması ile testin spesifitesinin arttırıldığı belirtilmiştir (Eamens ve ark., 2015; Whittington ve ark., 2001; Yue ve ark., 2016). Ayrıca IS900 bölgesine yönelik uygulanan konvansiyonel PZR analizinde spesifitenin arttırılması için bağlanma ısısının 62-68°C'ye yükseltilmesi (Eamens ve ark., 2015) ve diğer mikobakteriler ile kros reaksiyon vermeyen spesifik primerlerin kullanılması önerilmiştir (Eamens ve ark., 2015; Kawaji ve ark., 2007). Vary ve ark. (1990) tarafından bildirilen 229 bp'lik 150C ve 921 primer çifti veya Moss ve ark. (1992) tarafından bildirilen (P90/P91, 400 bp) ve daha sonra Millar ve ark. (1996) tarafından modifiye edilen 413 bp'lik P90⁺ ve P91⁺ primer çifti konvansiyonel PZR analizlerinde başarıyla kullanılmıştır. RT-PZR analizleri için ise Kawaji ve ark. (2007) tarafından bildirilen 183 bp büyüklüğündeki MP10-1 ve MP11-1 primer çiftinin kullanılması önerilmiştir (Eamens ve ark., 2015).

Map'e spesifik ISMap02, ISMav2, F57, *hspX* ve lokus 255 gibi yeni DNA fragmentleri belirlenerek bakterinin PZR ile hızlı bir şekilde tanımlanması sağlanmıştır (Bölske ve Herthnek, 2010; Eamens ve ark., 2015). Tespit edilen bu yeni diziler için standart (konvansiyonel veya nested PZR), kantitatif (RT-PZR) PZR (Eamens ve ark., 2015; Kawaji ve ark., 2007) ve bu dizilerin farklı kombinasyonlarından oluşan multipleks RT-PZR (Eamens ve ark., 2015; Ireng ve

ark., 2009; Schönenbrücher ve ark., 2008) protokolleri geliştirilmiştir. Örneğin IS900, F57 ve ISMap02 (Eamens ve ark., 2015; Ireng ve ark., 2009) veya F57 ve ISMav2 (Eamens ve ark., 2015; Schönenbrücher ve ark., 2008)'nin birlikte kullanıldığı multipleks RT-PZR analizleri rapor edilmiştir. Ancak IS900 ile karşılaştırıldığında *Map*'in genomunda hedef DNA'nın daha az sayıda kopyasının bulunması nedeniyle, yeni sekanslara dayanan PZR analizlerinde sensitivitenin düştüğü saptanmıştır (Bölske ve Herthnek, 2010; Eamens ve ark., 2015). *Map*'in genomunda IS900'ün 15-20 kopyası (ortalama 17 kopya) bulunurken, F57 ve lokus 255'in tek, ISMav2'nin 3 ve ISMap02'nin ise 6 kopyasının olduğu açıklanmıştır (Bölske ve Herthnek, 2010; Eamens ve ark., 2015). IS900 ile pozitif saptanan örneklerin kopya sayısına bağlı olarak F57 ile negatif sonuç verdiği ve bu nedenle PZR'nunda IS900 gen bölgesinin tercih edilmesi gerektiği bildirilmiştir (Bölske ve Herthnek, 2010; Eamens ve ark., 2015). Correa-Valencia ve ark. (2017), seropozitiflik saptanan bir sürüde bulunan 2 yaşından büyük 27 sığırdan alınan serum örneklerinin 8'ini ELISA, gaita örneklerinin ise 7'sini nested PZR ile pozitif olarak saptarken, gaita kültürü ve ticari bir kitin kullanıldığı F57 RT-PZR ile pozitif hayvan tespit edemediklerini belirtmiştir. Farklı primerlerin sensitivitesinin karşılaştırıldığı bir çalışmada (El-Malek ve ark., 2015) ise konvansiyonel PZR analizi için IS900 dizisine yönelik üç primer çifti (150C/921, TJ1/TJ2, S204/S749), F57 ve lokus 251'e yönelik birer primer çifti ile nested PZR analizi için ise ISMap02 bölgesine yönelik iki primer çifti kullanılmış ve nested PZR ve 150C/921 primer çifti ile uygulanan konvansiyonel PZR analizinin sensitivitesinin %100 olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan TJ1/TJ2 primer çifti ile hiçbir *Map* izolatının tespit edilemediği, izolatların S204/S749 primer çifti ile %33'ünün, F57 primeri ile %55'inin, lokus 251 primeri ile ise %66'sının saptadığı bildirilmiştir (El-Malek ve ark., 2015). Youssef ve ark. (2014), 150 sığır gaita örneğinden %31,33'ü IS900, %29,33'ü ise F57 gen bölgesine yönelik konvansiyonel PZR, %42,66'sının ise IS900 bölgesine yönelik RT-PZR ile pozitif saptandığını, aynı hayvanlara ait süt örneklerinin ise IS900 ve F57 gen bölgesine yönelik konvansiyonel PZR ve IS900 gen bölgesine yönelik RT-PZR ile sırasıyla %4,67; %3,33 ve %5,33 oranında *Map* teşhisi yaptıklarını açıklamıştır. Aynı çalışmada (Youssef ve ark., 2014), IS900 ve F57 gen bölgesine yönelik kullanılan primer çiftleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığına, gaitada *Map* DNA'sının konvansiyonel PZR'na göre RT-PZR ile daha

yüksek oranda tespit edildiğine ve PZR analizleri için en uygun örneğin sütün aksine gaita olduğuna dikkat çekmişlerdir.

Map suşları, 223. baz çiftinde tespit edilen sitozin/timin polimorfizmine bağlı olarak C (sığır), S (koyun) ve B (bizon) tipi olarak ayırt edilmiştir (Eamens ve ark., 2015; Marsh ve ark., 1999; Whittington ve ark., 2001). Bu bölgede C suşlarında sitozin ve timin, S suşlarında sadece sitozin ve B suşlarında ise sadece timin nükleotidlerinin bulunduğu rapor edilmiştir (Eamens ve ark., 2015; Marsh ve ark., 1999; Whittington ve ark., 2001). *Map* izolatlarının moleküler olarak tiplendirmesinin, PZR ve sonrasında uygulanan REA ile *IS1311* genindeki dizi polimorfizmlerinin belirlenerek hızlı bir şekilde yapılabileceği bildirilmiştir (Eamens ve ark., 2015; Marsh ve ark., 1999; Whittington ve ark., 2001; Yue ve ark., 2016). Bu amaçla; kültürden izole edilen *Map* suşlarının tipinin belirlenmesi için, Marsh ve ark. (1999) tarafından bildirilen *IS1311* gen bölgesine yönelik olan M56/M119 primer çifti (608 bp) kullanılarak konvansiyonel PZR analizinin yapılması ve sonrasında *HinfI* ile *MseI* enzimleri kullanılarak PZR-REA uygulanması önerilmektedir (Eamens ve ark., 2015; Whittington ve ark., 2001; Yue ve ark., 2016). REA sonucunda, *Map*'in C suşları jelde 67, 218, 285 ve 323 bp'de dört bant ile karakterize edilirken, S suşlarının 285 ve 323 bp'lik iki bant ve B suşlarının 67, 218 ve 323 bp'de gözlenen üç bant ile belirlendiği bildirilmiştir (Eamens ve ark., 2015; Marsh ve ark., 1999; Whittington ve ark., 2001; Yue ve ark., 2016). Bu yöntem ile *M. avium* subsp. *avium* da belirlenmiş ve REA analizi sonucunda 134, 189 ve 285 bp de üç bant gözlenmiştir (Yue ve ark., 2016). *IS1311* gen bölgesine yönelik M56 ve M94 primer çifti ile *HinfI* enzimi kullanılarak uygulanan PZR-REA analizi sonucunda da *Map*'in C ve S tiplerinin ayırt edilebileceği bildirilmiştir (Marsh ve ark., 1999). Ayrıca, *IS1311* gen bölgesine yönelik M56 ve M94 primer çifti ile *IS1245* gen bölgesine yönelik M114 ve M115 primer çiftleri kullanılarak uygulanan multipleks PZR analizinin sonucunda elde edilen PZR ürünlerine *HinfI* enzimi ile uygulanan REA analizi ile de tiplendirme yapılabileceği ileri sürülmüştür (Marsh ve ark., 1999). Diğer taraftan *Map* suşlarının tiplendirilmesine; DNA dizi analizi (*GryA* ve *GryB* gen bölgesi için), dijital mikro akışkan çip (*digital microfluidic chip*, DMC) PZR (Rani ve ark., 2017), RFLP, değişken sayılı tandem tekrarları (*variable number of tandem repeats*, VNTR) veya

pulsed-field jel elektroforez (*pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE) (Eamens ve ark., 2015) ve RT-PZR'na dayanan yüksek çözünürlüklü eritme (*high-resolution melt*, HRM) analizi (Castellanos ve ark., 2010) gibi yöntemlerin de kullanılabileceği açıklanmıştır.

2.7.2. İndirek Tanı Yöntemleri

Enfeksiyonun seyri boyunca farklı evrelerde değişik hücresel ve humoral yanıtın gözlemlendiği ve hücresel yanıt ile antikor yanıtı arasında ters bir ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Eamens ve ark., 2015; Nielsen, 2010). Hastalık ilerledikçe ve lezyonlar belirginleştikçe mevcut antijen varlığı ile orantılı olarak antikor düzeyinin arttığı ve testlerde daha yüksek titre elde edildiği bildirilmiştir (Eamens ve ark., 2015; Nielsen, 2010). Ancak enfeksiyonun ileri aşamalarında hayvanlar anejik hale gelebileceği için humoral veya hücresel yanıtın tespit edilemeyebileceği rapor edilmiştir (Eamens ve ark., 2015; Nielsen, 2010). Paratüberkülozun teşhisinde humoral immun yanıtı belirleyen komplement fiksasyon testi (KFT), ELISA, agar jel immunodifüzyon (AGID) testleri ile hücresel immun yanıtı ölçen gecikmiş tip aşırı duyarlılık deri testi ve IFN- γ testleri yaygın olarak kullanılmaktadır (OIE, 2008; OIE, 2018). Ancak enfeksiyona karşı gelişen immun yanıt henüz tam olarak anlaşılamadığı için kullanılan tanı yöntemlerinin sonuçları ile yorumlanmasında hala sorun yaşanmaktadır (Nielsen, 2010).

2.7.2.1. Hücresel İmmun Yanıtı Ölçen Testler

Map enfeksiyonunda antikor yanıtından önce hücresel immun yanıtın geliştiği bildirilmiştir (Eamens ve ark., 2015; Nielsen, 2010; OIE, 2008; OIE, 2018). Bu nedenle enfeksiyonun başlangıcında olan hayvanların serolojik testler ile genellikle saptanamayacağı, ancak hücresel immun yanıtı ölçen testler ile tespit edilebileceği ileri sürülmüştür (OIE, 2008; OIE, 2018). Gecikmiş tip aşırı duyarlılık deri testi ile periferik kan mononükleer hücrelerinin spesifik antijenlerle uyarılmasından sonra salgılanan IFN- γ düzeyini ölçen IFN- γ testinin bu amaçla yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Kalis ve ark., 2003; Nielsen, 2010; Stevenson, 2010).

2.7.2.1.1. Gecikmiş Tip Aşırı Duyarlılık Deri Testi

Gecikmiş tip aşırı duyarlılık deri testinden geçmişte daha sık yararlanılmasına rağmen, günümüzde *in vitro* IFN- γ testinin geliştirilmesi nedeniyle kullanımının azaldığı açıklanmıştır (Nielsen, 2010). Aşırı duyarlılığı belirleyen deri testinde avian ve Johnin PPD (pürifiye protein derivatı) benzer sensitivite ve spesifiteye sahip olduğu için ikisinden birinin kullanılabileceği bildirilmiştir (OIE, 2008). Deri kalınlığının PPD inokülasyonundan önce ve inokülasyondan 72 saat sonra ölçülmesi gerektiği ve uygulama bölgesindeki deri kalınlığının 2 mm'nin üzerinde olması durumunda gecikmiş tip aşırı duyarlılığa bağlı olarak hayvanın enfeksiyon yönünden pozitif kabul edilebileceği belirtilmiştir (OIE, 2008; OIE, 2018). Bununla birlikte gerek avian ve gerekse Johnin PPD spesifitesinin düşük olması nedeniyle *M. avium* ile *M. tuberculosis* arasında çapraz reaksiyonların gözlenebileceği rapor edilmiştir (Barry ve ark., 2011; Jungersen ve ark., 2002). Diğer taraftan kullanılan antijen grupları arasında az da olsa farklılıklar mevcut olduğundan deri testinin yorumlanmasında karışıklıklar yaşanabileceği bildirilmiştir (Kalis ve ark., 2003; OIE, 2008; OIE, 2018). Sığırlarda Johnin PPD'nin kullanıldığı bir çalışmada (Kalis ve ark., 2003), deri testinin spesifitesi pozitif reaksiyonlar ≥ 2 mm, ≥ 3 mm ve ≥ 4 mm olarak değerlendirildiğinde sırasıyla %88,8; %91,3 ve %93,5 olarak tespit edilmiştir.

2.7.2.1.2. Gama İnterferon (IFN- γ) Testi

Son yıllarda sığırlarda tüberküloz ve paratüberkülozun teşhisinde IFN- γ düzeyini ölçerek hücrel immun yanıtı belirleyen *in-vitro* testler kullanılmaya başlanmıştır (Nielsen, 2010). *Map* enfeksiyonunda en erken tespit edilebilen immun yanıtlardan birisinin IFN- γ üretimi olduğu bildirilmiştir (Nielsen, 2010). Bu nedenle subklinik enfekte hayvanların belirlenmesi için IFN- γ testinin en iyi seçenek olduğu ileri sürülmüştür (Jungersen ve ark., 2002; Jungersen ve ark., 2012; Stevenson, 2010b; Vazquez ve ark., 2013). IFN- γ testinin temel prensibi, spesifik antijen (avian PPD, bovine PPD veya Johnin PPD) ile 18-36 saatlik bir uyarılmayı takiben duyarlı lenfositler tarafından üretilen IFN- γ düzeyinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır (OIE, 2008; OIE, 2018). Toplanan heparinize kan örneklerinin en geç 16 saat içinde işleme zorunluluğun olması ve non-spesifik bazı reaksiyonların testi etkilemesi nedeniyle

teşhiste kullanımının sınırlı olduğu belirtilmiştir (Jungersen ve ark., 2002). Ayrıca yanlış pozitif sonuçların saptanması nedeniyle 12 aydan küçük buzağılarda testin güvenilir olmadığı da ileri sürülmüştür (Jungersen ve ark., 2002; McDonald ve ark., 1999).

Sensitivitesi oldukça yüksek olan IFN- γ testinin spesifitesini arttırmak için lenfositlerin uyarılması işlemi bovine PPD, avian PPD ve fosfat tamponlu su (PBS) birlikte kullanılmakta ve üretilen IFN- γ düzeyleri karşılaştırılarak sonuçlar değerlendirilmektedir (Jungersen ve ark., 2002; Kalis ve ark., 2003; Vazquez ve ark., 2013). Tüberkülozun aksine paratüberkülozun teşhisinde IFN- γ testi için standart bir yorumlama kriteri henüz bulunmamaktadır (Jungersen ve ark., 2002; McDonald ve ark., 1999). Kullanılan farklı yorumlama kriterlerine bağlı olarak spesifitesinin sığırlar için %26-99 arasında değiştiği rapor edilmiştir (Jungersen ve ark., 2002; McDonald ve ark., 1999). IFN- γ testi için paratüberkülozdan arı olduğu belgelenmiş sığır işletmelerinden alınan kan örnekleri nil (steril PBS), avian ve bovine antijeni ile uyarılmış ve uygulanan testte elde edilen optikal dansite (OD) değerleri üç farklı kriter kullanılarak değerlendirilmiştir (Kalis ve ark., 2003). Birinci kriterde avian PPD antijeninin (A) OD değerinin, nil (PBS, kontrol) ve bovine PPD antijeninin (B) OD değerinden 0,1 OD birimi veya daha büyük olması; ikinci kriterde hem birinci kriteri sağlaması ve hem de B ile A arasındaki oranın $\leq 0,70$ olması; üçüncü kriterde ise testin geçerliliği için negatif kontrol örneğinin (NK) en yüksek OD'si, pozitif kontrol örneğinin (PK) en düşük OD'si ile nil (kontrol) antijeninden elde edilen en yüksek OD karşılaştırılmış ve kullanılan formülde sonucun $[(A-NK)/(PK-NK)] \times 100 - [(B-NK)/(PK-NK)] \times 100 \geq \%30$ olması durumunda hayvanların pozitif olarak değerlendirildiği rapor edilmiş ve bu kriterlere göre spesifite sırasıyla %66,1; %67 ve %93,6 olarak açıklanmıştır (Kalis ve ark., 2003). Enfekte ve enfekte olmayan sığır sürülerinden alınan kan örnekleri avian (a), bovine (b) Johnin (j) antijenleri ve nil (PBS) ile uyarılmış ve uygulanan IFN- γ testinden elde edilen OD değerlerinden yola çıkılarak farklı kriterlere göre testin spesifitesi hesaplanmıştır (Jungersen ve ark., 2002). Sadece PPDa-PBS $> 0,05$ baz alındığında; enfekte olmayan sürülerde toplam 116 hayvandan 53'ünün (spesifite, %54), enfekte sürülerde ise 249 hayvandan 193'ünün; PPDa-PBS $> 0,453$ kabul edilmesi durumunda enfekte olmayan sürülerde 6

hayvanın (spesifite, %95), enfekte sürülerde ise 84 hayvanın; PPDa-PBS>0,05 ve PPDa>PPDb olduğunda ise enfekte olmayan sürülerde toplam 42 (spesifite, %64), enfekte sürülerde ise 171 hayvanın pozitif olarak saptandığı belirtilmiştir. Testin PPDj-PBS>0,254, PPDa-PBS>0,453 ve PPDb/PPDj veya /PPDb/PPDa<0,71 olduğu durumda en yüksek spesifiteye (%97-99) sahip olduğu belirlenmiş olmasına rağmen, PPDa-PBS>0,05 kriterinin diğer kriterlere göre daha fazla sayıda subklinik olarak enfekte hayvanın tespit edilebildiği açıklanmıştır (Jungersen ve ark., 2002). Sığırlarda yapılan diğer bir çalışmada (Vazquez ve ark., 2013), PPDa'nın PPDb'den daha büyük ve PPDa-PBS≥0,05 olması durumunda hayvanlar paratüberküloz yönünden pozitif olarak değerlendirilmiştir. Aynı çalışmada IFN-γ testi ile pozitif olarak belirlenen hayvanların çoğunluğunun gaitasında *Map* tespit edilmediği (%63,9) gibi ciddi bir doku hasarının da olmadığı (%86,1) saptandığından, bu yöntem ve kriterin genç hayvanlarda enfeksiyonun teşhisinde veya enfeksiyonun erken dönemlerinde kullanılabileceğine dikkat çekilmiştir (Vazquez ve ark., 2013).

Koyunlarda testin sensitivitesi bakteriyolojik kültür ile karşılaştırıldığında %66,7 olarak saptanmış, enfekte olmayan sürülerde de spesifitesi %98,3 olarak hesaplanmıştır (Robbe-Austerman ve ark., 2006a). Deneysel olarak enfekte edilen koyunlarda alınan kan örnekleri Johnin PPD ile uyarıldıktan sonra uygulanan IFN-γ testinde elde edilen OD değerleri PPDj-PBS≥0,05; PPDj-PBS≥0,04; PPDj-PBS≥0,03 ve PPDj/PBS≥1,5 şeklinde olmak üzere dört farklı kriter kullanılarak değerlendirilmiş ve çalışmadaki koyunların hepsi kullanılan dört kritere göre pozitif olarak saptanmıştır (Gwozdz ve ark., 2000). Aynı çalışmada IFN-γ testi ile AGID, KFT ve ELISA testleri karşılaştırılmış, AGID (%86), KFT (%64) ve ELISA (%36-50) testlerine oranla IFN-γ testinin enfekte hayvanları daha yüksek oranda (%100) ve daha erken dönemde tespit ettiği rapor edilmiştir (Gwozdz ve ark., 2000). Yine deneysel enfekte edilmiş koyunlarda yapılan diğer bir çalışmada (Reddacliff ve Whittington, 2003); IFN-γ testinin PPDa-PBS>0,05 olarak değerlendirilmesi durumunda sensitivitesinin %83, spesifitesinin ise %56 olarak hesaplandığı ve doğal olarak enfekte olan hayvanlarda ise spesifitenin daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

2.7.2.2. Humoral İmmun Yanıtı Ölçen Testler

Enfeksiyonun teşhisinde *Map*'e karşı gelişen spesifik antikorları saptayan AGID, ELISA ve KFT gibi serolojik testler kullanılmaktadır (OIE, 2008; OIE, 2018). Paratüberkülozun ileri evrelerine gelinceye kadar antikor yanıtının oluşmaması nedeniyle enfeksiyonun erken dönemlerinde serum örneklerinde antikor tespitine dayanan testlerin hastalığın teşhisi için uygun olmayacağı belirtilmiştir (Nielsen, 2010; OIE, 2008; OIE, 2018).

2.7.2.2.1. Agar Jel İmmunodifüzyon (AGID) Testi

Serum örnekleri ile yapılan AGID testinin spesifitesi yüksek, hayvan türlerinden nispeten bağımsız, basit ve ucuz bir yöntem olduğu belirtilmiştir (Eamens ve ark., 2015). AGID testinin enfeksiyonun başlangıç aşamalarında düşük sensitiviteye sahip olduğu, ancak klinik olarak paratüberküloz olduğu düşünülen sığır, koyun ve keçilerde hastalığı doğrulamak amacıyla kullanılabileceği açıklanmıştır (Nielsen, 2010; Sergeant ve ark., 2003). Yeni Zelanda ve Avustralya'da koyun ve keçilerde yapılan serolojik araştırmalarda (Gwozdz ve ark., 2000; Hope ve ark., 2000; Sergeant ve ark., 2003), AGID testinin sensitivite (%38-56) ve spesifitesi (%100) ELISA testlerinden (sensitivite %35-54, spesifite %95-99) az da olsa yüksek saptanmıştır. Ancak Gumber ve ark. (2006), koyun ve keçi serumlarında ticari bir ELISA kiti ile AGID testini karşılaştırdıklarında ELISA'nın AGID testinden daha duyarlı olduğunu belirtmiş ve paratüberkülozdan ari koyun ve keçi sürülerinde ise ELISA testinin spesifitesinin %100 olacağını ileri sürmüştür. Histolojik incelemeler ile kıyaslandığında ise AGID testinin spesifite ve sensitivitesi %95 güven aralığında sırasıyla %99-100 ve %38-56 olarak saptanmıştır (Hope ve ark., 2000).

2.7.2.2.2. Komplement Fikzasyon Testi (KFT)

Komplement fikzasyon testi, sığırlar için uzun yıllar standart bir test olarak kabul edilmiştir (OIE, 2008). KFT'nin klinik olarak paratüberküloz şüpheli hayvanlarda iyi sonuç vermesine rağmen, hem sensitivite hem de spesifitesinin düşük olduğu bildirilmiştir (Chaubey ve ark., 2016; Sohal ve ark., 2007). Bu nedenle genel

kontrol amacıyla kullanılamayacağı, ancak sığır ithal eden ülkeler tarafından talep edildiği takdirde uluslararası kabul gören KFT prosedürlerinin uygulanabileceği bildirilmiştir (OIE, 2008; OIE, 2018).

2.7.2.2.3. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Hem serum hem de süt örneklerinde *Map*'e karşı gelişen spesifik antikor yanıtını tespit ederek enfeksiyonu dolaylı yoldan teşhis eden ELISA testleri yaygın olarak kullanılmaktadır (OIE, 2008; OIE, 2018). Özellikle sürü taramalarında geçerli kabul edilen, düşük maliyetli, uygulaması kolay ve hızlı olan testlerdir (OIE, 2008; OIE, 2018; Weber ve ark., 2009). Bununla birlikte testin spesifite sorunlarının yanı sıra enfeksiyonun farklı aşamalarında hücresel ve humoral bazda farklı immun yanıtların şekillenmesi ve özellikle enfeksiyonun subklinik aşamasında düşük sensitiviteye sahip olması nedeniyle kullanımında sınırlamalar olduğu bildirilmiştir (Ayele ve ark., 2001; Collins, 1996; Maroudam ve ark., 2015; Nielsen, 2010). Nielsen (2010), enfekte sığırlarda tespit edilebilir düzeyde gaita ile *Map* atılımı başlamadan önce antikor üretiminin olabileceğini, ancak *Map* atılımının çok az olduğu hayvanlarda yani enfeksiyonun erken evrelerinde antikorların tespit edilemeyebileceği belirtmiştir.

Günümüzde paratüberkülozun tanısında kullanılan ve ticari olarak temin edilebilen çeşitli ELISA kitleri bulunmaktadır (Harris ve Barletta, 2001; Maroudam ve ark., 2015; OIE, 2008; OIE, 2018). Geliştirilen bu ELISA kitlerinde *Map*'in farklı antijenleri kullanılmış ve çapraz reaksiyonları önlemek amacıyla örneklerin *M. phlei* ile ön absorpsiyonu yapılarak testin spesifitesi artırılmıştır (Harris ve Barletta, 2001; Maroudam ve ark., 2015; OIE, 2008; OIE, 2018). *Map*'e spesifik bir antijen olan LAM'ın kullanıldığı testlerde ise ön absorpsiyonun gerekli olmadığı bildirilmiştir (Harris ve Barletta, 2001; Maroudam ve ark., 2015; OIE, 2008; OIE, 2018). Paratüberküloz teşhisinde kullanılan ticari ELISA kitlerinin spesifiteleri genellikle %95'in üzerinde olarak belirtilmiş olmasına rağmen, sensitivite ve spesifiteler arasında büyük farklar olduğu ileri sürülmüştür (Harris ve Barletta, 2001; Maroudam ve ark., 2015; Nielsen ve Toft, 2008).

Kültür yönteminde olduğu gibi testin sensitivitesinin enfeksiyonun aşamasına, *Map*'in gaita ile atılım düzeyine ve hayvanların yaşına bağlı olarak değişebileceği bildirilmiştir (Eamens ve ark., 2015; Nielsen ve Toft, 2008; OIE, 2008; OIE, 2018). Nitekim *Map* ile enfekte hayvanların saptanması için kullanılan antikör ELISA'nın sensitivitesinin düşük (yaklaşık %5-30) olduğu, ancak yaşın ilerlemesiyle birlikte testin sensitivitesinin arttığı rapor edilmiştir (Nielsen ve Toft, 2006). ELISA testinin, KFT veya AGID'a göre sensitivite ve spesifitesinin daha yüksek olduğu açıklanmış (Ayele ve ark., 2001; Chaubey ve ark., 2016; Nielsen, 2010; Sohal ve ark., 2007) olmasına rağmen, testin sensitivitesinin klinik olgularda KFT ile benzer, subklinik enfekte hayvanlarda ise KFT'den daha yüksek olduğunu ileri sürülmüştür (Ayele ve ark., 2001; Chaubey ve ark., 2016). Whitlock ve ark. (2000), gaita kültürü ile paratüberküloz olduğu tespit edilen sığırların ancak %30-40'ının ELISA ile pozitif saptandığını bildirmiştir. ELISA sensitivitesinin 2, 3 ve 4 yaşındaki sığırlarda sırasıyla %1,2; %8,9 ve %11,6 olarak hesaplandığı bir çalışmada (Jubb ve ark., 2004), daha ileri yaştaki hayvanlarda bu oranın %20-30 arasında olduğu rapor edilmiş ve tüm yaş grupları için hesaplandığında testin ortalama sensitivitesi yaklaşık %15 olarak belirlenmiştir.

Süt örneklerinde ELISA ile enfeksiyona spesifik antikörlerin saptanabileceği bildirilmiştir (Hendrick ve ark., 2005; OIE, 2008). Hendrick ve ark. (2005), 689 sığırdan alınan süt ve kan serumu örneklerinin sırasıyla 77 (%11,2) ve 130 (%18,9)'unda pozitiflik saptadıkları halde süt ELISA ve fekal kültür (%10,4) arasında aynı sonuçları elde ettiklerini bildirmiş ve süt ELISA testinin hastalığın teşhisi için uygun bir yöntem olduğunu ileri sürmüştür. Benzer bir çalışma (Salgado ve ark., 2007) keçiler üzerinde yapılmış, serum ve süt örnekleri kullanılarak uygulanan ELISA testlerinin sırasıyla sensitivitesi %74,3 ve %60; spesifiteleri ise %98,6 ve %99,3 olarak hesaplanmıştır.

Histolojik inceleme sonucu paratüberküloz olarak saptanan koyunların spesifitesi %98,2-%99,5 arasında olan ticari bir ELISA kiti ile ancak %35-54'ünün pozitif tespit edildiği bildirilmiştir (Hope ve ark., 2000). Sergeant ve ark. (2003), koyunlarda kendileri tarafından geliştirilen ELISA testini histolojik inceleme sonuçları ile karşılaştırmış ve testin spesifitesini %99, sensitivitesini ise %21 olarak

hesapladıklarını bildirmiştir. Enfekte (9 sürü, 2015 hayvan) ve enfekte olmayan (5 sürü, 450 hayvan) koyun sürülerinde AGID, ELISA ve deri testinin sensitivite ve spesifitesinin karşılaştırıldığı bir çalışmada (Robbe-Austerman ve ark., 2006b); AGID ve ELISA testlerinin spesifik olmasına rağmen sensitivitelerinin düşük saptandığına ve testlerin sensitivite ile spesifitelerinin sırasıyla %8,3; %8-16,3; %73,3 ve %99,5; %99,3-97,5; %98.7 olarak tespit edildiğine dikkat çekilmiştir. Koyun suşu ile oral yolla enfekte edilen 12-16 haftalık merinos kuzuların bağırsak ve lenfoid dokularından *Map*'in izole edildiği ve deri ile IFN- γ testleri sonucunda da pozitiflik saptandığı halde enfekte edilen bu kuzulardan sadece birinin inokülasyondan 14 hafta sonra ELISA testinde pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir (Reddacliff ve Whittington, 2003).

2.8. Koruma ve Kontrol

Geniş konakçı dağılımının yanı sıra, uygun olmayan sayısız koşullarda dahi hayatta kalmak için çeşitli stratejiler geliştirmiş olan etkenin nasıl canlı kalabildiği henüz tam olarak anlaşılamamış ve bu nedenle bugüne kadar paratüberküloz için uygun bir koruma ve kontrol stratejisi belirlenememiştir (Arsenault ve ark., 2014; Manning ve Collins, 2010a; Maroudam ve ark., 2015; Singh ve ark., 2013a; Sohal ve ark., 2008). Hastalığın bugün için bilinen etkili bir tedavi yöntemi ve aşısı olmadığı gibi (Ayele ve ark., 2001; OIE, 2008; OIE, 2018; Yardımcı, 2006), inkübasyon süresinin uzun olması, çoğunlukla subklinik seyretmesi, enfekte hayvanlarda spesifik klinik belirtilerin görülmemesi ve özellikle subklinik enfekte hayvanların teşhisinde mevcut testlerin yetersiz kalması gibi nedenlere bağlı olarak kontrol altına alınmasının veya eradike edilmesinin oldukça zor olduğu açıklanmıştır (Bastida ve Juste, 2011; Sohal ve ark., 2015). Ayrıca koruma ve kontrol programlarının hayvanların bireysel sağlık problemi olarak değil sürü sorunu olarak yönetilmesi gerektiği ve bu amaçla *Map*'in bulaşmasını azaltmak için sürü yönetiminde yapılacak değişiklikleri belirlemek, enfeksiyon kaynaklarını ortadan kaldırmak için hayvanları test etmek ve enfekte olan hayvanları sürüden çıkartmak ve enfeksiyona karşı direnci artırmak için hayvanları aşılamak şeklinde klasik üç ana yaklaşımı aynı anda kullanmak gerektiği ileri sürülmüştür (Bastida ve Juste, 2011; Sohal ve ark., 2015).

Etkili olmamakla birlikte adjuvanlı inaktif aşılar bazı ülkelerde kontrol tedbirlerinin bir parçası olarak özellikle küçük ruminantlarda hijyenik tedbirler ile birlikte uygulanmaktadır (Ayele ve ark., 2001; Bastida ve Juste, 2011; Harris ve Barletta, 2001). Sürü yönetiminin değiştirilemeyeceği durumlarda aşı uygulaması önerilmiş olmasına rağmen, aşılama yoluyla bir sürüden hastalığın elimine edilmesinin söz konusu olmayacağı belirtilmiştir (Bastida ve Juste, 2011). Aşılanmanın klinik belirtiler (Bastida ve Juste, 2011; Kormendy, 1994) ile etkenin gaita ile çıkarılmasını Bastida ve Juste, 2011; Erganiş ve ark., 2013; Kormendy, 1994) azaltabileceği ileri sürülmüştür. Nitekim kontrol programına aşılanmanın da dâhil edildiği sığır sürülerinde ekonomik kayıpların azaldığı (Thoen ve Moore, 1989), gaita ile çıkarılan etken sayısı ile prevalansta bir azalma gözlemlendiği (Kormendy, 1994) ve aşılanmış enfekte sığırlarda 7-15 ay sonra enfeksiyonun şiddetinde azalma görüldüğü (Subharat ve ark., 2012) bildirmiştir. Diğer taraftan Dennis ve ark. (2011) enfekte koyunlarda aşılama sonrası iyileşme tespit ettiklerini rapor etmişlerdir. Aşının klinik iyileşmeye yol açması ve gaita ile etken çıkarılmasını azaltmasına rağmen, farklı yönetim koşulları altında doğal enfekte hayvanlarda aşılardan birçoğunun aynı şekilde etki göstermediği de açıklanmıştır (Sohal ve ark., 2015). Ayrıca kullanılan aşılardan, aşılanmış hayvandan enfekte olanı ayırt edebilen bir aşı (DIVA, Differentiating infected from vaccinated animals) olmamasının ana dezavantaj olduğu açıklanmıştır (Whittington ve ark., 2017). Diğer taraftan aşıları hayvanlar genellikle tüberküline duyarlı hale geleceğinden paratüberküloz ve tüberküloz enfeksiyonlarının teşhisinde yanlış yorumlamalara yol açabileceği ileri sürülmüştür (Bastida ve Juste, 2011). Bu nedenle aşının sadece gaita kültürü ile pozitif olarak belirlenen ve tüberkülozdan arı olan sürülerde kullanılması önerilmiştir (Bastida ve Juste, 2011).

Gelişmiş ülkeler hastalığın kontrolünde bazı programları uygulamasına rağmen, gelişmekte olan veya geri kalmış ülkelerde paratüberkülozun hala öncelikli bir hastalık olarak dikkate alınmadığı belirtilmiştir (Sohal ve ark., 2015) ve bu nedenle hastalığın kontrolü veya ortadan kaldırılması için sadece ulusal değil uluslararası bir programın uygulanması gerektiği ileri sürülmüştür (Sohal ve ark., 2015). Hastalığın kontrolü için; hayvanların enfekte olmayan sürülerden alınması ve sürüye dâhil edilmeden önce karantinada tutulması, klinik bulgu gösterenler ile laboratuvar

sonuçlarına göre enfekte olduğu tespit edilen hayvanların sürüden çıkarılması, sürülerin 6 ay aralıklarla gaita kültürü ve PZR veya serolojik/alerjik testler ile taranması ve pozitif olanların sürüden çıkarılması, enfekte sürülerde doğan hayvanların ayrılarak kontamine gübre, kolostrum ve sütle temas etmesinin engellenmesi, süt ve kolostrumun havuzlanarak kullanılmaması ve hayvanlara verilmeden önce sütün kaynama noktasına kadar ısıtılması, yeni doğan hayvanların enfekte annelerinden ayrılması, enfekte boğa spermasının kullanılmaması, genç hayvanların yetişkinlerden ayrı yetiştirilmesi ve mümkünse en az bir yıl genç hayvanların otlatılmaması, çiftlik arazilerinin içinde ve çevresinde gübre biriktirilmemesi ve gübrelerin hayvanların otlatıldığı mera üzerine yayılmaması, çevresel kontaminasyonu azaltmak için yemlik ve sulukların yüksek platformlara yerleştirilmesi, padok ve otlaklara yabani hayvanların girişinin engellenmesi gibi bazı tedbirlerin alınması gerektiği belirtilmiştir (Lu ve ark., 2008; Sohal ve ark., 2015).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışma Planı

Bu çalışmada, örnek alınacak koyun sayısı epidemiyolojik kriterlere göre hesaplandı (Thrusfield, 2005). Buna göre ülkemizde paratüberkülozun prevalansına yönelik yapılmış çalışmalar (Atala ve Akçay, 2001; Buyuk ve ark., 2014; Cetinkaya ve ark., 2000; Makav ve Gokce, 2013; Ozturk ve ark., 2010; Vural ve Atala, 1988) temel alınarak tahmini prevalans %10 olarak kabul edildi. %10 tahmini prevalans, %95 güven aralığı ve %5 hata payına göre minimum örnek sayısı 138 hesaplandığından çalışmada koyun sayısı 150 olarak planlandı. Örnek alınacak 15 işletme Burdur İl Tarım ve Orman Müdürlüğü ile Burdur Damızlık Koyun Keçi Yetiştiricileri Birliği kayıtları dikkate alınarak tesadüfî örnekleme ile belirlendi ve bu 15 işletmenin her birinde 2 yaş ve üzerinde *onar* hayvandan kan ve gaita örnekleri alındı. Örneklerin alındığı sürülerdeki toplam hayvan sayısı (sürü büyüklüğü), örnek alınan hayvanların ırkı, yaşı ile zayıflık ve ishal gibi hastalığa ilişkin klinik belirtileri gösterip göstermedikleri kaydedildi. Bu araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu Başkanlığının (MAKÜ-HAYDEK/2017-258) onayı ile gerçekleştirildi.

3.1.2. Kan ve Gaita Örnekleri

Kan ve gaita örnekleri 15 sürüden 2 yaş ve üzerindeki *onar* hayvan olmak üzere 150 koyundan alındı. Örnekler Nisan 2017 ve Haziran 2017 tarihleri arasında ve paratüberküloza karşı aşı uygulanmayan işletmelerden alındı. Örneklerin alındığı köy, sürü ve örnek sayılarına ait bilgiler tablo 3.1.'de verildi. Kan ve gaita örnekleri 54 Merinos, 20 İvesi, 16 Sakız ve 60 karışık (Merinos-Sakız, Merinos-İvesi, Merinos-Pırıt melez) ırk koyundan alındı. Örneklerin alındığı hayvanların yaşları ile sürülerdeki toplam hayvan sayısı (sürü büyüklüğü) tablo 3.2.'de verildi.

Her bir koyundan pıhtılaşma aktivatörü (10 ml, BD Vacutainer, Plymouth, UK) ve lityum heparin içeren (10 ml, Vacutest, Arzergrande, Italy) vakumlu tüplere ayrı

olarak yaklaşık *onar* ml kan örnekleri alındı. Aynı koyunların rektumundan lateks eldiven kullanılarak yaklaşık 20 gram gaita örneği alındı ve steril gaita kaplarına konuldu (Stabel, 1997). Alınan örnekler Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na getirildi. Lityum heparinli tüplere alınan kan örnekleri test edilinceye kadar oda ısısında tutuldu. Pıhtılaşma aktivatörü içeren tüplere alınan kan örnekleri ise 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj (Nüve, Türkiye) edildi ve serumları ayrıldıktan sonra serum örnekleri test edilinceye kadar -20° ve -80°C'de olmak üzere iki farklı derin dondurucuda saklandı. Gaita örnekleri ise sürme preparatlar hazırlandıktan sonra -80°C'de muhafaza edildi.

Tablo 3.1. Koyun kan ve gaita örneklerinin alındığı köyler ile sürü ve örnek sayıları.

Köy	Sürü Sayısı	Örnek Sayısı	
		Kan	Gaita
Bayındır	3	30	30
Düğer	3	30	30
Aşağı Müslimler	3	30	30
Beşkavak	5	50	50
Kayaaltı	1	10	10
TOPLAM	15	150	150

Tablo 3.2. Kan örneklerinin alındığı koyunların yaşları ile sürü büyüklüklerinin dağılımı.

Hayvan	Yaş (Yıl)				Hayvan Sayısına Göre Sürü Sayısı			
	2	3	4	≥5	10-19	20-49	50-99	≥100
Koyun	16	44	43	47	0	1	4	10

3.1.3. Referans *M. avium* subsp. *paratuberculosis* Suşu

Araştırmada pozitif kontrol olarak kullanılan *M. avium* subsp. *paratuberculosis* 316 F referans suşu Doç. Dr. Zafer SAYIN (Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya)'dan temin edildi.

3.1.4. Rose Bengal Pleyt Test Antijeni

Toplanan 150 kan serumu örneğinin sitokin artışına yol açabilecek bir hastalık olan brusellozis yönünden taranmasında Rose Bengal Pleyt Test (Seromed, İstanbul) antijeni kullanıldı.

3.1.5. Ziehl-Neelsen Boyamada Kullanılan Solüsyonlar

Asit-fast bakterileri belirleyebilmek için ZN boyama yöntemi kullanıldı. ZN boyama metodu için gerekli olan boya solüsyonları aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı (Arda, 2006; Eamens ve ark., 2015; Sayın, 2010).

Fenollü Karbol Fuksin

Bazik fuksin (Merck, Germany)	3 g
Etanol (%95; Merko kimya, İstanbul)	100 ml

Bazik fuksin tartıldı ve üzerine azar azar alkol eklenerek bir havan içerisinde iyice ezildi. Stok solüsyonu, koyu renkli kapaklı bir şişeye aktararak 4-5 saat çalkalandı.

Fenol (Merck, Germany)	5 g
Distile su	100 ml

Kristal haldeki fenol tartılarak üzerine distile su eklendi. Hazırlanan solüsyon, fenolün tamamen erimesi için 45-50°C'ye ısıtılarak karıştırıldı. 10 ml stok karbol fuksin solüsyonu üzerine 90 ml fenollü distile su ilave edildi. Hazırlanan boya solüsyonu 24 saat bekletildikten sonra filtre kâğıdından süzülerek koyu renkli ve kapaklı bir şişe içinde saklandı.

Asit-Alkol (%3 v/v)

HCl (%37,5; Tekkim, Bursa)	3 ml
Etanol (%95)	97 ml

97 ml etanol üzerine 3 ml HCl ilave edilerek 100 ml asit alkol hazırlandı.

Metilen Mavisi

Metilen mavisi (Merck, Germany)	0,3 g
Distile su	100 ml

Metilen mavisi tartılarak bir havan içerisinde distile su ile iyice ezildi. Koyu renkli ve kapaklı bir şişeye alınan boya solüsyonu 4-5 saat çalkalandı ve 24 saat bekletildikten sonra filtre kâğıdından süzüldü.

3.1.6. Gaita Dekontaminasyonunda Kullanılan Solüsyonlar

Gaita örnekleri ekim yapılmadan önce dekontaminasyon işlemine tabi tutuldu. Dekontaminasyonda kullanılan solüsyonlar ve hazırlanışları aşağıda verildi (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; OIE, 2018; Payeur, 2005; Whittington, 2010).

3.1.6.1. Heksadesilpiridinyum Klorür/ Brain Heart İnfüzyon Solüsyonu

Gaita dekontaminasyonunun ilk aşamasında spor formundaki mikroorganizmaların vejetatif forma geçmesini sağlamak amacıyla heksadesilpiridinyum klorür/ brain heart infüzyon (HPC/BHI) solüsyonu kullanıldı.

Hekzadesilpiridinyum klorür (HPC) (Sigma, USA)	9 g
Brain Heart İnfüzyon (BHI) Broth (Difco, USA)	18,5 g
Distile su	1000 ml

Yukarıdaki maddeler distile su içerisinde iyice eritildikten sonra 120°C’de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Taze olarak hazırlanan bu solüsyon kullanılıncaya kadar oda ısısında tutuldu.

3.1.6.2. Vankomisin, Amfoterisin B, Nalidiksik Asit/ Brain Heart İnfüzyon Solüsyonu

Dekontaminasyonun ikinci aşamasında kontaminant vejetatif mikroorganizmaları öldürmek amacıyla vankomisin, amfoterisin B, nalidiksik asit/ brain heart infüzyon (VAN/BHI) solüsyonu aşağıdaki şekilde hazırlanarak kullanıldı.

½ Brain Heart İnfüzyon (BHI) Buyyon

Brain Heart İnfüzyon Broth	7,4 g
Distile su	200 ml

BHI buyyon tartılarak distile su içerisinde eritildi ve pH'sı 6,8-7,0'ye ayarlandı. BHI buyyon, 120°C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

Amfoterisin B Stok Solüsyonu (10 mg/ml)

Amfoterisin B (%45)+Sodyum Deoksikolat (%35) (Sigma, USA)	50 mg
Steril distile su	5 ml

Tartılan antibiyotik steril distile su içerisinde iyice çözündürülerek -20°C'de ve karanlık ortamda saklandı.

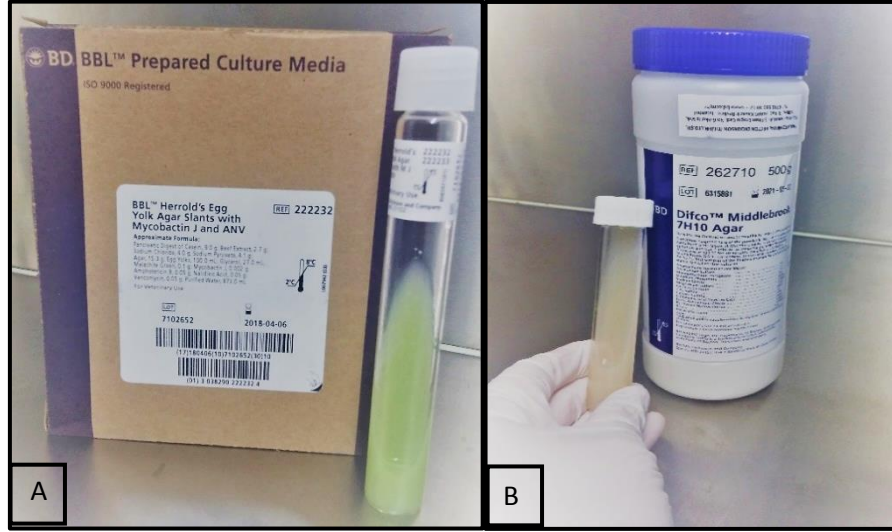
VAN/BHI Solüsyonu

Hazırlanan BHI buyyon soğuduktan sonra besiyerinin içine aseptik koşullarda 20 mg vankomisin (Sigma, USA), 20 mg nalidiksik asit (Sigma, USA) ve 10 mg/ml olarak hazırlanan stok solüsyonundan 1 ml amfoterisin B solüsyonu ilave edildi. Böylece ½ BHI buyyonda 100 µg/ml vankomisin, 50 µg/ml amfoterisin B ve 100 µg/ml nalidiksik asit içeren VAN/BHI solüsyonu hazırlanmış oldu. Solüsyon iyice karıştırıldıktan sonra 50 ml'lik hacimlerdeki steril falkon tüplerine aktarıldı ve -20°C'de karanlık ortamda saklandı.

3.1.7. Besiyerleri

3.1.7.1. Herrold's Egg Yolk Agar

Dışkı örneklerinden *Map*'i izole edebilmek için Herrold's egg yolk agar (HEYM, BD BBL™, USA) kullanıldı (Eamens ve ark., 2015; OIE 2008; OIE, 2018). Bu besiyeri 2 mg/l mikobaktin J ile birlikte 50 mg/l vankomisin, 50 mg/l amfoterisin B ve 50 mg/l nalidiksik asit karşımı (VAN) ihtiva eden kullanıma hazır ticari bir ürün olarak temin edildi (Şekil 3.1A).



Şekil 3.1. *Map*'in izolasyonu için kullanılan besiyerleri. **A.** Herrold's egg yolk agar, **B.** Middlebrook 7H10 agar.

3.1.7.2. Modifiye Middlebrook 7H10 Agar

Koyun ve sığır tipi *Map* suşlarını izole edebilmek için Middlebrook 7H10 agar (Difco, USA) (Şekil 3.1B) modifiye edilerek kullanıldı (Eamens ve ark., 2015; OIE 2008). Modifiye Middlebrook 7H10 agarın hazırlanması aşağıda verilen formüle göre yapıldı.

Middlebrook 7H10 agar	19 g
Casitone (Difco, USA)	1 g
Gliserol (Aklar kimya, Ankara)	5 ml
Distile su	900 ml

Yukarıdaki maddeler distile su içinde eritildikten sonra, pH 6,6'ya ayarlandı ve 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.

3.1.7.3. Mikobaktin J

Ticari ürün olarak temin edilen 2 mg mikobaktin J (IDvet, France) içeren şişeye 1 ml etanol (%95 v/v) eklendi ve iyice çözünüp amber rengini alana kadar karıştırıldı. Daha sonra 39 ml distile su eklenerek çalışma solüsyonu hazırlandı ve otoklavda 120°C'de 15 dakika steril edildikten sonra karanlık ortamda saklandı (Eamens ve ark., 2015).

3.1.7.4. Yumurta Sarısı Emülsiyonu

Yumurta sarısı emülsiyonu (Oxoid, England) kullanıma hazır ticari ürün olarak temin edildi.

3.1.7.5. Middlebrook OADC Zenginleştirme Solüsyonu

İçeriğinde 8,5 g sodyum klorit, 50 g bovine albümin, 20 g dekstroze, 0,03 g katalaz, 0,6 ml oleik asit bulunan Middlebrook OADC zenginleştirme solüsyonu (BD BBL™, USA) kullanıma hazır ticari ürün olarak temin edildi. Besiyeri 58°C'ye soğutulduktan sonra aseptik koşullarda 25 ml mikobaktin J solüsyonu (50 µg/mL), 100 ml OADC zenginleştirme solüsyonu ve 250 ml yumurta sarısı ilave edildi. İyiçe karıştırıldıktan sonra yaklaşık 10 ml besiyeri steril vida kapaklı cam tüplere dağıtıldı ve besiyerinin yatık vaziyette donması sağlandı (Şekil 3.1B). 37°C'de 1 hafta inkübe edilerek sterilit kontrolü yapıldıktan sonra besiyerleri 4°C'de saklandı (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; Payeur, 2005)

3.1.8. Gama İnterferon ELISA Kiti

Map'e karşı gelişen hücresel immun yanıtı; IFN- γ düzeylerindeki artışa göre belirleyerek hastalığı teşhis etmek amacıyla ticari bir kit (BOVIGAM, Prionics AG, Schlieren-Zurich, Switzerland) kullanıldı. Testte kullanılan malzemeler aşağıda verildi (Şekil 3.2).

Mikropleyt: Monoklonal anti-IFN- γ antikorları ile kaplı 96 gözlü mikropleytlar kit ile birlikte temin edildi.

Sığır IFN- γ Pozitif Kontrolü (1x2 ml): Liyofilize olarak temin edilen ve içeriğinde %0,01 w/v thiomerosal bulunan pozitif kontrol kullanılmadan önce 2 ml steril distile su ile sulandırıldı.



Şekil 3.2. *Map*'e karşı oluşan IFN- γ yanıtını belirlemek için kullanılan kit.

Sığır IFN- γ Negatif Kontrolü (1x2 ml): Liyofilize olarak temin edilen ve içeriğinde %0,01 w/v thimerosal bulunan negatif kontrol kullanılmadan önce 2 ml steril distile su ile sulandırıldı.

Plazma Sulandırıcısı (1x175 ml): Plazmaları sulandırmak amacıyla kullanılan ve %0,01 w/v thimerosal içeren tampon solüsyonu kullanıma hazır olarak kit ile birlikte temin edildi.

Yıkama Solüsyonu (1x500 ml): İçeriğinde %0,01 w/v thimerosal bulunan ve 20 kat konsantre olarak temin edilen yıkama solüsyonu; test sırasında 1 kısım 20 kat konsantre yıkama solüsyonuna 19 kısım steril distile su katılarak sulandırıldı.

Konjugat (1x2 ml): Horseradish peroksidaz enzimi ile işaretli anti-bovine IFN- γ 'dan oluşan konjugat, 100 kat konsantre ve %0,01 w/v thimerosal içeren şekilde kit ile birlikte temin edildi. Liyofilize konjugat önce 2 ml steril distile su ile sulandırıldı ve 0,24 ml sulandırılan konjugata 24 ml sulandırıcı karıştırılarak 2 mikroplyet için çalışma solüsyonu kullanım sırasında hazırlandı ve 5 dakika içerisinde kullanıldı.

Konjugat Sulandırıcısı (1x175 ml): Konjugat sulandırmasında kullanılan ve içeriğinde %0,01 w/v thimerosal içeren tampon solüsyonu kit içinde kullanıma hazır olarak temin edildi.

Enzim Substrat Tamponu (1x175 ml): İçerisinde H₂O₂ bulunan bu tampon kit ile birlikte kullanıma hazır olarak temin edildi.

Kromojen Solüsyonu (1x2 ml): Dimetil sülfoksit (DMSO) içinde 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) içeren solüsyon, 100 kat konsantre olarak kit ile birlikte temin edildi.

Enzim Substrat Solüsyonu: Enzim substrat solüsyonu; 2 mikroplyet için 0,24 ml 100 kat konsantre kromojen solüsyonu ile 24 ml enzim substrat tamponu karıştırılarak taze olarak hazırlandı ve 10 dakika içerisinde kullanıldı.

Enzim Reaksiyonunu Durdurma Solüsyonu (1x175 ml): Sülfirik asit (0,5 M, H₂SO₄) içeren solüsyon, kit ile birlikte kullanıma hazır olarak temin edildi.

Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS): Kan kültüründe negatif uyarıcı antijen (Nil kontrol antijeni) olarak ve aynı zamanda bovine ve avian tuberculin PPD antijenlerinin sulandırılmasında kullanıldı ve aşağıdaki şekilde hazırlandı.

K ₂ HPO ₄	1,1 g
KH ₂ PO ₄	0,32 g
NaCl	8,5 g
Distile su	1000 ml

Yukarıdaki maddeler distile su içerisinde iyice eritildikten sonra pH 7,2-7,4'e ayarlandı ve 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

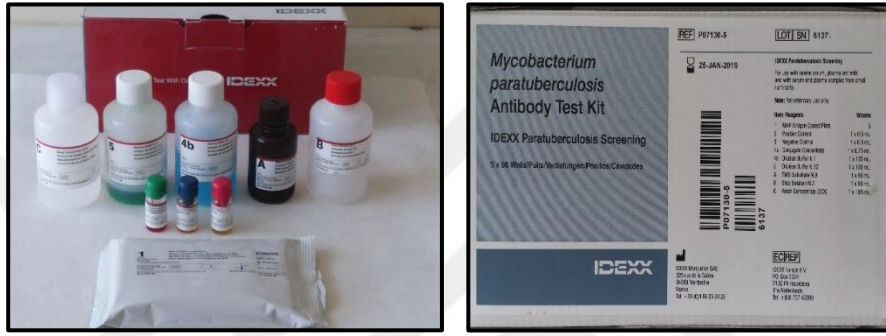
Bovine Tuberculin PPD, 3000: IFN-γ uyarıcı antijen olarak kullanılan bovine PPD (Prionics AG, Schlieren-Zurich, Switzerland), test prosedüründe belirtildiği gibi 160 µl antijene 840 µl steril PBS katılarak ve son konsatrasyonu 300 IU/ml olacak şekilde steril koşullarda sulandırıldı.

Avian Tuberculin PPD, 2500: IFN-γ uyarıcı antijen olarak kullanılan avian PPD (Prionics AG, Schlieren-Zurich, Switzerland), test prosedüründe belirtildiği gibi 160 µl antijene 840 µl steril PBS katılarak ve son konsatrasyonu 250 IU/ml olacak şekilde steril koşullarda sulandırıldı.

3.1.9. *Mycobacterium paratuberculosis* Antikor ELISA Kiti

Map'e karşı gelişen antikorları araştırmak amacıyla ticari bir ELISA kiti (IDEXX, France) kullanıldı ve kitin içeriğinde bulunan malzemeler aşağıda verildi (Şekil 3.3).

Mikropleyt: *Map*'in protoplasmik ekstraktı (*Map* antijeni) ile kaplı 96 gözülü mikropleytler kit ile birlikte temin edildi.



Şekil 3.3. *Map*'e karşı gelişen antikorları araştırmada kullanılan ELISA kiti.

Pozitif Kontrol Serum (1 x 0.5 ml): Pozitif kontrol serumu, kit ile birlikte kullanıma hazır olarak temin edildi.

Negatif Kontrol Serumu (1 x 0.5 ml): Negatif kontrol serumu, kit ile birlikte kullanıma hazır olarak temin edildi.

Konsantre Konjugat (1 x 0.75 ml): Konsantre konjugat kit ile birlikte temin edildi. 1:100 oranında sulandırma tamponu N.1 ile sulandırılarak çalışma solüsyonu taze olarak hazırlandı.

Sulandırma Tamponu N.1 (1 x 120 ml): Sulandırma tamponu kit ile birlikte kullanıma hazır olarak temin edildi.

Sulandırma Tamponu N.12 (1 x 100 ml): *M. phlei* ekstraktı ihtiva eden sulandırma tamponu kit ile birlikte kullanıma hazır olarak temin edildi.

TMB Substrat N.9 (1 x 60 ml): TMB substrat N.9, kit ile birlikte kullanıma hazır olarak temin edildi.

Enzim Reaksiyonunu Durdurma Solüsyonu N.3 (1 x 60 ml): Stop solüsyonu N.3, kit ile birlikte kullanıma hazır olarak temin edildi.

Yıkama Solüsyonu (1 x 100 ml): Yıkama solüsyonu 20 kat konsantre olarak kit ile birlikte temin edildi. 1 kısım 20 kat konsantre yıkama solüsyonu 19 kısım steril distile su ile sulandırılarak taze olarak hazırlandı.

3.1.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Malzemeler

3.1.10.1. Dışkı Ekstraksiyon Kiti

Direkt gaitadan DNA izolasyonu yapmak amacıyla ticari bir dışkı ekstraksiyon kiti (ZR Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit, Zymo Research Corp., USA) kullanıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Direkt gaitadan DNA izolasyonu yapmak amacıyla kullanılan dışkı ekstraksiyon kiti.

3.1.10.2. Kùltürden DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tris-Hidroklorid (Tris-HCL, 1M): Tris-hidroklorid'ten (Fisher Scientific, UK) 121,14 g tartılarak 800 ml distile su ile çözdürüldü. İşlem sonunda distile su ile son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. HCL ile pH: 8'e ayarlandıktan sonra 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit, 0.5 M): EDTA'ten 186,1 g (Sigma, USA) tartıldı ve 800 ml distile suda NaOH ile pH: 8'e ayarlanarak çözdürüldü. Çözünme işleminin sonunda son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi.

Tris-EDTA (TE, pH 8.0): Tris-EDTA solüsyonu hazırlamak için 1M Tris (pH: 8)'den 5ml, 0,5 M EDTA (pH: 8)'dan 1 ml alınarak distile su ile 500 ml'ye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

Lizozim: Lizozim (Sigma, USA), TE tamponu içinde 20 mg/ml konsantrasyonunda hazırlandı ve -20°C'de saklandı.

Sodium Dodesil Sülfat (SDS, %10 w/v): SDS, 10 g (Fisher Scientific, UK) olarak tartıldı ve 68°C'de distile su ile karıştırılarak çözdürüldü. İşlem sonunda distile su ile toplam hacim 100 ml'ye tamamlandıktan sonra pH'sı 7,2'ye ayarlandı.

Proteinaz K: Proteinaz K (Thermo Scientific USA, 1,2 ml), 20 mg/ml konsantrasyonunda kullanıldı.

Sodyum Klorür (NaCl, 5 M): NaCl'den 292,2 g miktarında tartılarak 1000 ml distile su içerisinde çözdürüldü ve 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi.

N-Asetil-N, N, N-Trimetil Amonyom Bromür (CTAB), %10 (w/v): CTAB'tan (Sigma, USA) 10 g tartılarak 1000 ml distile su içerisinde çözdürüldü.

Fenol-Kloroform-İzoamil Alkol (25:24:1) Solüsyonu: Solüsyon; 25 ml fenol, 24 ml kloroform ve 1 ml izoamil alkol (Sigma, USA) ile hazırlandı ve koyu bir cam şişe içerisinde buzdolabında +4°C’de saklandı.

Sodyum Asetat (CH₃COONa, 3 M, pH: 5.2): Distile su içinde (1000 ml) 246,1 g CH₃COONa (Sigma, USA) çözündürüldü ve 120°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi.

Soğuk Etil Alkol %70 (v/v): Soğuk etil alkol, 70 ml etil alkolün 30 ml distile su ile 100 ml’ye tamamlanması ile hazırlandı ve -20°C’de saklandı.

3.1.10.3. DNA Amplifikasyonu için Kullanılan Malzemeler

Taq DNA Polimeraz: Çalışmada; 2 X 1,25 ml 10 X KCl’lü, 2 X 1,25 ml 10 X (NH₄)₂SO₄’lü Taq Buffer, 2 X 1,25 ml 25 Mm MgCl₂ içeren Taq DNA polimeraz seti (Thermo Scientific USA, 5 U/µl) kullanıldı.

Deoksinükleotit Trifosfat (dNTP Miks): Adenin, guanin, sitozin ve timin bazlarının her birinin son konsantrasyonunun 10 mM olduğu deoksinükleotit trifosfat (dNTP) karışımı (Thermo Scientific USA, 1 ml) kullanıldı.

Primerler: Çalışmada; *Map*’in IS900 gen bölgesini çoğaltmaya yönelik 400 bp’lik P90 ve P91 primer çifti (Gümüşsoy ve ark., 2015; Paolicchi ve ark., 2012) ile 229 bp’lik 150C ve 921 primer çifti (El-Malek ve ark., 2015; Whittington ve ark., 1999b) kullanıldı (Tablo 3.3).

Marker: *Mid range DNA ladder* (Jena Bioscience, Germany) ve 100 bp *DNA Ladder* (Jena Bioscience, Germany) kullanıldı.

Pozitif Kontrol: PZR analizlerinde pozitif kontrol olarak referans *M. avium* subsp. *paratuberculosis* 316 F suşundan izole edilen DNA kullanıldı.

Tablo 3.3. *Map*'in IS900 gen bölgesini çoğaltmak için PZR analizinde kullanılan primer dizileri.

Hedef Bölge	Primer	Primer Dizilimi	PZR Ürünü
IS900	P90 (Forward)	5'GAAGGGTGTTCGGGGCCGTC	400 bp
	P91 (Reverse)	5'GAGGTCGATCGCCACGTGAC	
	150C (Forward)	5'CCGCTAATTGAGAGATGCGATTGG	229 bp
	921 (Reverse)	5'AATCAACTCCAGCAGCGCGCCTCG	

3.1.10.4. Agaroz Jel Elektroforez için Kullanılan Malzemeler

Tris-Acetate-EDTA (TAE) Elektroforez Tamponu: Elektroforez aşamasında, yürütme tamponu olarak 1 X TAE solüsyonu kullanıldı. Bunun için 50 X TAE stok tampon solüsyonundan (Fermentas, Lithuanian) 20 ml alınarak steril distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve hazırlanan 1 X TAE solüsyonundan agaroz jelin hazırlanmasında ve elektroforez aşamasında yürütme tamponu olarak yararlanıldı.

Agaroz Jel (%1.5) (w/v): Elektroforez için %1,5'luk agaroz jelin hazırlanmasında, 1,5 g agaroz (Onbio, USA) tartılarak 1 X TAE tamponu ile 100 ml'ye tamamlandı. Mikrodalga fırınında şeffaf hale gelinceye kadar çözdürüldü ve jelin içerisine 0,5 µg/ml etidyum bromid (10 mg/ml) (Metis, Türkiye) eklendi.

Yükleme Tamponu: Çoğaltılan DNA'lar agaroz jele yüklenmeden önce 6X loading dye solüsyonu (Vivantis, Malaysia) ile boyandı.

3.1.11. PZR-Restriksiyon Endonükleaz Analizi için Kullanılan Malzemeler

PZR-restriksiyon endonükleaz analizi (PZR-REA)'inde PZR için bildirilenlerden farklı olarak aşağıda verilen malzemeler kullanıldı.

Primerler: IS900 gen bölgesi tespit edilerek *Map* olduğu doğrulanan DNA örnekleri için IS1311 gen bölgesini çoğaltmaya yönelik ve tablo 3.4 de verilen 608 bp'lik M56 ve M119 primer çifti kullanıldı (Eamens ve ark., 2015; Marsh ve ark.,

1999; Rani ve ark., 2017; Sevilla ve ark., 2005; Whittington ve ark., 2001; Yue ve ark., 2016).

Jel Ekstraksiyon Kiti: Direkt gaitadan izole edilen pozitif DNA örneklerinin *IS1311* gen bölgesi amplifiye edildikten sonra PZR ürünlerini saflaştırmak amacıyla ticari bir jel ekstraksiyon kiti (GeneJET Gel Extraction Kit, Thermo Scientific, USA) kullanıldı.

Tablo 3.4. PZR-REA’de kullanılan primer dizileri.

Hedef Bölge	Primer	Primer Dizilimi	PZR Ürünü
<i>IS1311</i>	M56 (Forward)	5’GCGTGAGGCTCTGTGGTGAA	608 bp
	M119 (Reverse)	5’ATGACGACCGCTTGGGAGAC	

Restriksiyon Enzimleri: REA için *HinfI* (Thermo scientific, USA, 10 U/μl) ve *MseI* (Thermo scientific, USA, 10 U/μl) restriksiyon enzimleri kullanıldı.

Agaroz Jel (%2) (w/v): Elektroforez için %2’lik boyasız agaroz jelin hazırlanmasında, 2 g agaroz (Onbio, USA) tartılarak 1 X TAE tamponu ile 100 ml’ye tamamlandı. Mikrodalga fırınında şeffaf hale gelinceye kadar çözdürüldü.

Agaroz Jel için Boya Solüsyonu: Agaroz jelin görüntülenmesi için 1 X TAE içerisine 0,5 μg/ml olacak şekilde etidyum bromid (10 mg/ml) eklenerek boya solüsyonu hazırlandı.

3.1.12. Koyun Spesifik İnterlöykin-10 ELISA Kiti

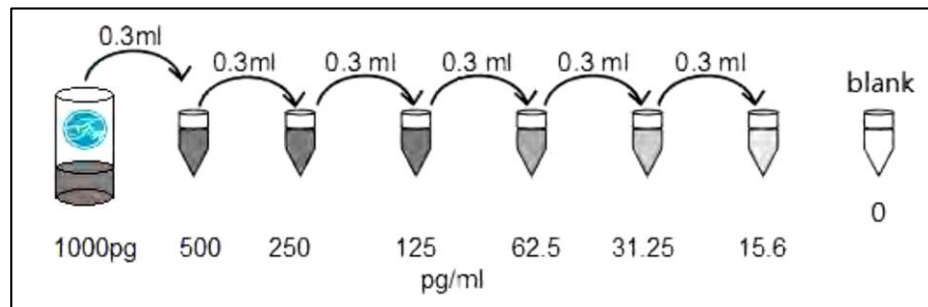
Koyunlarda 15.625-1000 pg/ml aralığındaki IL-10 düzeyini kantitatif olarak belirleyebilen sandviç ELISA tekniğine dayalı ticari bir kit (Sheep Interleukin-10 ELISA Kit, Mybiosource, USA) kullanıldı ve kit içeriğinde bulunan malzemeler aşağıda verildi (Şekil 3.5).

Mikropleyt: Biotinle konjüge edilmiş anti-IL-10 antikorları ile kaplı 96 gözlü 1 adet ELISA mikropleyti kit ile birlikte temin edildi.



Şekil 3.5. Koyunlarda IL-10 düzeyini belirlemede kullanılan ELISA kiti.

Liyofilize Standart (2 adet): Kit ile birlikte liyofilize olarak temin edilen standartlar dilüe edilmeden önce santrifüj edildi ve sulandırılarak kullanıldı. Önce 1000 pg standart içeren tüpe 1 ml sulandırma tamponu ilave edilerek standart solüsyon (1000 pg/ml) hazırlandı. Tüp oda sıcaklığında 10 dakika tutuldu ve iyice karıştırıldı. Daha sonra 6 adet ependorf tüpünün üzerine sırasıyla 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml ve 15,625 pg/ml yazıldı. Her bir tüpe 0,3 ml sulandırma tamponunu eklendi. Daha sonra birinci tüpe 0,3 ml standart solüsyondan (1.000 pg/ml) ilave edildi ve iyice karıştırılarak birinci tüpten ikinci tüpe 0,3 ml aktararak standartlar seyreltildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. IL-10 için ELISA testinde kullanılan standartların sulandırması.

Standart Sulandırma Tamponu (20 ml): Sulandırma tamponu kit ile birlikte kullanıma hazır olarak temin edildi.

Antikor Sulandırma Tamponu (10 ml): Antikor sulandırma tamponu, kit ile birlikte kullanıma hazır olarak temin edildi.

Konsantre Biotin Tespit Antikoru (120 µl): Konsantre biotin tespit antikoru kit ile birlikte temin edildi. Biotin tespit antikorusunun çalışma solüsyonu, testten 1 saat önce hazırlandı. Önce çalışma solüsyonunun toplam hacmi “0,1 ml / kuyu × kuyu sayısı” formülüne göre hesaplandı ve sonra 1:100’lük dilüsyon hazırlamak için 9900 µl antikor seyreltme tamponuna 100 µl biotin tespit antikoru eklenerek iyice karıştırıldı.

HRP-Streptavidin Konjugatı (SABC) (120 µl): Kit içeriğinde bulunan HRP-Streptavidin konjugatının (SABC) çalışma solüsyonu testten 30 dakika önce hazırlandı. Çalışma solüsyonunun toplam hacmi “0,1 ml / kuyu × kuyu sayısı” formülü ile hesaplandı ve 9900 µl SABC sulandırma tamponuna 100 µl SABC ilave edilerek 1:100’lük dilüsyonu hazırlandı.

SABC Sulandırma Tamponu (10 ml): SABC sulandırma tamponu, kit ile birlikte kullanıma hazır olarak temin edildi.

TMB Substratı (10 ml): TMB substratı, kit ile birlikte kullanıma hazır olarak temin edildi.

Enzim Reaksiyonunu Durdurma Solüsyonu (10 ml): Enzim durdurma solüsyonu, kit ile birlikte kullanıma hazır olarak temin edildi.

Yıkama Solüsyonu (30 ml): Kite bulunan ve 25 kat konsantre olan yıkama solüsyonunun 30 ml’si 750 ml steril distile su ile sulandırılarak kullanıldı.

3.1.13. Koyun Spesifik Neopterin ELISA Kiti

Koyunlarda 3,12 nmol/l-100 nmol/l aralığındaki NP düzeyini kantitatif olarak belirleyebilen sandviç ELISA test tekniğine dayalı ticari bir kit (Sheep Neopterin ELISA Kit, Mybiosource, USA) kullanıldı ve kit içeriğinde bulunan malzemeler aşağıda verildi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Koyunlarda neopterin düzeyini belirlemede kullanılan sandviç ELISA kiti

Mikropleyt: Neopterin antikorları ile kaplı 96 gözlü 1 adet ELISA mikropleyti kit ile birlikte temin edildi.

Standartlar (6 x 0.5 ml): Kit ile birlikte kullanıma hazır ve sırasıyla 100; 50; 25; 12,5; 6,25 ve 3,12 nmol/l olmak üzere 6 adet standart temin edildi.

Örnek Sulandırıcı (6 ml): Örneklerin sulandırılmasında kullanıldı ve kit ile birlikte kullanıma hazır olarak temin edildi.

Konjugat (10 ml): Horseradish peroksidaz (HRP) ile işaretli konjugat kit ile birlikte kullanıma hazır olarak temin edildi.

Yıkama Solüsyonu (25 ml): Yıkama solüsyonu, 20 kat konsantre olarak kit ile birlikte temin edildi. 1 kısım 20 kat konsantre yıkama solüsyonu 19 kısım steril distile su ile sulandırılarak taze olarak hazırlandı.

Enzim Durdurma Solüsyonu (6 ml): Enzim durdurma solüsyonu, kit ile birlikte kullanıma hazır olarak temin edildi.

Kromojen A ve B Solüsyonları (6 ml): Kromojen A ve B solüsyonları kullanıma hazır ve kit ile birlikte temin edildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Klinik Bulguların Değerlendirilmesi

Örneklerin alındığı koyunlarda hastalığa ilişkin zayıflık ve ishal gibi klinik belirtiler kaydedildi. Koyunlardaki kilo kaybı vücut kondüsyon skoru (VKS)'na göre değerlendirildi (Russel, 1984). VKS, tablo 3.5'de verilen kriterlere göre ve bel bölgesinde yer alan omurun etrafı ile üzerindeki kas ve yağ dokusunun deri üzerinden palpasyonu yapılarak belirlendi (Russel, 1984; White ve Holst, 2006).

Tablo 3.5. Koyunlarda VKS'nun değerlendirilmesi (Russel, 1984; White ve Holst, 2006).

VKS	Ölçütler
1	<i>Processus spinosus</i> ve <i>processus transversus</i> belirgin ve keskin olup, parmak uçları kolaylıkla <i>processus transversus</i> 'un altına geçer. Kas dokusu yağsız ve incedir.
2	<i>Processus spinosus</i> belirgin ve pürüzsüzdür. <i>Processus transversus</i> yuvarlak olup, bastırıldığında parmak uçları kolaylıkla <i>processus transversus</i> 'un altına geçer. Kas dokusu orta derinliktedir ve az miktarda yağ ile kaplıdır.
3	<i>Processus spinosus</i> 'larda küçük bir yükseklik tespit edilir. Ayrıca <i>processus spinosus</i> ve <i>processus transversus</i> pürüzsüz ve yuvarlaktır. <i>Processus transversus</i> 'ları parmak uçları ile hissetmek için güçlü bastırılmalıdır. Kaslanma tamdır ve orta derecede yağ ile kaplıdır.
4	Yağ ile kaplı kas dokusunda <i>processus spinosus</i> sadece bastırıldığında bir çizgi olarak hissedilmektedir. <i>Processus transversus</i> hissedilmez. Kaslanma tamdır ve kalın bir yağ tabakası ile kaplıdır.
5	<i>Processus spinosus</i> ve <i>processus transversus</i> hissedilmez. Kas ve yağ dokusu çok kalındır.

VKS: vücut kondüsyon skoru

3.2.2. Rose Bengal Pleyt Testi

Toplanan serum örnekleri ve Rose Bengal pleyt test antijeni oda ısısında 15 dakika bekletildi. Antijen ve serumdan birer damla (50 µl) pleyte damlatılarak kürdan yardımıyla karıştırıldı. Daha sonra pleyt dairesel hareketlerle karıştırılarak 4 dakika boyunca aglütinasyon olup olmadığı kontrol edildi. Kümeleşme görülmesi durumunda serum örnekleri pozitif, değişiklik olmaması halinde ise negatif olarak değerlendirildi (Erganiş ve İstanbulluoğlu, 2002).

3.2.3. Bakteriyoskopi

Her bir koyundan alınan yaklaşık 20 gram gaita örneği homojenize edildikten sonra 2 adet sürme preparat hazırlandı ve ZN boyama yöntemi ile boyandı. Bu amaçla hazırlanan sürme preparatlar oda ısısında bırakılarak kurutulduktan sonra alevden 3 defa geçirilerek tespit edildi. Lamın üzerine, tüm lamı kaplayacak şekilde karbol fuksin solüsyonu döküldü ve preparatlar alttan 4-5 dakika aralıklı olarak hafifçe ısıtıldı. Preparatın yanmamasına veya kabarcıkların çıkmamasına dikkat edildi. Süre sonunda boya döküldü ve preparatlar asit alkolde dekolore edildikten sonra çeşme suyu ile yıkandı. Daha sonra preparatlar, metilen mavisi ile zemin mavi renk alıncaya kadar boyandı ve tekrar çeşme suyu ile yıkanarak kurutuldu. Boyalı preparatlar 100 x objektifte immersiyon yağı ile AFB'ler yönünden incelendi (Arda, 2006). Ayrıca aynı gaita örneklerinin kültür öncesinde uygulanan dekontaminasyon işlemi sonrası elde edilen sedimentlerinden ve besiyerlerinin yüzeyindeki üremelerden de 2'şer adet sürme preparat hazırlandı ve hazırlanan preparatlar aynı yöntem ile boyanarak AFB'ler yönünden mikroskopta incelendi. Gerek direk gaitadan ve gerekse dekontaminasyon sonrası elde edilen sedimentten hazırlanan preparatların değerlendirilmesi tablo 3.6'da verilen kriterlere göre yapıldı (Anonim, 2018b).

Tablo 3.6. ZN boyama yöntemiyle boyanan preparatların değerlendirmesi (Anonim, 2018b).

Mikroskop Sahası	AFB Sayısı	Skorlama
Her sahada	9'dan fazla	4 +
Her sahada	1-9	3 +
Her 10 sahada	1-9	2 +
Her 100 sahada	1-9	1 +
Her 300 sahada	1-2	Şüpheli
Her 300 sahada	0	Negatif

AFB: asit-fast bakteriler

3.2.4. İzolasyon İşlemleri

3.2.4.1. Gaita Örneklerinin Dekontaminasyonu

Kültüre edilecek gaita örnekleri -80°C'den çıkarılarak çözündürüldü ve homojenize edildi. Gaitaların dekontaminasyonu, ABD'de geliştirilen çift inkübasyon/santrifüj yöntemine göre yapıldı (Whittington, 2010). Bu metoda göre; her bir gaita örneğinden 2-5 gr tartılarak 35 ml steril distile su içeren steril 50 ml'lik falkon tüplerine aktarıldı. Tüpler 30 dakika oda sıcaklığında elle çalkalandı ve daha sonra büyük partiküllerin dibe çökmesi için 30 dakika beklendi. Süre sonunda steril tek kullanımlık pipet ile en üstteki 5 ml dışkı süspansiyonu alınarak %0,9'luk HPC içeren 25 ml miktarında ½ BHI buyyon bulunan 50 ml'lik tüplere transfer edildi. Örnekler 37°C'de ve aerobik koşullarda 16-24 saat inkübe edildikten sonra oda ısısında 900 g'de 30 dakika santrifüj (Beckman Coulter Life Sciences, USA) edildi ve üstteki süpernatant atıldı. Tüplerin dibinde kalan pelet 1 ml VAN/BHI solüsyonu ile tekrar sulandırıldı ve tüpler 15 saniye çalkalandıktan sonra 37°C'de ve aerobik koşullarda 72 saat inkübe edildi (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; Payeur, 2005; Whittington, 2010).

3.2.4.2. Besiyerlerine İnokülasyon ve İnkübasyon

Dekontaminasyon süresinin sonunda gaita süspansiyonu bulunan tüpler 15 saniye vortekslendi (IKA, USA). Sedimentin bir kısmı bakteriyoskopi için preparat hazırlamada kullanılırken, 0,1 ml'si modifiye Middlebrook 7H10 agara, 0,25 ml'si ise HEYM besiyerine inoküle edildi. Besiyerleri yüzeylerinin kuruması için 37°C'de bir hafta yatık vaziyette tutuldu ve süre sonunda kapakları sıkıca kapatılarak 37°C'de 36 hafta süre ile inkübasyona bırakıldı (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; Payeur, 2005; Whittington, 2010). Tüplerin kapakları haftada 2 kez açılarak oksijenlenmesi sağlandı. Besiyerlerinin yüzeyindeki üremeler kaydedildi ve üremelerden hazırlanan preparatlar ZN boyama yöntemiyle boyanarak AFB'ler yönünden incelendi. Kontaminasyon saptanan besiyerleri ise uzaklaştırıldı (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; Payeur, 2005; Whittington, 2010). Tüm bu işlemler *Class II* biyogüvenlik kabini (Nüve, Türkiye) altında gerçekleştirildi.

3.2.5. IFN- γ ELISA

Sandviç ELISA prensibine dayanan test, üretici firma tarafından bildirilen protokole göre uygulandı

3.2.5.1. Tam Kan Kültürünün Hazırlanması

Her bir koyunun juguler venasından lityum heparin içeren (10 ml, Vacutest, Arzergrande, Italy) vakumlu tüplere yaklaşık *onar* ml kan alındı ve tüpler nazikçe ters çevrilerek kan ile heparinin karışması sağlandı. Oda ısısında ($22\pm 3^{\circ}\text{C}$) laboratuvara ulaştırılan kan örneklerinin ilk 7 saat içinde 24 kuyucuklu doku kültürü kaplarında tam kan kültürleri yapıldı. Kan örnekleri işleme alınmadan hemen önce yaklaşık 10 kez tüpler nazikçe ters çevrilerek karıştırıldı. Her bir hayvanın kanı steril ve tek kullanımlık bir pipet yardımıyla 24 kuyucuklu doku kültürü kabının üç kuyucuğuna ayrı ayrı 1,5 ml olarak aseptik koşullarda dağıtıldı. (Tablo 3.7). Her bir hayvan için 1,5 ml kan örneği konulan 3 kuyucuğa sırasıyla 100 μl PBS (nil kontrol antijeni), 100 μl avian PPD ve 100 μl bovine PPD steril pipet uçları ile aseptik koşullarda eklendi (Şekil 3.8). Kan örnekleri ve antijenler konulduktan sonra 24 kuyucuklu doku kültürü kabının kapağı kapatılarak düz bir zeminde 10 defa saat yönünde ve sonra saat yönünün tersinde çevrilerek antijenler ile kan örneklerinin iyice karışması sağlandı. Bu işlem sırasında kanın dökülmemesine veya kontamine olmamasına dikkat edildi. Karıştırma işleminden sonra doku kültürü kapları 37°C ve nemli ortamda 16-24 saat inkübe edildi.

3.2.5.2. Plazma Örneklerinin Toplanması

İnkübasyondan sonra, değişken hacimli bir pipet ve steril tek kullanımlık pipet uçları kullanılarak yaklaşık 500 μl plazma örneği dikkatlice toplandı ve 96 kuyucuklu steril boş bir mikropleyde aktarıldı. 1 numaralı hayvan için mikropleyten A1 kuyucuğuna nil antijeni, A2 kuyucuğuna avian PPD, A3 kuyucuğuna ise bovine PPD ile aktive edilmiş plazma örneği konuldu. Diğer örnekler de benzer şekilde steril mikropleyde aktarıldı. Bu pleytin C4, C5, C6, G4, G5 ve G6 kuyucuklarına daha sonra yapılacak aktarma işlemini kolaylaştırmak için plazma örnekleri konulmayarak boş bırakıldı (Tablo 3.8). Toplanan plazma örnekleri 12 kanallı bir pipet yardımıyla anti

IFN- γ antikorları ile kaplı ELISA pleytine sırayla aktarıldı. Plazma örneği aktarılmamış olan anti IFN- γ antikorları ile kaplı ELISA pleytinin C4, C5, C6, G4, G5 ve G6 kuyucuklarına testin uygulama aşamasında pozitif ve negatif kontroller konuldu (Şekil 3.9).

Tablo 3.7. Kan örnekleri ile antijenlerin 24 kuyucuklu doku kültürü pleytine dağıtılması.

No	Nil	AvPPD	BoPPD	No	Nil	AvPPD	BoPPD	No
1	Nil (1)	AvPPD (1)	BoPPD (1)	2	Nil (2)	AvPPD (2)	BoPPD (2)	2
3	Nil (3)	AvPPD (3)	BoPPD (3)	4	Nil (4)	AvPPD (4)	BoPPD (4)	4
5	Nil (5)	AvPPD (5)	BoPPD (5)	6	Nil (6)	AvPPD (6)	BoPPD (6)	6
7	Nil (7)	AvPPD (7)	BoPPD (7)	8	Nil (8)	AvPPD (8)	BoPPD (8)	8

Nil: nil kontrol antijeni (PBS); AvPPD: avian PPD; BoPPD: bovine PPD.



Şekil 3.8. Kan ve antijenlerin eklendiği 24 kuyucuklu doku kültürü pleyti.

Tablo 3.8. Toplanan plazma örneklerinin steril ve boş bir mikropleyte aktarımı.

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

N: nil kontrol antijeni (PBS), A: avian PPD, B: bovine PPD, X: boş bırakılan kuyucuk.

3.2.5.3. Testin Uygulanması

Teste başlamadan önce konsantre konjugat dışındaki tüm reaktifler oda ısısına ($22\pm3^{\circ}\text{C}$) getirildi ve test kitin üreticisi tarafından bildirilen protokole göre uygulandı. Anti IFN- γ antikorları ile kaplı ELISA pleytinin tüm kuyucuklarına 50 μl plazma sulandırıcısı konuldu ve sonra bu kuyucuklara 50 μl test ve kontrol örnekleri şekil 3.9’da gösterildiği gibi eklendi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	1A	1B	2N	2A	2B	3N	3A	3B	4N	4A	4B
B	1N	1A	1B	2N	2A	2B	3N	3A	3B	4N	4A	4B
C	5N	5A	5B	6N	6A	6B	7N	7A	7B	8N	8A	8B
D	5N	5A	5B	6N	6A	6B	7N	7A	7B	8N	8A	8B
E	9N	9A	9B	PK	PK	PK	10N	10A	10B	11N	11A	11B
F	9N	9A	9B	NK	NK	NK	10N	10A	10B	11N	11A	11B
G	12N	12A	12B	13N	13A	13B	14N	14A	14B	15N	15A	15B
H	12N	12A	12B	13N	13A	13B	14N	14A	14B	15N	15A	15B

Şekil 3.9. Steril mikropleyttten anti IFN- γ antikorları ile kaplı ELISA mikropleytine örneklerin aktarılması. N: nil kontrol antijeni (PBS); A: avian PPD; B: bovine PPD, PK: pozitif kontrol, NK: negatif kontrol.

Her pleyte örnekler çift olarak konuldu. Buna göre, A sırasındaki plazma örneği ELISA mikropleytinin A ve B sırasına transfer edildi. Aynı şekilde, B sırası C ve D’ye, C sırası E ve F’ye D sırası G ve H’ye transfer edildi. Her pleyte en son kontrol örnekleri eklendi. Pleytlere aktarma sırasında kontroller de dâhil tüm örnekler 5 kez pipetlenerek karıştırıldı. Daha sonra her pleytin kapağı kapatıldı ve her 5 dakikada bir karıştırılarak oda ısısında 60 ± 5 dakika inkübe edildi. Süre sonunda pleytler 6 defa yıkandı ve filtre kâğıdında kurutuldu. Bu aşamada 100 kat konsantre konjugat test protokolünde belirtildiği oranda sulandırıldı ve pleytin tüm kuyularına 100 μl taze hazırlanan konjugat konuldu. Her pleyt kapak ile kapatıldı ve oda ısısında aralıklı olarak karıştırılarak inkübe edildi. Inkübasyon süresinin sonunda pleytler 6 kez

yıkandı ve filtre kağıdında kurutulduktan sonra enzim substrat solüsyonu uygun hacimlerde 100 kat konsantre kromojen solüsyonu ile hazırlandı ve pleytin tüm kuyularına 100 µl eklendi. Pleyt kapak ile kapatıldı ve oda ısısında 30 dakika karanlık ortamda aralıklı olarak karıştırılarak inkübe edildi. Süre sonunda tüm kuyulara 50 µl durdurma solüsyonu eklendi ve hafifçe sallanarak karıştırıldı. Reaksiyon durdurulduktan sonra 5 dakika içinde her kuyucuğun optikal dansite (OD) değeri 450 nm’lik bir filtre kullanılarak ELISA okuyucuda (Microplate Reader RT-2100C, Rayto and Analitical Sciences Co Ltd, PRC) okundu.

3.2.5.4. Testin Geçerlilik Kontrolü

Nil, avian PPD ve bovine PPD ile aktive edilmiş pozitif ve negatif kontrollerin ortalama OD değerleri hesaplandı. Negatif kontrollerinin ortalama OD değerinin 0,130’den küçük olması ($OD < 0,130$) ve pozitif kontrollerinin ortalama OD değerinin 0,700’den büyük olması ($OD > 0,700$) durumunda test geçerli kabul edildi.

3.2.5.5. Örnek Sonuçlarının Hesaplanması ve Değerlendirilmesi

Nil, avian ve bovine PPD ile aktive edilme işlemi 2 kez tekrarlanan her örneğin ortalama OD değeri hesaplandı ve her örnek için ortalama OD değerleri karşılaştırıldı. *M. bovis* enfeksiyonunu tanımlamaya yönelik olan testin değerlendirmesi protokole uygun yapıldı. Buna göre her bir örnek için bovine PPD ile elde edilen ortalama OD değerinden nil antijeni ile elde edilen ortalama OD değeri ve avian PPD ile elde edilen ortalama OD değeri çıkarıldı. $OD_{\text{bovine PPD}} - OD_{\text{nil antijen}} \geq 0,1$ ve $OD_{\text{bovine PPD}} - OD_{\text{avian PPD}} \geq 0,1$ olduğunda hayvan *M. bovis* enfeksiyonu yönünden pozitif, $OD_{\text{bovine PPD}} - OD_{\text{nil antijen}} < 0,1$ ya da $OD_{\text{bovine PPD}} - OD_{\text{avian PPD}} < 0,1$ olduğunda ise negatif kabul edildi.

Test sonuçlarının *Map* enfeksiyonu yönünden değerlendirilmesi ise Alvarez ve ark. (2008) ile Vazquez ve ark. (2013) tarafından bildirilen kriterlere göre yapıldı. Bu kriterlere göre; avian PPD ile uyarılan IFN- γ düzeylerinin ortalama OD değerinden nil antijeni ile uyarılan IFN- γ düzeylerinin ortalama OD değeri çıkarıldığında farkın 0,05’e eşit veya büyük olması ve avian PPD ile uyarılan IFN- γ düzeylerinin ortalama

OD değerinin bovine PPD ile uyarılan IFN- γ düzeylerinin ortalama OD değerinden büyük olması durumunda hayvan paratüberküloz yönünden pozitif kabul edildi.

3.2.6. *Mycobacterium paratuberculosis* Antikor ELISA

3.2.6.1. Testin Uygulanması

Test, kitin üretici firması tarafından bildirilen protokole göre uygulandı. Kan serumu örnekleri ile pozitif ve negatif kontroller, kros reaksiyon veren antikorları gidermek amacıyla *M. phlei* içeren tampon ile boş bir mikropleytte 1:20 oranında sulandırıldı ve 15 dakika ile 2 saat arasında 18-26°C’de inkübe edildi. Süre sonunda serum örnekleri ile birlikte pozitif ve negatif kontrollerin 100 μ l’si *Map* antijeni ile kaplı mikropleytlerin uygun kuyucuklarına aktarıldı. Her pleytte pozitif ve negatif kontroller kullanıldı ve A1 kuyusuna negatif, B1 ve C1 kuyularına ise pozitif kontrol konuldu. Pleytlerin üstü kapak ile kapatılarak 45 $\pm$ 5 dakika 18-26°C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra pleytlerin her bir kuyusu 300 μ l yıkama solüsyonu ile 3-5 kez yıkandı. Son yıkamadan sonra pleytin üst yüzü aşağıya gelecek şekilde absorban bir kâğıdın üzerine vurularak yıkama solüsyonu uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 1:100 oranında sulandırılan konjugat (anti-ruminant antikoru+enzim) konuldu ve pleytlerin kapakları kapatılarak 30 $\pm$ 3 dakika 18-26°C’de inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda pleytler aynı şekilde 3 kez yıkandı. Her bir kuyuya 100 μ l enzim substratı ilave edilerek, kapağı kapatıldı ve 10 $\pm$ 3 dakika 18-26°C’de karanlık ortamda inkübe edildi. Süre sonunda her kuyucuğa enzim durdurma solüsyonu konuldu ve hafifçe çalkalayarak karıştırıldı. Reaksiyon durdurulduktan sonra her kuyucuğun OD değeri 450 nm’lik bir filtre kullanılarak ELISA okuyucuda (Microplate Reader RT-2100C, Rayto and Analytical Sciences Co Ltd, PRC) okundu.

3.2.6.2. Testin Geçerlilik Kontrolü

Pozitif kontrolün ortalama OD değeri hesaplandı. Kit protokolüne göre; pozitif kontrollerin ortalama (PK_x) OD değerinin 0,350’ye eşit veya daha büyük olması (OD_{PK_x} $\geq$ 0,350) ve pozitif kontrollerin ortalama OD değerinin negatif kontrole (NK)

oranının 3,00'e eşit veya büyük olması ($PK_x/NK \geq 3,00$) durumunda test geçerli kabul edildi.

3.2.6.3. Örnek Sonuçlarının Hesaplanması ve Değerlendirilmesi

Her bir kan serumu örneği için pozitiflik %'si (%P) aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Örnek \%P} = \frac{OD_{\text{örnek}} - OD_{NK}}{OD_{PKx} - OD_{NK}} \times 100$$

Koyun kan serumu örneklerinin sonuçları %45 pozitiflik kritik değerine eşit veya altında ise negatif, %45 ve %55 pozitiflik kritik değerleri arasında ise şüpheli, %55 pozitiflik kritik değerine eşit veya daha yüksek ise pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.7. PZR

3.2.7.1. Gaitadan DNA İzolasyonu

Gaitadan DNA'nın izolasyonu dışkı ekstraksiyon kitinin protokolüne uygun olarak yapıldı. Gaita örnekleri -80°C 'den çıkarılıp çözündürüldükten sonra tamamen homojen hale getirildi ve içerisinde boncuklar bulunan “*ZR BashingBeadTM*” lizis tüpüne 150 mg olarak konuldu. Bu tüpe 750 μl lizis solüsyonu eklendikten sonra 30 dakika vortekslenerek (IKA, USA) iyice karıştırıldı. İşlemin sonunda $10.000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edilen (Hermle, Germany) lizis tüpünün üst yüzeyinde bulunan süpernatanttan 400 μl “*Zymo-SpinTM IV Spin*” filtresine transfer edildi ve $8.000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpüne süzülen filtrat üzerine 1200 μl genomik lizis solüsyonu eklendi ve pipetlenerek iyice karıştırıldı. Bu karışımdan 800 μl , “*Zymo-SpinTM IIC Column*” filtresine transfer edildi ve $10.000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpüne süzülen filtrat atıldıktan sonra bir önceki toplama tüpünde kalan son 800 μl karışım da “*Zymo-SpinTM IIC Column*” filtresine transfer edilerek santrifüj edildi. Yeni bir toplama tüpüne yerleştirilen “*Zymo-SpinTM IIC Column*” filtresine 200 μl “*DNA Pre-Wash Buffer*” ilave edildi ve $10.000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra 500 μl “*g-DNA Wash Buffer*” eklenerek tekrar $10.000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edildi. İşlemin sonunda steril bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilen “*Zymo-SpinTM IIC Column*” filtresinin merkezine 50 μl “*DNA Elution Buffer*” ilave edildikten sonra 2

dakika beklendi ve 10.000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Son olarak izole edilen bu DNA steril bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilen “Zymo-Spin™ IV-HRC Spin” filtresine transfer edilerek 8.000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Böylece saf DNA elde edildi ve izole edilen DNA'lar -20°C'de saklandı.

3.2.7.2. Kültürden DNA İzolasyonu

HEYM ve modifiye 7H10 Middlebrook agarda üretilen *Map* 316 F izolatu ile dışkı örneklerinden izole edilen ve aside dirençli bakteri olarak değerlendirilen kolonilerden bir öze dolusu alınarak 500 µl TE tamponu içinde homojenize edildi ve sonra 80°C'de 1 saat tutularak inaktive edildi. İnaktive edilen bakteri süspansiyonu üzerine 50 µl lizozim (20 mg/ml, TE tamponu içinde) ilave edildi ve 37°C'de bir gece inkübe edildi. Süre sonunda 70 µl %10 SDS (w/v) ve 12 µl Proteinaz K (20 mg/ml) eklenerek ısıtıcı blokta (Biosan, UK) 65°C'de 30 dakika ve her 10 dakikada bir karıştırılmak suretiyle tutuldu. Süre sonunda üzerine 100 µl 5M NaCl eklenerek karıştırıldı ve önceden ısıtılmış %10 (w/v) N-asetil-N, N, N-trimetil amonyum bromür (CTAB)'den 80 µl eklenerek 65°C'de 10 dakika bekletildi ve üzerine 750 µl fenol: kloroform: izoamil alkol (25:24:1) eklenerek 10 saniye karıştırıldı. Oda ısısında 12.000 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz mikropipet ile yeni bir tüpe aktarıldı. 500 µl isopropanol (Merck, 37160895) eklenerek bir gece -20°C'de bekletildikten sonra 3M sodyum asetat (pH: 5,2) ilave edildi ve oda ısısında 10 dakika inkübe edilerek DNA'nın presipite olması sağlandı. Oda ısısında 12.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. DNA peleti 1 ml %70'lik soğuk etanol ile yıkandıktan sonra oda ısısında 12.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve üstteki süpernatant atıldı. Kalan DNA peleti kuruyana kadar 37°C'de bekletildi. Alkol tamamen uçurulduktan sonra DNA peleti 20 µl TE tamponu ile çözdürüldü. İzole edilen DNA'lar PZR analizinde kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı (Sayın, 2010).

3.2.7.3. İzole Edilen DNA'ların Absorbans Tayini

Elde edilen DNA'ların saflık ve miktarlarının belirlenmesi amacıyla 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki OD değerleri nanodrop spektrofotometre (Biotek, USA) cihazı ile ölçüldü. OD260 nm / OD280 nm oranı 1,7-1,9 arasında olan DNA örnekleri

PZR analizinde kullanıldı. DNA örneklerinin konsantrasyonları ng/μl olarak kaydedildi.

3.2.7.4. DNA'nın Amplifikasyonu

Gaita ve kültürden izole edilen DNA'lar ile birlikte *Map*'e spesifik IS900 gen bölgesine yönelik olan 400 bp'lik P90 ve P91 (Gümüşsoy ve ark., 2015; Paolicchi ve ark., 2012) ile 229 bp'lik 150C ve 921 (Whittington ve ark., 1999b) primer çiftleri kullanılarak PZR yapıldı. Bu amaçla, izole edilen her bir DNA örneği için; 5 μl KCl'lü *Taq* buffer, 3 μl MgCl₂ (25 mM), 1 μl dNTP mix (10 mM), her bir primerden 1 μl (1 μM), 0,3 μl (1,5 U) *Taq* DNA polimeraz, 33,7 μl DNAaz ve RNAaz ari ultra saf su ve 5 μl hedef DNA'dan oluşan 50 μl'lik PZR karışımları hazırlandı. Pozitif kontrol olarak referans *Map* 316 F suşundan izole edilen DNA, negatif kontrol olarak ise DNA içermeyen PZR karışımı kullanıldı.

Hedef DNA ile birlikte 150C ve 921 primer çifti; 95°C'de 10 dakikalık ön denatürasyondan sonra 95°C'de 1 dakika, 55°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika olmak üzere toplam 35 döngü ve son zincir uzaması için 72°C'de 10 dakika şeklinde PZR-ısı döngü cihazında (Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler, USA) çoğaltıldı. P90 ve P91 primer çifti için ise hedef DNA, iki farklı protokol uygulanarak çoğaltıldı. Birinci protokole göre; 95°C'de 10 dakikalık ön denatürasyondan sonra 95°C'de 1 dakika, 55°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika olmak üzere toplam 35 döngü ve son zincir uzaması için 72°C'de 10 dakika tutularak çoğaltıldı. İkinci protokolde ise 95°C'de 10 dakikalık ön denatürasyondan sonra 95°C'de 1 dakika, 65°C 1 dakika, 72°C 2 dakika olmak üzere toplam 40 döngü ve son zincir uzaması için 72°C'de 10 dakika tutularak çoğaltıldı.

3.2.7.5. Elektroforez ve Görüntüleme

Hazırlanan %1,5'luk agaroz jelin içerisine 10 mg/ml konsantrasyonundaki etidyum bromid'ten 0,5 μg/ml olacak şekilde eklendi ve iyice karışması sağlandıktan sonra yatay DNA elektroforez cihazı (Scie-Plas, HU10, UK) kalıbına döküldü ve jel targağı yerleştirildi. Yaklaşık 30 dakika oda ısısında jelin donması beklendi. Daha sonra

jel içerisinde tarak çıkartılarak elektroforez tankına yerleştirildi. Tanka jelin yüzeyini örtecek seviyede 1 X TAE tamponu ilave edildi. PZR ürünlerinin 7 µl'si, 2 µl yükleme boyası (Vivantis, Malaysia) ile karıştırılarak jeldeki boşluklara konuldu. Elektroforez cihazı güç kaynağına (Teko, KL23, Italy) bağlanarak sabit akımda 90 volt'ta 45 dakika yürütüldü. Bantlar UV ışığı altında (UV-transilluminator, CLP, USA) gözlenerek jel görüntüleme sisteminde fotoğraflandı (Edas 290, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA).

3.2.7.6. Nested PZR

Bazı DNA örnekleri PZR'nda 150C ve 921 primer çifti ile pozitif saptanırken, P90 ve P91 primer çifti ile negatif olarak belirlendi. Bu nedenle P90 ve P91 primer çifti ile uygulanan PZR işlemlerinden sonra elde edilen tüm PZR ürünleri 150C ve 921 primer çifti ile ve aynı PZR karışımı ve süreler kullanılarak nested PZR analizine tabi tutuldu (Kanazawa ve ark., 1999). Hazırlanan %1,5'luk agaroz jelin içerisine etidyum bromid 0,5 µg/ml olacak şekilde eklendi ve jel donduktan sonra 7 µl PZR ürünü 2 µl yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklendi. Elektroforez sonrası bantlar UV ışığı altında gözlemlendi.

3.2.7.7. DNA Dizi Analizi

Gaitadan izole edilen 3 DNA örneğinin IS900 gen bölgesine yönelik P90/P91 ve 150C/921 primer çiftleri ile amplifiye olmuş PZR ürünlerinden seçilen 4'ünün çift yönlü DNA dizi analizi hizmet alımı (BMLabosis, Ankara) ile gerçekleştirildi. Bu amaçla sadece 150C/921 (229 bp) primer çifti ile pozitif bulunan bir örneğin PZR ürünü, her iki primer çifti ile pozitif olarak değerlendirilen bir örneğin nested PZR'daki 1. ve 2. PZR ürünleri ve P90/P91 primer çifti ile 400 bp yerine 500 bp'de bant tespit edilen bir örneğin PZR ürünü seçildi. Veriler FinchTV 1.4 ve ApE program programı yardımıyla incelendi. Dizi analizi verileri National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, Md., ABD) BLAST sistemi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) kullanılarak değerlendirildi.

3.2.8. PZR-REA

3.2.8.1. IS1311 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

IS900 gen bölgesi tespit edilerek *Map*'e ait oldukları doğrulanan DNA örneklerinin tiplendirilmesi PZR-REA ile yapıldı. Bunun için önce DNA örnekleri ile birlikte IS1311 gen bölgesine yönelik M56 ve M119 primer çifti kullanılarak PZR uygulandı (Eamens ve ark., 2015; Marsh ve ark., 1999; Rani ve ark., 2017; Sevilla ve ark., 2005; Whittington ve ark., 2001; Yue ve ark., 2016). PZR'da her bir DNA örneği için 5 µl KCl'li *Taq* buffer, 3 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl dNTP mix (10 mM), her bir primerden 1 µl (1 µM), 0,3 µl (1,5 U) *Taq* DNA polimeraz, 33,7 µl DNAaz ve RNAaz ari ultra saf su ve 5 µl hedef DNA'dan oluşan 50 µl'lik bir karışım hazırlandı. DNA örnekleri; 94°C'de 5 dakikalık ön denatürasyondan sonra 94°C'de 30 saniye, 62°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika olmak üzere toplam 37 döngü ve son zincir uzaması için 72°C'de 10 dakika şeklinde PZR-ısı döngü cihazında (Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler, USA) çoğaltıldı (Eamens ve ark., 2015; Marsh ve ark., 1999; Rani ve ark., 2017; Sevilla ve ark., 2005; Whittington ve ark., 2001; Yue ve ark., 2016). Pozitif kontrol olarak referans *Map* 316 F suşundan izole edilen DNA, negatif kontrol olarak ise DNA içermeyen PZR karışımı kullanıldı. Hazırlanan %1,5'luk agaroz jelin içerisine 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromid eklendi ve jel donduktan sonra 7 µl PZR ürünü 2 µl yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklendi. Elektroforez sonrası bantlar UV ışığı altında gözlemlendi.

3.2.8.2. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi

REA uygulanmadan önce, IS1311 gen bölgesi amplifiye olan ve güçlü pozitif bant veren gaitaya ait pozitif DNA örneklerinin PZR ürünleri belirlendi. Bu PZR ürünleri ticari bir jel ekstraksiyon kiti (GeneJET Gel Extraction Kit, Thermo Scientific, USA) ile saflaştırıldı. IS1311 gen bölgesi yönünden pozitif olarak saptanan gerek kültürden ve gerekse direk gaitadan elde edilen DNA örneklerinin PZR ürünleri bu gen bölgesindeki dizi polimorfizmlerini belirlemek amacıyla *Hinf*I (10 U/µl) ve *Mse*I (10 U/µl) enzimleri ile kesildi (Eamens ve ark., 2015; Marsh ve ark., 1999; Rani ve ark., 2017; Sevilla ve ark., 2005; Whittington ve ark., 2001; Yue ve ark., 2016). Bu

amaçla her bir enzim için; 10 µl PZR ürünü, 18 µl DNAaz ve RNAaz ari ultra saf su, 2 µl 10X buffer R, 2 µl enzim içeren reaksiyon karışımı hazırlandı. *MseI* enzimi bulunan örneklerin üzerine 1 damla sıvı parafin damlatıldıktan sonra ısıtıcı blokta (Biosan, UK) 65°C’de 16 saat inkübe edildi. *HinfI* enzimi ile muamele edilen örnekler ise su banyosunda (IKA, USA) 37°C’de 16 saat inkübe edildi.

3.2.8.3. Elektroforez ve Görüntüleme

Restriksiyon enzimleri ile kesilen reaksiyon ürünleri 2 µl yükleme boyası (Vivantis, Malaysia) ile karıştırılarak %2’lik hazırlanan agaroz jeldeki kuyulara yüklendi. Elektroforez cihazı güç kaynağına bağlanarak sabit akımda önce 40 mAh’de 15 dakika, sonra 80 mAh’de 180 dakika yürütüldü. Süre sonunda jel, 1 X TAE içerisine 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromid (10 mg/ml) eklenerek hazırlanan boya solüsyonu içerisine konuldu ve çalkalayıcıda (Biosan, USA) 65 rpm’de 30 dakika karıştırılarak boyandı. Süre sonunda boya solüsyonunun uzaklaştırılması için jel distile su içerisinde 30 dakika karıştırıldı ve sonra distile su değiştirilerek işlem tekrarlandı. Jeldeki bantlar UV ışığı altında gözlenerek görüntüleme sisteminde fotoğraflandı.

3.2.8. Sitokin Düzeyleri Ölçülecek Plazma ve Serum Örneklerinin Seçimi

Sitokin düzeylerinin ölçümünde; IFN-γ ELISA, antikor ELISA, ZN boyama, PZR ve kültür sonuçlarına göre paratüberküloz yönünden pozitif ve negatif olarak kabul edilen *kırkar* koyundan olmak üzere toplam 80 koyunun plazma veya serum örneğinden yararlanıldı.

3.2.9. IFN-γ Düzeylerinin Belirlenmesi

Hastalık teşhisinde kullanılan IFN-γ ELISA sonuçlarından yararlanılarak koyunların IFN-γ düzeyleri belirlendi. Bu amaçla 80 plazma örneğinin IFN-γ düzeyleri; avian PPD, bovine PPD ve steril PBS (Nil) ile uyarılmayı takiben uygulanan IFN-γ ELISA testinde kaydedilmiş OD değerlerinden yola çıkılarak değerlendirildi.

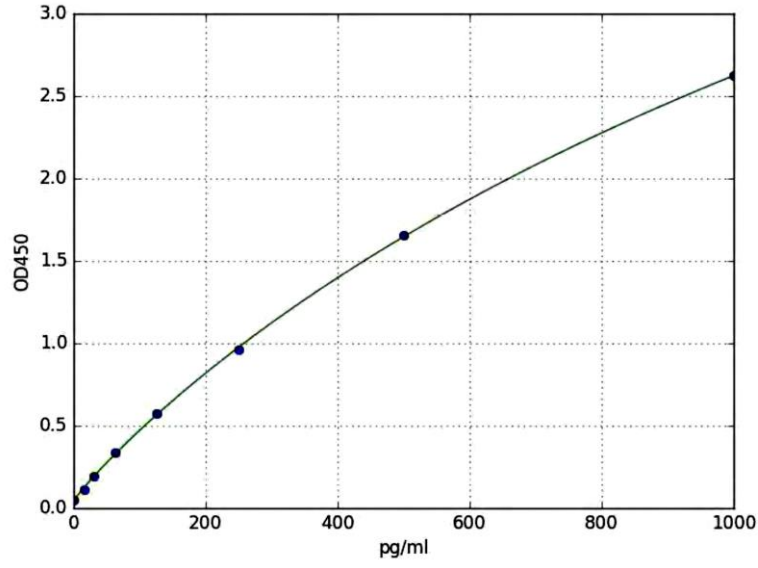
3.2.10. IL-10 Düzeylerinin Belirlenmesi

3.2.10.1. Testin Uygulanması

Test, kitin üretici firması tarafından bildirilen protokole göre uygulandı. Test prosedürüne göre; seçilen kan serumu örneklerinde IL-10 düzeyini kantitatif olarak belirleyebilmek için test edilecek örneklerdeki hedef protein konsantrasyonunu kitin optimum tespit aralığına (15.625-1000 pg/ml) düşürülmesi gerektiği için test prosedüründe belirtilen sulandırma faktörleri incelendi ve El-deeb ve ark. (2013) tarafından bildirildiği şekilde örnekler sulandırılmadan kullanıldı. İlk olarak, anti-IL-10 antikorları ile önceden kaplanmış olan pleyt standart, test ve kontrol (boş) örneklerinin konulacağı kuyucukların yeri belirlendi ve teste başlamadan önce pleyt 2 kez yıkandı. Hazırlanan standart solüsyonları ve seçilen koyun kan serumu örneklerinden 0,1 ml daha önce belirlenen kuyucuklara eklendi. Kontrol (boş) kuyucuğuna ise 0,1 ml sulandırma tamponu ilave edildi. Testte her bir standart çift olarak çalışıldı. Örnekler ilave edildikten sonra pleyt bir kapak ile kapatıldı ve 37°C'de 90 dakika inkübe edildi. Süre sonunda pleyt içeriği döküldü ve pleyt birkaç kez emici filtre kâğıdına vurulduktan sonra test örnekleri, standart ve kontrol kuyucuklarına 0,1 ml biotin tespit antikorunun çalışma solüsyonu ilave edildi. Pleyt bir kapak ile kapatılarak 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. Daha sonra pleyt yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı. Her bir kuyuya 0,1 ml SABC çalışma solüsyonu ilave edildi ve pleyt kapatılarak 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda pleyt, her seferinde yıkama tamponunun 1-2 dakika süreyle kuyucuklarda kalması sağlanarak 5 kez yıkandı. Her kuyucuğa 90 µl TMB substratı eklendi ve pleyt kapatılarak 37°C'de 30 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. Bu sürenin sonunda her bir kuyucuya 50 µl enzim durdurma solüsyonu eklenerek iyice karıştırıldı ve her kuyucuğun OD değeri 450 nm'lik bir filtre kullanılarak ELISA okuyucuda (Biotek, USA) okundu.

3.2.10.2. Testin Geçerlilik Kontrolü ve Örnek Sonuçlarının Hesaplanması

Test protokolündeki örnek eğride belirtildiği gibi (Şekil 3.10) standart çözeltinin (X) ilgili konsantrasyonuna (pg/ml) karşı her bir standart çözeltisinin relatif OD 450 değeri (Y) belirlenerek standart eğri çizildi.



Şekil 3.10. IL-10 düzeyinin hesaplanmasında kullanılacak örnek standart eğri.

Relatif OD 450 değeri; (Relatif/bağıl OD 450) = (Her kuyunun OD 450 değeri)-(Kontrol OD 450 değeri) formülüne göre hesaplandı. Formüle göre çizilen standart eğrinin doğrusal (lineer) olması sonucunda test geçerli kabul edildi ve örneklerin IL-10 konsantrasyonu standart eğri üzerinden hesaplandı.

3.2.11. NP Düzeylerinin Belirlenmesi

3.2.11.1. Testin Uygulanması

Test, kitin üretici firması tarafından bildirilen protokole göre uygulandı. Teste başlamadan önce tüm reaktifler ve örnekler oda ısısına ($22\pm 3^{\circ}\text{C}$) getirildi. Kit ile birlikte kullanıma hazır olarak temin edilen standartlar kullanılmadan önce 1-2 saniye düşük hızda santrifüj edildi. Daha sonra NP antikorları ile kaplı ELISA pleytinde standartlar ile test edilecek 80 kan serumu örneğinin yerleri belirlendi ve standartlar çift olarak çalışıldı. Serum örnekleri ile birlikte standartların 50 μl 'si NP antikorları ile kaplı mikroypletin uygun kuyucuklarına aktarıldı. Boş /negatif kontrol kuyucuğuna ise 50 μl numune sulandırıcı konuldu. Tüm kuyulara 100 μl konjugat ilave edildi ve pleyt kapatılarak 37°C 'de 60 dakika inkübe edildi. Süre sonunda pleyt ters çevrilerek inkübasyon karışımı uzaklaştırıldı ve yaklaşık 350 μl yıkama solüsyonu ile tüm

kuyucuklar dolduruldu. Yıkama solüsyonu kuyucuklarda 1 dakika bekletildikten sonra filtre kâğıdına vurularak uzaklaştırıldı ve bu işlem 4 defa tekrarlandı. Ardışık olarak, her kuyuya 50µl kromojen solüsyonu A ile 50µl kromojen solüsyonu B eklendi ve karanlık ortamda 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. Süre sonunda tüm kuyucuklara 50µl durdurma solüsyonu ilave edildi. Reaksiyon durdurulduktan sonra 5 dakika içinde her kuyucuğun OD değeri 450 nm'de ELISA okuyucuda (Biotek, USA) okundu.

3.2.11.2. Testin Geçerlilik Kontrolü ve Örnek Sonuçlarının Hesaplanması

Standartların ve örneklerin OD değerleri ölçüldükten sonra NP düzeylerinin hesaplanması için Microsoft Office® Excel programı kullanılarak çift olarak çalışılan standartların ortalama OD değerleri alındı ve kit protokolünde belirtilen formüle göre standart eğri çizildi (Tablo 3.9). Formüle göre çizilen standart eğrinin doğrusal (lineer) olması durumunda test geçerli kabul edildi ve örneklerin NP düzeyleri çizilen standart eğriye göre hesaplandı.

Tablo 3.9. NP düzeyinin hesaplanması için standart eğrinin çizilmesinde kullanılan formül.

Standartlar	0	S _I	S _{II}	S _{III}	S _{IV}	S _V	S _{VI}
OD (450 nm)	V _{B/K}	V _I	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅	V ₆
Hesaplama	0	V _I -V _{B/K}	V ₂ -V _{B/K}	V ₃ -V _{B/K}	V ₄ -V _{B/K}	V ₅ -V _{B/K}	V ₆ -V _{B/K}

S: standart, V_{B/K}: boş/negatif kontrol standardının OD değeri, V: ilgili standardın OD değeri.

3.2.12. İstatistiksel Analizler

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 20 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.) istatistik paket programı kullanıldı. Değişkenler için ortalama±standart sapma (SD), yüzde ve frekans değerleri kullanıldı. Ayrıca parametrik testlerin ön şartlarından varyansların homojenliği “*Levene Testi*” ile kontrol edildi. Normallik varsayımına ise “*Shapiro-Wilk Testi*” ile bakıldı. İki grup arasındaki farklılıklar değerlendirilmek istendiğinde parametrik test ön şartlarını sağladığı durumda “*Student’s t Test*”; sağlamadığında ise “*Mann Whitney-U Testi*” kullanıldı. Üç ve daha fazla grup karşılaştırması için “*Tek Yönlü Varyans Analizi*” ve çoklu karşılaştırma testlerinden “*Tukey HSD Testi*” ile ön

şartlar sağlanmadığında ise “*Kruskal Wallis*” ve çoklu karşılaştırma testlerinden “*Bonferroni-Dunn Testi*” kullanıldı. Sürekli iki değişken arasındaki ilişki “*Pearson Korelasyon Katsayısı*” ile parametrik test n şartlarını sağlamadığı durumda ise “*Spearman Korelasyon Katsayısı*” ile değerlendirildi. Kategorik veri analizi yapılırken “*Mc Nemar Bowker’s Test*”, “*Fisher’s Exact Test*”, “*Ki-Kare Testi*”, sensitivite ve spesifite hesaplamaları ile pozitif ve negatif beklenen değerler hesaplandı. Beklenen gözelerin %20’den küçük olduğu durumlarda bu gözelerin analize dâhil edilmesi için “*Monte Carlo Simulasyon Yöntemi*” ile değerler belirlendi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ ve $p<0,01$ olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

Kan ve gaita örneklerinin alındığı 2 ile 8 yaş arasındaki koyunların VKS'lerinin 1 ile 5 arasında değiştiği belirlendi. Örneklemeye yapılan 15 işletmeden sadece üçünde (11, 12 ve 14 numaralı işletmeler) ishal ve zayıflık gibi paratüberküloz ile ilişkili olabilecek bazı klinik bulguların mevcut olduğu, geri kalan 12 işletmede ise herhangi bir hastalık veya verim düşüklüğü gözlenmediği sürü sahiplerinden öğrenildi. Örneklemeye sırasında 150 koyunun 49 (%32,66)'unda ishal tespit edildi. İshal bulgusu en fazla 2-3 yaş grubunda (%40) ve bu gruptaki VKS 1 olarak değerlendirilen koyunlarda (%63,63) görüldü. Yaş grupları ile VKS ve ishal bulgusu arasındaki fark ($p<0,01$) istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Koyunların VKS'ları ile yaş ve ishal görülme durumları tablo 4.1'de verildi. Özellikle 11 numaralı işletmede örnek alınan 10 koyundan 8'inde sürekli ve fişkırr tarzda yeşilimsi ishal gözlemlendi (Şekil 4.1A). Paratüberküloz yönünden pozitif olarak değerlendirilen ve VKS 1 olarak belirlenen üç koyuna ait fotoğraflar şekil 4.1'de verildi.

Tablo 4.1. Kan ve gaita örneklerinin alındığı koyunların VKS'ları ile yaş ve ishal durumları.

VKS	Yaş Grubu					
	2-3 yaş		4 yaş		5-8 yaş	
	n	İshal	n	İshal	n	İshal
1	11	7	14	3	19	3
2	11	5	8	2	10	4
3	26	10	13	8	15	4
4	8	2	3	0	3	1
5	4	0	5	0	0	0
Toplam	60	24	43	13	47	12

VKS: vücut kondüsyon skoru, n: koyun sayısı

4.2. Rose Bengal Pleyt Testi

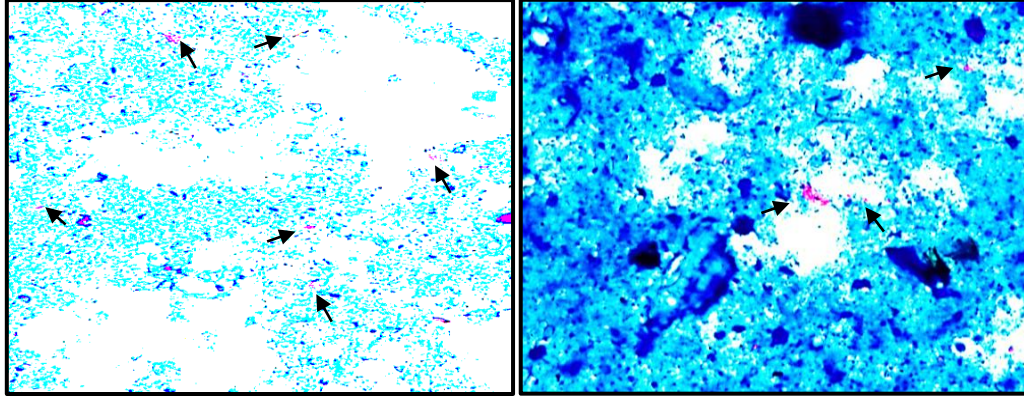
Rose Bengal pleyt test ile incelenen 150 kan serumu örneği brusellozis yönünden negatif bulundu.



Şekil 4.1. Paratüberküloz yönünden pozitif olarak değerlendirilen ve VKS 1 olarak belirlenen koyunlar. **A.** 110 numaralı koyun, 4 yaşında ve ishal mevcut (ZN boyama, PZR ve antikor ELISA pozitif), **B.** 79 numaralı koyun, 7 yaşında ve ishal mevcut (ZN boyama ve PZR pozitif), **C.** 119 numaralı koyun, 6 yaşında ve gaita kıvamı normal (antikor ELISA pozitif).

4.3. Bakteriyoskopi

Direk gaita ile dekontaminasyon sonrası elde edilen gaita sedimentlerinden hazırlanan preparatların incelenmesinde 2, 9 ve 13 numaralı işletmeler haricindeki diğer işletmelerde AFB'ler tespit edildi. Gaita örneklerinden direkt hazırlanan preparatların 33'ünde, sedimentlerinden hazırlanan preparatların ise 41'inde AFB'ler görüldü (Şekil 4.2). Sedimentlerden hazırlanan preparatlarda hem AFB görülmesinde ve hem de preparattaki AFB sayısında artış saptanmasına rağmen, her iki şekilde de hazırlanan preparatların genellikle her 100 sahasında 1-9 AFB görüldü (Tablo 4.2). Bakteriyoskopi sonuçları karşılaştırıldığında; yöntemler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,01$). Altın standart test olarak kabul edilen kültür sonuçları göz önünde bulundurularak direk gaita ve gaita sedimentinden yapılan ZN boyama yöntemlerinin sensitivite ve spesifiteleri sırasıyla %60-%79 ve %80-%74 olarak hesaplandı.



Şekil 4.2. Gaita örneklerinde ZN boyama yöntemi ile AFB’lerin mikroskopik görüntüsü (1000X).

Tablo 4.2. Gaita ve gaita sedimentinden hazırlanan preparatların ZN boyama sonuçları.

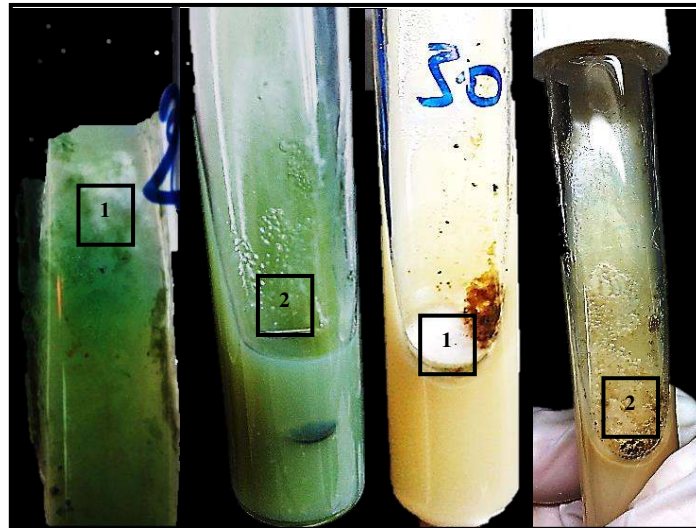
İşletme No	Gaita				Gaita Sedimenti			
	Skor				Skor			
	0	1+	2+	3+	0	1+	2+	3+
1	9	1	0	0	9	1	0	0
2	10	0	0	0	10	0	0	0
3	9	1	0	0	8	2	0	0
4	9	1	0	0	9	1	0	0
5	5	5	0	0	5	5	0	0
6	6	3	1	0	6	3	1	0
7	9	1	0	0	8	2	0	0
8	8	1	1	0	8	1	1	0
9	10	0	0	0	10	0	0	0
10	6	3	0	1	4	5	0	1
11	3	7	0	0	2	8	0	0
12	7	3	0	0	7	3	0	0
13	10	0	0	0	10	0	0	0
14	10	0	0	0	8	1	1	0
15	6	3	1	0	5	3	1	1
Toplam	117	29	3	1	109	35	4	2

4.4. Kültür

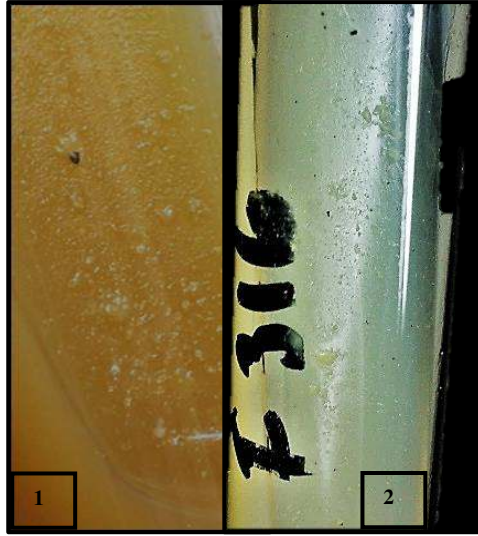
Dekontaminasyon işleminden sonra gaita süspansiyonları inoküle edilen ve 36 hafta süreyle inkübasyona bırakılan HEYM ve modifiye Middlebrook 7H10 besiyerlerinin yüzeyindeki üremeler haftalık olarak kaydedildi. Her iki besiyerinde de inokülasyondan 12 gün sonra kontaminasyon tespit edilmeye başlandı. İnkübasyon işleminin sonlandırıldığı 36. haftada HEYM’de 52, modifiye Middlebrook 7H10

besiyerinde ise 70 örnekte kontaminasyon belirlendi. Kontaminasyon olduğu düşünülen kolonilerden boyamalar yapıldı ve modifiye Middlebrook 7H10 agarda 4'ünün, HEYM besiyerinde ise 5'inin mantar kolonisi, diğer kolonilerin ise sporlu ve *Bacillus* sp. kolonisi olduğu belirlendi (Şekil 4.3). Besiyerlerinde kontamine koloni sayısı az ve küçük olduğunda inkübasyon işlemine devam edildi. Ancak kuruma nedeniyle 1 HEYM ile yoğun kontaminasyonun gözleendiği 12 HEYM ve 36 modifiye Middlebrook 7H10 besiyerinde inkübasyon işlemi sonlandırıldı.

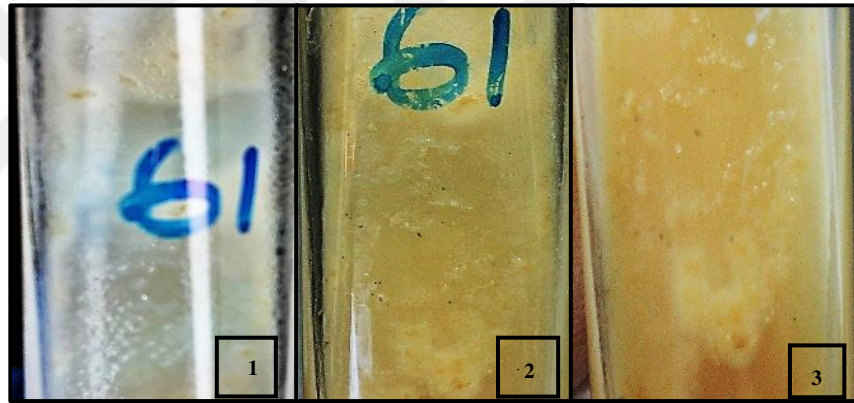
Referans *Map* 316 F suşuna ait ilk koloniler ekim yapılan HEYM ve modifiye Middlebrook 7H10 besiyerlerinde 5 hafta sonra tespit edildi (Şekil 4.4). Gaita örneklerinden yapılan ekimlerde ise HEYM'de tüm inkübasyon süresince *Map* kolonisine benzer bir üreme görülmezken, modifiye Middlebrook 7H10 agar yüzeyinde *Map* şüpheli ilk koloniler inkübasyonun başlangıcından 20 hafta sonra gözlenmeye başladı. Şüpheli kolonilerin dışbükey, *smooth*, nemli, parlak, soluk beyaz renkte olduğu ve besiyerinin rengine çok benzediği dikkati çekti (Şekil 4.5). Besiyerlerinde gözlenen tüm şüpheli koloniler ZN boyama yöntemi ile boyanarak incelendi. 36 haftanın sonunda sadece 5 gaita örneğinin (46, 61, 102, 103, 108 numaralı örnekler) modifiye Middlebrook 7H10 agar yüzeyinde gelişen şüpheli kolonilerinden hazırlanan preparatlar AFB'ler yönünden pozitif bulundu.



Şekil 4.3. HEYM ve modifiye Middlebrook 7H10 besiyerlerinin yüzeyinde gözlenen mantar (1) ve *Bacillus* sp. (2) kolonileri.



Şekil 4.4. *Map* 316 F referans suşunun HEYM (1) ve modifiye Middlebrook 7H10 agar (2) yüzeyinde gelişen kolonileri.

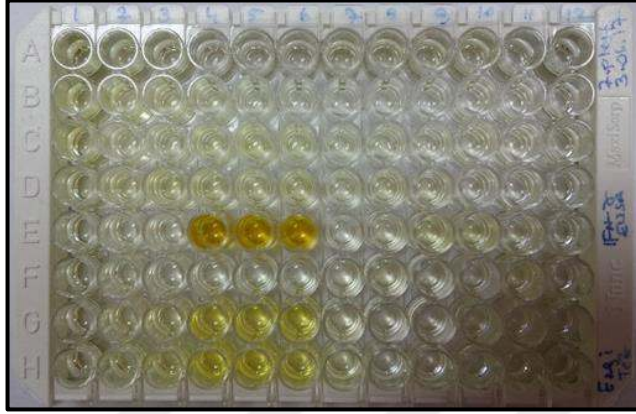


Şekil 4.5. Modifiye Middlebrook 7H10 agar yüzeyinde *Map* şüpheli koloniler. 61 numaralı örneğin 20. hafta (1), 23. hafta (2) ve 36.haftadaki (3) görünümü.

4.5. IFN- γ ELISA

Avian PPD, bovine PPD ve nil antijeni ile uyarılan 150 kan plazması IFN- γ ELISA ile incelendi ve test sonucunda elde edilen OD değerleri kaydedilerek kit protokolüne göre değerlendirildi (Şekil 4.6). IFN- γ ELISA kit protokolüne göre tüm hayvanlar tüberküloz yönünden negatif olarak değerlendirildi. Kit protokolünün yanı sıra avian PPD antijeni ile uyarılmış IFN- γ OD'sinden nil antijeni ile uyarılmış IFN- γ OD'si çıkarıldığında farkın 0,05'e eşit veya büyük olması ve avian PPD antijeni ile uyarılmış IFN- γ OD'sinin bovine PPD antijeni ile uyarılmış IFN- γ OD'sinden büyük olması durumunda hayvan paratüberküloz yönünden pozitif kabul edildi. Bu kriterlere

göre; IFN- γ ELISA ile 150 koyundan 33 (%22)'ü paratüberküloz yönünden pozitif olarak değerlendirildi. İşletmelerden ise ikisi (10 ve 12 numaralı) hariç diğerlerinde 1 ile 5 arasında koyun pozitif bulundu (Tablo 4.3).



Şekil 4.6. Koyun plazma örneklerinin IFN- γ ELISA sonucu (E4, E5, E6 pozitif kontrol, F4, F5, F6 negatif kontrol, diğer kuyucuklar ise örnekler için kullanıldı).

Tablo 4.3. Paratüberküloz yönünden incelenen koyun işletmelerinin IFN- γ ELISA ve antikor ELISA sonuçları.

İşletme No	IFN- γ ELISA		Antikor ELISA		
	Pozitif (n)	Negatif (n)	Pozitif (n)	Şüpheli (n)	Negatif (n)
1	4	6	0	0	10
2	3	7	0	0	10
3	1	9	0	0	10
4	2	8	0	0	10
5	2	8	0	0	10
6	3	7	1	0	9
7	5	5	1	1	8
8	4	6	1	0	9
9	1	9	0	0	10
10	0	10	1	0	9
11	2	8	5	0	5
12	0	10	1	0	9
13	2	8	1	0	9
14	3	7	3	0	7
15	1	9	2	0	8
Toplam n (%)	33 (22)	117 (78)	16 (10,66)	1 (0,66)	133 (88,66)

n: koyun sayısı

Yaşları 2 ile 8 (ortalama $4\pm1,34$) arasında olan 150 koyundan IFN- γ ELISA ile pozitif olarak belirlenen hayvanların ortalama yaşı $3,81\pm1,37$, negatif hayvanların ortalama yaşı ise $4,04\pm1,33$ olarak belirlendi. IFN- γ ELISA ile en yüksek oranda (%25) pozitiflik 2-3 yaş aralığındaki koyunlarda saptanırken, pozitiflik 4 yaşlı hayvanlarda %23,25; 5-8 yaş aralığındaki hayvanlarda ise %17,02 olarak tespit edildi (Tablo 4.4). IFN- γ ELISA ile paratüberküloz pozitif ve negatif olarak belirlenen hayvanların test sonuçları ile yaş grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

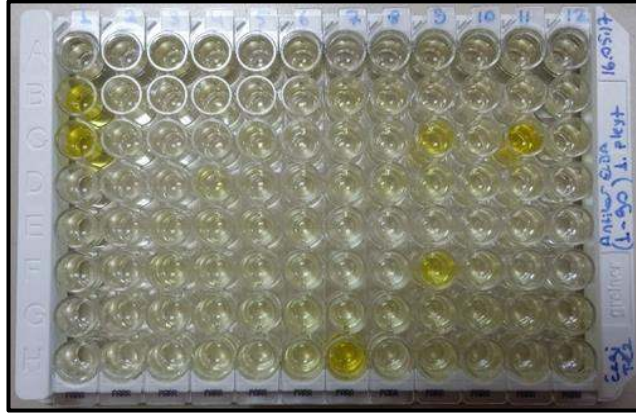
Tablo 4.4. Paratüberküloz yönünden incelenen koyunların yaş gruplarına göre IFN- γ ELISA sonuçları.

Yaş Grubu	IFN- γ ELISA			
	Pozitif		Negatif	
	n	%	n	%
2-3 yaş (n=60)	15	25	45	75
4 yaş (n=43)	10	23,25	33	76,75
5-8 yaş (n=47)	8	17,02	39	82,98
Toplam	33	22	117	78

n: koyun sayısı

4.6. Antikor ELISA

ELISA ile incelenen kan serumlarından elde edilen sonuçlar kit protokolüne göre değerlendirilerek hesaplamaları yapıldı (Şekil 4.7). Bu sonuçlara göre; 150 koyunun *Map*’e karşı gelişen antikorlar yönünden 16’sı (%10,66) pozitif, 1’i (%0,66) şüpheli olarak belirlendi. Örnek alınan 15 koyun işletmesinin ise 9 (%60)’unda en az bir hayvan paratüberküloz yönünden pozitif saptanırken, 1, 2, 3, 4, 5 ve 9 numaralı işletmelerde antikor pozitif hayvan tespit edilemedi (Tablo 4.3).



Şekil 4.7. Koyun kan serumu örneklerinin ELISA sonuçları (A1 negatif kontrol, B1 ve C1 pozitif kontrol, diğer kuyucuklar ise örnekler için kullanıldı).

Yaşları 2 ile 8 (ortalama $4 \pm 1,34$) arasında değişen 150 koyundan antikör ELISA ile pozitif saptananların ortalama yaşı $4.25 \pm 1,39$ (3-8 yaş), negatiflerin ortalama yaşı $3,97 \pm 1,34$ (2-8 yaş), şüpheli bulunan bir hayvanın yaşı ise 4 olarak belirlendi. Antikör ELISA ile en yüksek oranda (%12,6) pozitiflik 5-8 yaş aralığında saptanırken, pozitiflik 2-3 yaş aralığında %10, 4 yaşlı koyunlarda ise %9,3 olarak tespit edildi (Tablo 4.5). Antikör ELISA ile pozitif ve negatif olarak belirlenen hayvanların test sonuçları ile yaş grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$).

Tablo 4.5. Paratüberküloz yönünden incelenen koyunların yaş gruplarına göre antikör ELISA sonuçları.

Yaş Grubu	Antikör ELISA					
	Pozitif		Şüpheli		Negatif	
	n	%	n	%	n	%
2-3 yaş (n=60)	6	10	0	0	54	90
4 yaş (n=43)	4	9,3	1	2,32	38	88,37
5-8 yaş (n=47)	6	12,76	0	0	41	87,23
Toplam	16	10,66	1	0,66	133	88,66

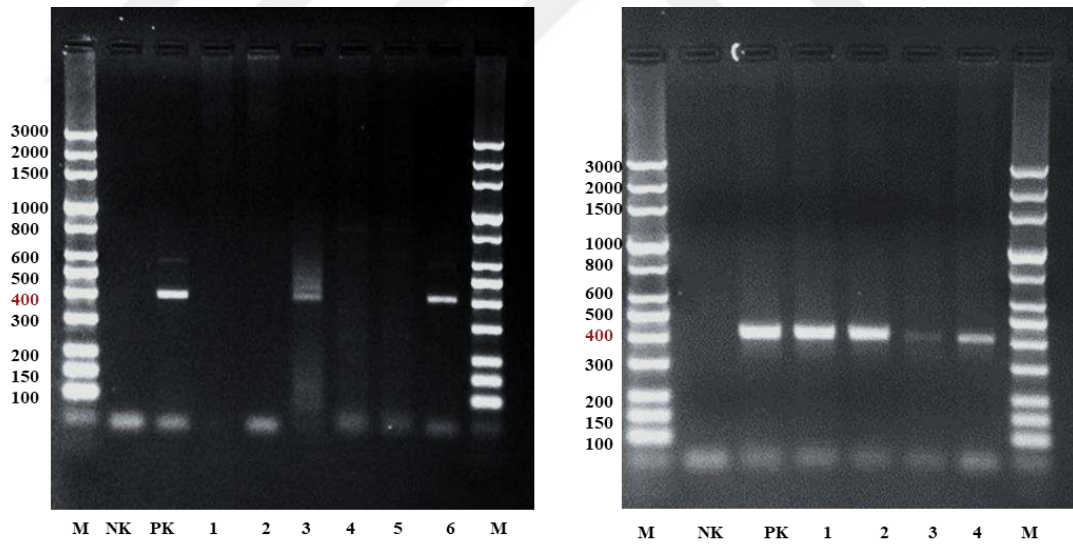
n: koyun sayısı

4.7. Gaita Örneklerinin PZR Analizi

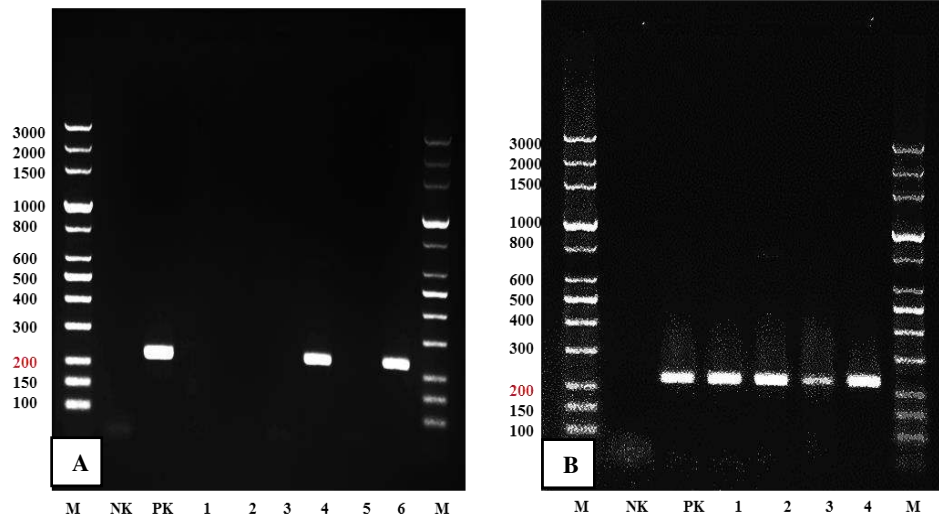
Direk gaita örneklerinden izole edilen 150 DNA örneğinin P90/P91 (400 bp) primer çifti kullanılarak uygulanan iki farklı PZR protokolünün her ikisinde de sadece 4 (%2,66)'ü IS900 gen bölgesi yönünden pozitif saptandı (Şekil 4.8). Birinci PZR

protokolünde ayrıca 500 bp’de non-spesifik DNA bantları tespit edildi. 150C/921 (229 bp) primer çifti ile ise 40 (%26.66)’ında IS900 gen bölgesi tespit edildi (Şekil 4.9). IS900 gen bölgesinin tespitinde primer çiftleri arasındaki fark istatistiksel yönden önemli bulundu ($p<0,01$).

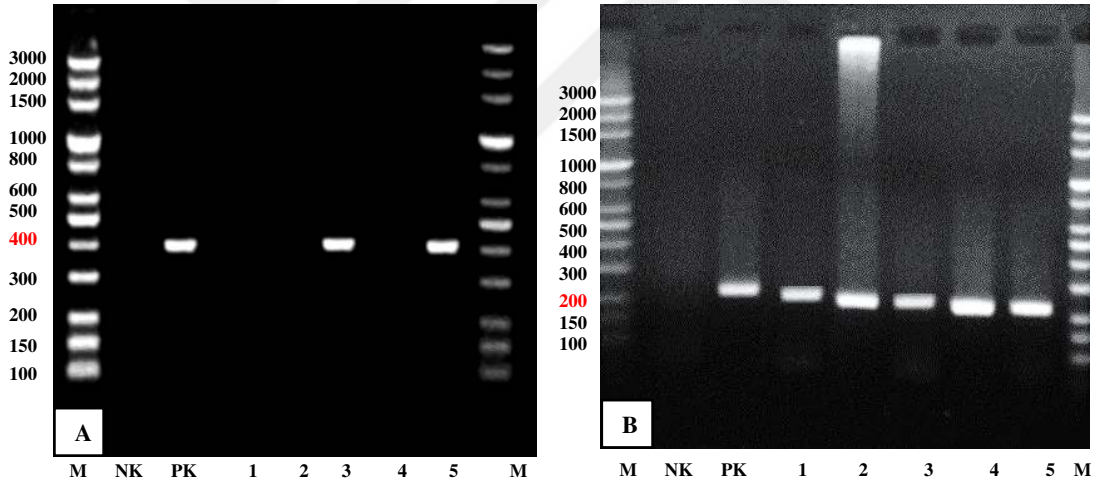
Primerler arasında farklı sonuçlar elde edilmesi nedeniyle P90/P91 primer çifti ile çalışılan tüm PZR ürünlerine 150C/921 primer çifti ile nested PZR uygulandı. Nested PZR analizinde ise 150 gaita örneğinden elde edilen DNA’ların 40 (%26.66)’ı *Map*’e spesifik olan IS900 gen bölgesi yönünden pozitif saptandı (Şekil 4.10). Nested PZR ile 150C/921 (229 bp) primer çiftinin kullanıldığı klasik PZR ile benzer pozitif sonuçlar elde edildi (Şekil 4.11). Bu sonuçlara göre; 2, 4, 9 ve 13 numaralı işletmelerde *Map*’e spesifik IS900 gen bölgesine sahip pozitif hayvan tespit edilemez iken, 1 ve 8 numaralı işletmelerde sadece birer hayvan, diğer işletmelerde ise 2 ile 7 arasında hayvan pozitif olarak belirlendi. PZR analizlerine göre pozitiflik saptanan işletmeler ve hayvan sayıları tablo 4.6’da verildi.



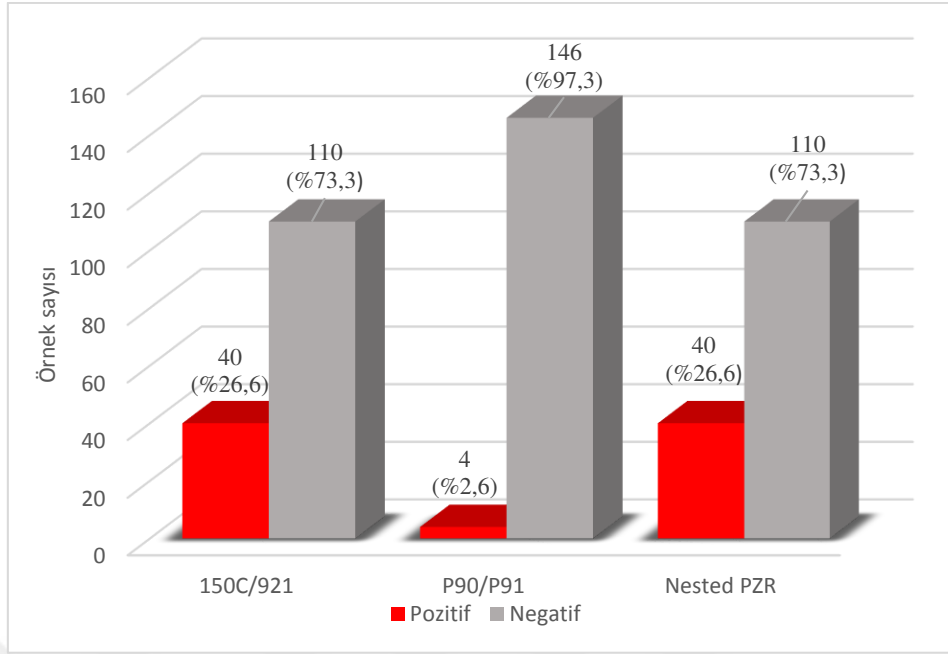
Şekil 4.8. P90/P91 (400 bp) primer çifti kullanılarak uygulanan PZR sonuçları. M: marker, NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol (*Map* 316 F suşu), A: 3 ve 6 pozitif (69 ve 110 numaralı örnek), 1, 2, 4, 5 negatif örnekler (67, 68, 70, 71 numaralı örnek), B: 1-4 pozitif örnekler (69, 110, 144, 146 numaralı örnek).



Şekil 4.9. 150C/921 (229 bp) primer çifti kullanılarak uygulanan PZR analizi sonuçları. M: marker, NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol (*Map* 316 F suşu), A: 4 ve 6 pozitif (44 ve 46 numaralı örnek), 1-3, 5 negatif örnekler (41, 42, 43 ve 45 numaralı örnek), B: 1-4 pozitif (53, 138, 146 ve 147 numaralı örnek).



Şekil 4.10. Nested PZR sonuçları. M: marker, NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol (*Map* 316 F suşu), A: P90/P91 (400 bp) primer çifti kullanılarak uygulanan 1. PZR (1: 102, 2: 108, 3: 110, 4: 142, 5: 144 numaralı örnek), B: 150C/921 (229 bp) primer çifti kullanılarak uygulanan 2. PZR (1: 102, 2: 108, 3: 110, 4: 142, 5: 144 numaralı örnek).



Şekil 4.11. Map spesifik IS900 gen bölgesine yönelik 150C/921 ve P90/91 primer çiftleri ile uygulanan PZR ve nested PZR sonuçları.

Tablo 4.6. Gaita örneklerinde PZR ile paratüberküloz yönünden pozitiflik saptanan işletmeler ile koyun sayıları.

İşletme No	PZR (P90/P91)		PZR (150C/921) / Nested PZR	
	Pozitif (n)	Negatif (n)	Pozitif (n)	Negatif (n)
1	0	10	1	9
2	0	10	0	10
3	0	10	2	8
4	0	10	0	10
5	0	10	6	4
6	0	10	5	5
7	1	9	2	8
8	0	10	1	9
9	0	10	0	10
10	0	10	7	3
11	1	9	6	4
12	0	10	3	7
13	0	10	0	10
14	0	10	2	8
15	2	8	5	5
Toplam n (%)	4 (2,66)	146 (97,33)	40 (26,66)	110 (73,33)

n: koyun sayısı

Yaşları 2 ile 8 (ortalama $4\pm1,34$) arasında değişen 150 koyuna ait gaita örneğinin PZR analizlerine paratüberküloz pozitif saptanan hayvanların ortalama yaşı $4,02\pm1,18$ (2-7 yaş), negatif hayvanların ortalama yaşı ise $4\pm1,40$ (2-8 yaş) olarak tespit edildi. PZR ile en yüksek oranda (%29,78) pozitiflik 5-8 yaş aralığındaki koyunlarda saptandı. Pozitiflik 4 yaşlı koyunlarda %25,58; 2-3 yaş aralığındaki koyunlarda ise %25 olarak tespit edildi (Tablo 4.7). PZR ile paratüberküloz pozitif ve negatif olarak belirlenen hayvanların test sonuçları ile yaş grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.7. Paratüberküloz yönünden incelenen koyunların yaş gruplarına göre PZR sonuçları.

Yaş Grubu	PZR			
	Pozitif		Negatif	
	n	%	n	%
2-3 yaş (n=60)	15	25	45	75
4 yaş (n=43)	11	25,58	32	74,42
5-8 yaş (n=47)	14	29,78	33	70,22
Toplam	40	26,66	110	73,34

n: koyun sayısı

4.8. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizinde; sadece 150C/921 (229 bp) primer çifti ile (138 numaralı örnek) pozitif (Tablo 4.8) ve her iki primer çifti ile (146 numaralı örnek) pozitif (Tablo 4.9) olarak değerlendirilen örneklerin *Map* olduğu doğrulandı. P90/P91 primer çifti ile 500 bp’de bant oluşturan örnek (21 numaralı) ise *Pseudomonas* sp. olarak belirlendi (Tablo 4.10).

Tablo 4.8. PZR analizinde pozitif olarak belirlenen 2 örneğin DNA dizi analizi.

DNA	Primer Çifti (bp)	DNA Dizi Analizi Sonucu (5'-3')
146	P90/P91 (400 bp)	AAGGGTGTGTTGGGCGTCGGCCTTAGGCTT CGAATTGCCCAGGGACGTCGGGTATGGCTT TCATGTGGTTGCTGTGTTGGATGGCCGAAG GAGATTGGCCGCCCCGGCGTCCCGCGACGAC TCGACCGCTAATTGAGAGATGCGATTGGAT CGCTGTGTAAGGACACGTCGGCGTGGTCGT CTGCTGGGTTGATCTGGACAATGACGGTTA CGGAGGTGGTTGTGGCACAATCTGTCTGGG CGGGCGTGGACGCCGGTAAGGCCGACCATT ACTGCATGGTTATTAACGACGACGCGCAGC GATTGCTCTCGCAGCGGGTGGCCAACGACG AGGCCGCGCTGCTGGAGTTGATTGCGGCGG TGACGACGTTGGCCGATGGAGGCGAGGTCA CTGG
138	150C/921 (229 bp)	CCGCTAATTGACTGATGCGATTGGATCGCT GTGTAAGGACACGTCGGCGTGGTCGTCTGC TGGGTTGATCTGGACAATGACGGTTACGGA GGTGGTTGTGGCACAACCTGTCTGGGCGGG CGTGGACGCCGGTAAGGCCGACCATTACTG CATGGTTATTAACGACGACGCGCAGCGATT GCTCTCGCAGCGGGTGGCCAACGACGAGGC CGCGCTGCTGGAGTTGATT

Tablo 4.9. Nested PZR ile pozitif olarak belirlenen örneğin 1. ve 2. PZR ürünlerinin DNA dizi analizi.

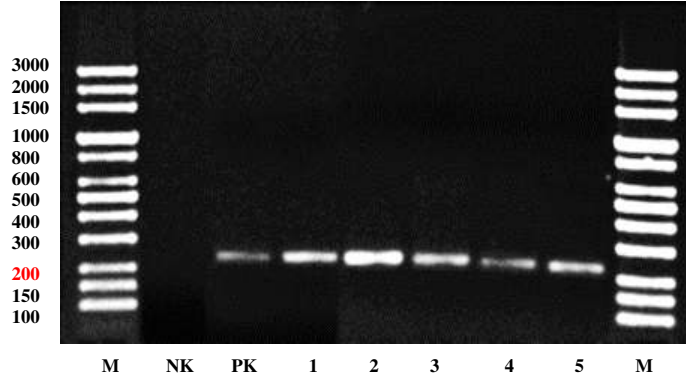
DNA	Primer Çifti (bp)	DNA Dizi Analizi Sonucu (5'-3')
146	(1. PZR) P90/P91 (400 bp)	AAGGGTGTTTGGGCGTCGGCCTTAGGCTT CGAATTGCCCAGGGACGTCGGGTATGGCTT TCATGTGGTTGCTGTGTTGGATGGCCGAAG GAGATTGGCCGCCCCGGCGTCCCGCGACGAC TCGACCGCTAATTGAGAGATGCGATTGGAT CGCTGTGTAAGGACACGTCGGCGTGGTCGT CTGCTGGGTTGATCTGGACAATGACGGTTA CGGAGGTGGTTGTGGCACAATCTGTCTGGG CGGGCGTGGACGCCGGTAAGGCCGACCATT ACTGCATGGTTATTAACGACGACGCGCAGC GATTGCTCTCGCAGCGGGTGGCCAACGACG AGGCCGCGCTGCTGGAGTTGATTGCGGCGG TGACGACGTTGGCCGATGGAGGCGAGGTCA CTGG
146	(2. PZR) 150C/921 (229 bp)	AAGGGTGTTTGGGGCCGTCGGCCTTAGGCT TCGAATTGCCCAGGGACGTCGGGTATGGCT TTCATGTGGTTGCTGTGTTGGATGGCCGAAG GAGATTGGCCGCCCCGGCGTCCCGCGACGAC TCGACCGCTAATTGAGAGATGCGATTGGAT CGCTGTGTAAGGACACGTCGGCGTGGTCGT CTGCTGGGTTGATCTGGACAATGACGGTTA CGGAGGTGGTTGTGGCACAATCTGTCTGGG CGGGCGTGGACGCCGGTAAGGCCGACCATT ACTGCATGGTTATTAACGGACGACGGCGCG ATTGCTCTCGCAGCGGGTGGCCAAC

Tablo 4.10. P90/P91 primer çifti ile 500 bp’de non-spesifik bant gözlenen bir örneğin DNA dizi analizi.

DNA	Primer Çifti	DNA Dizi Analizi Sonucu (5'-3')
21	P90/P91	TTCGGGGCCGTCTCAACGTGCTGGTCAATA CCCTGGGCAAGAACCCGCGTGACCTGTTC GATGAGTTCTGAAGGCAAGAAGATGATCGA CCTGGGGTCCGGTGACGTTAAATATCACC AGGGCTTCTCGTCCAACGTCATGACCTCCG GCGGCGAAGTCCATCTGGCCCTGTCGTTCA ACCCTTCTCACCTGGAAATCGTTTCTCCGG TGGTCGAAGGTTCCGTGCGCGCCCGTCAG GATCGTCGCAAGGATGCAGCCGGTGACAA GGTCGTTCCGATCAGCATTACGGCGACG CCGCCTTCGCTGGTCAGGGCGTGGTCATG GAGACATTCCAGATGTCCCAGACCCGTGC TTACAAGACTGGCGGCACTGTACATATCG TGATCAACAATCAGGTCGGCTTTACCACC AACCGCCAGGATGACGCCCCTCCACCGA ATATTGCACCGACATCGCCAAGATGATTC AGGCACCGATCTTCCATGTGAATGGTGAT GATCCGGAAGCCGTGCTATTCGTGACCCA ACTGGCCGTTGACTATCGTATGCAGTTCAA GCGTCACGTG

4.9. *Map* Kolonilerinin PZR ile Doğrulaması

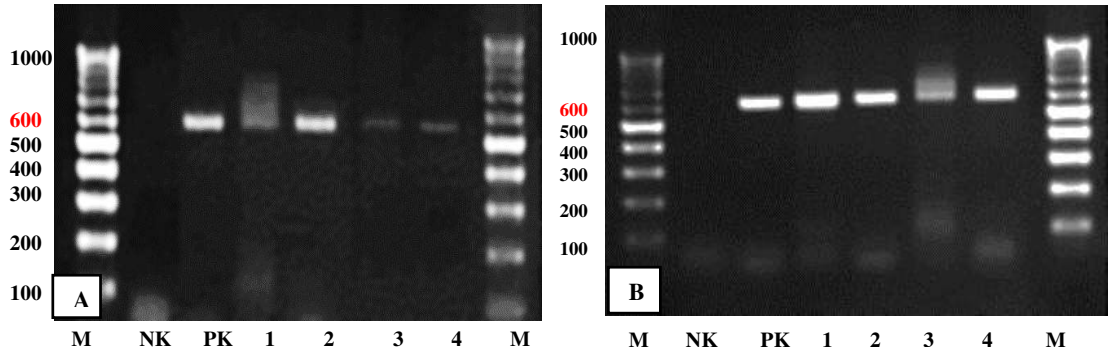
Modifiye Middlebrook agar yüzeyinde gelişen 5 farklı gaita örneğine ait şüpheli kolonilerden elde edilen DNA örneklerinin P90/P91 primer çifti ile uygulanan PZR analizinde 400 bp’de *Map*’e spesifik pozitif bant saptanamadı. 150C/921 primer çifti ile uygulanan PZR ve nested PZR analizlerinde ise *Map*’e spesifik pozitif bantlar belirlenerek 5 izolatın *Map* olduğu doğrulandı (Şekli 4.12).



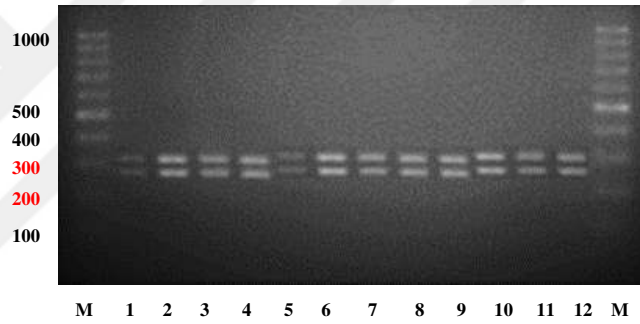
Şekil 4.12. İzole edilen 5 *Map* izolatının 150C/921 (229 bp) primer çifti kullanılarak uygulanan PZR analizi sonuçları. M: marker, NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol (*Map* 316 F suşu), 1: 46, 2: 61, 3: 102, 4: 103, 5: 108 numaralı örnek.

4.10. PZR-REA

Gaita ve kültürden izole edildikten sonra *IS900* gen bölgesi tespit edilerek *Map* olduğu doğrulanan DNA örneklerinin tiplendirilmesi PZR-REA ile yapıldı. *IS1311* gen bölgesine yönelik M56 ve M119 primer çifti kullanılarak uygulanan PZR analizi sonucunda; kültür ve gaitadan izole edilen DNA örneklerinde 608 bp’de pozitif bant saptandı (Şekil 4.13). Kültürden izole edilen 5 DNA örneğinin PZR ürünü ile gaitadan elde edilen ancak kültür yöntemi ile *Map* yönünden negatif bulunan ve 608 bp’de güçlü pozitif bant veren 7 DNA örneğinin PZR ürünleri *HinfI* ve *MseI* enzimleri ile kesildi. Analiz sonucunda 12 örneğin hepsinde 285 bp ve 323 bp’de olmak üzere koyun tipine (S) spesifik iki bant görüntüldü (Şekil 4.14).



Şekil 4.13. IS1311 gen bölgesine yönelik uygulanan PZR analizinde 608 bp’de bant saptanan DNA örnekleri. M: marker, NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol (*Map* 316 F suşu), A: gaitadan izole edilen DNA örnekleri (1: 44, 2: 138, 3:110, 4: 112 numaralı örnek), B: kültürden izole edilen DNA örnekleri (1:46, 2:61, 3: 102, 4: 103 numaralı örnek).



Şekil 4.14. IS1311 gen bölgesi pozitif bulunan PZR ürünlerinin REA sonuçları. M: marker, 1-5 kültürden izole edilen DNA’ların PZR ürünleri (46, 61, 102, 103 108 numaralı örnek), 6-12 gaitadan izole edilen DNA’ların PZR ürünleri (53, 69, 96, 138, 142, 144, 146 numaralı örnek).

4.11.Tanı Yöntemlerinin Karşılaştırması

Tanı testleri içinde koyunlarda en yüksek oranda pozitiflik ZN boyama (%27,33) ve PZR (%26,66) ile saptandı. Bunu sırasıyla IFN- γ ELISA (%22), antikor ELISA (%10,67) ve kültür (%3,33) yöntemleri izledi. Sürü bazında değerlendirildiğinde; en yüksek pozitiflik oranı IFN- γ ELISA (%86,67) testi ile elde edildi ve bu oran PZR ile ZN boyamada %73,33, antikor ELISA’da %60, kültürde ise %20 olarak saptandı (Tablo 4.11). Kültür yöntemi ile elde edilen 5 *Map* izolatının 4’ü antikor ELISA ile pozitiflik saptanan sürülerden (7 ve 11 numaralı), 1’i ise negatif olarak belirlenen sürüden (5 numaralı) izole edildi. *Map* izolasyonu yapılan 46, 61, 102, 103 ve 108 numaralı 5 koyunun diğer testlerindeki analiz sonuçları tablo 4.12’de

verildi. Altın standart test olarak kabul edilen kültür sonuçları göz önünde bulundurularak paratüberkülozun teşhisinde kullanılan ZN boyama, PZR, IFN- γ ve antikor ELISA testlerinin sensitivite ve spesifiteleri sırasıyla %80-%74; %60-74; %20-% 77; %20-%89 olarak hesaplandı.

Tablo 4.11. Tanı testlerine göre paratüberküloz pozitif saptanan sürü ve koyun sayıları.

Tanı Testleri	Sürü Sayısı (n: 15)				Örnek Sayısı (n: 150)					
	Pozitif		Negatif		Pozitif		Şüpheli		Negatif	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
IFN- γ ELISA	13	86,67	2	13,33	33	22	0	0	117	78
Antikor ELISA	9	60	6	40	16	10,67	1	0,67	133	88,66
PZR	11	73,33	4	26,67	40	26,67	0	0	110	73,33
ZN boyama	11	73,33	4	26,67	41	27,33	0	0	109	72,67
Kültür	3	20	12	80	5	3,33	0	0	145	96,67

n: koyun sayısı

Tablo 4.12. Kültür yöntemi ile *Map* izole edilen 5 koyunun diğer test sonuçları.

Koyun No	ZN Boyama	Antikor ELISA	IFN- γ ELISA	PZR
46	+	-	-	+
61	-	-	+	-
102	+	-	-	+
103	+	+	-	-
108	+	-	-	+

Tanı amacıyla kullanılan 5 yöntemin (IFN- γ ELISA, antikor ELISA, ZN boyama, PZR ve kültür) hepsinde pozitif sonuç veren koyun tespit edilmedi. Paratüberküloz yönünden incelenen 150 koyunun test sonuçları tablo 4.13'te verildi.

Tablo 4.13. Paratüberküloz yönünden incelenen 150 koyunun test sonuçları.

İşletme No	Hayvan No	Yaş	VKS	İshal	IFN- γ ELISA	Antikor ELISA	ZN Boyama	PZR	Kültür
1	1	4	3	-	-	-	-	-	-
	2	3	4	-	-	-	-	-	-
	3	3	3	-	+	-	-	-	-
	4	3	3	-	+	-	-	-	-
	5	5	2	-	-	-	-	-	-
	6	3	3	-	-	-	-	-	-
	7	3	2	-	+	-	-	-	-
	8	3	3	-	-	-	-	-	-
	9	3	3	-	-	-	-	-	-
	10	2	3	+	+	-	+	+	-
2	11	4	3	-	-	-	-	-	-
	12	4	3	+	-	-	-	-	-
	13	3	3	+	+	-	-	-	-
	14	4	3	+	-	-	-	-	-
	15	3	2	+	-	-	-	-	-
	16	3	3	+	-	-	-	-	-
	17	3	2	-	-	-	-	-	-
	18	3	3	+	+	-	-	-	-
	19	3	3	+	+	-	-	-	-
	20	3	3	-	-	-	-	-	-

Tablo 4.13. (Devam) Paratüberküloz yönünden incelenen 150 koyunun test sonuçları.

İşletme No	Hayvan No	Yaş	VKS	İshal	IFN- γ ELISA	Antikor ELISA	ZN Boyama	PZR	Kültür
3	21	2	4	+	-	-	-	-	-
	22	4	5	-	-	-	+	+	-
	23	3	5	-	-	-	-	-	-
	24	4	5	-	-	-	-	-	-
	25	4	4	-	-	-	-	-	-
	26	4	3	-	+	-	+	+	-
	27	4	5	-	-	-	-	-	-
	28	4	5	-	-	-	-	-	-
	29	2	5	-	-	-	-	-	-
	30	3	5	-	-	-	-	-	-
4	31	2	4	+	-	-	-	-	-
	32	4	3	+	-	-	+	-	-
	33	3	3	+	-	-	-	-	-
	34	2	3	+	+	-	-	-	-
	35	3	2	+	-	-	-	-	-
	36	3	3	+	-	-	-	-	-
	37	3	2	+	-	-	-	-	-
	38	2	2	+	-	-	-	-	-
	39	3	3	+	-	-	-	-	-
	40	4	2	+	+	-	-	-	-

Tablo 4.13. (Devam) Paratüberküloz yönünden incelenen 150 koyunun test sonuçları.

İşletme No	Hayvan No	Yaş	VKS	İshal	IFN- γ ELISA	Antikor ELISA	ZN Boyama	PZR	Kültür
5	41	2	3	-	+	-	-	-	-
	42	3	3	-	+	-	-	-	-
	43	4	3	+	-	-	-	-	-
	44	5	3	-	-	-	+	+	-
	45	4	4	-	-	-	-	-	-
	46	4	4	-	-	-	+	+	+
	47	5	2	-	-	-	+	+	-
	48	5	4	-	-	-	-	+	-
	49	3	3	-	-	-	+	+	-
	50	3	4	-	-	-	+	+	-
6	51	5	3	+	-	-	-	-	-
	52	5	3	-	-	-	-	-	-
	53	5	3	-	+	+	+	+	-
	54	5	3	+	+	-	-	+	-
	55	5	2	+	-	-	+	+	-
	56	4	3	+	-	-	+	+	-
	57	5	4	-	-	-	-	-	-
	58	5	3	+	-	-	-	-	-
	59	6	2	+	+	-	+	+	-
	60	6	3	-	-	-	-	-	-

Tablo 4.13. (Devam) Paratüberküloz yönünden incelenen 150 koyunun test sonuçları.

İşletme No	Hayvan No	Yaş	VKS	İshal	IFN- γ ELISA	Antikor ELISA	ZN Boyama	PZR	Kültür
7	61	4	1	-	+	-	-	-	+
	62	4	2	-	+	-	-	-	-
	63	4	2	-	+	-	-	-	-
	64	4	3	+	+	Şüpheli	-	-	-
	65	4	1	+	-	-	-	-	-
	66	4	1	-	-	-	+	+	-
	67	3	1	-	-	+	-	-	-
	68	4	3	+	-	-	-	-	-
	69	3	1	+	+	-	+	+	-
	70	4	1	-	-	-	-	-	-
8	71	6	2	+	-	-	-	-	-
	72	6	3	-	-	-	-	-	-
	73	6	3	-	+	-	-	-	-
	74	5	4	+	+	-	-	-	-
	75	6	1	-	-	-	-	-	-
	76	5	1	-	-	-	-	-	-
	77	4	2	+	+	-	-	-	-
	78	4	1	+	-	-	-	-	-
	79	7	1	-	-	-	+	+	-
	80	4	3	+	+	+	+	-	-

Tablo 4.13. (Devam) Paratüberküloz yönünden incelenen 150 koyunun test sonuçları.

İşletme No	Hayvan No	Yaş	VKS	İshal	IFN- γ ELISA	Antikor ELISA	ZN Boyama	PZR	Kültür
9	81	4	2	-	-	-	-	-	-
	82	4	3	-	-	-	-	-	-
	83	2	3	-	-	-	-	-	-
	84	2	2	+	+	-	-	-	-
	85	6	3	-	-	-	-	-	-
	86	6	3	+	-	-	-	-	-
	87	3	3	-	-	-	-	-	-
	88	6	2	-	-	-	-	-	-
	89	2	3	-	-	-	-	-	-
	90	2	2	-	-	-	-	-	-
10	91	3	2	-	-	-	+	+	-
	92	3	1	+	-	-	+	+	-
	93	3	2	-	-	-	+	+	-
	94	3	1	-	-	-	-	-	-
	95	3	4	-	-	-	-	+	-
	96	3	2	-	-	-	+	+	-
	97	3	3	-	-	+	+	-	-
	98	3	1	-	-	-	+	+	-
	99	2	3	-	-	-	-	-	-
	100	3	1	-	-	-	-	+	-

Tablo 4.13. (Devam) Paratüberküloz yönünden incelenen 150 koyunun test sonuçları.

İşletme No	Hayvan No	Yaş	VKS	İshal	IFN- γ ELISA	Antikor ELISA	ZN Boyama	PZR	Kültür
11	101	3	1	+	-	+	+	+	-
	102	2	1	+	-	-	+	+	+
	103	3	1	+	-	+	+	-	+
	104	4	1	-	-	-	-	-	-
	105	3	1	+	-	-	-	-	-
	106	3	3	-	+	+	+	-	-
	107	5	1	+	+	+	+	+	-
	108	3	1	+	-	-	+	+	+
	109	5	1	-	-	-	+	+	-
	110	4	1	+	-	+	+	+	-
12	111	4	1	-	-	-	-	-	-
	112	4	1	-	-	-	+	+	-
	113	4	3	-	-	-	-	-	-
	114	4	1	-	-	-	-	-	-
	115	4	2	-	-	-	+	+	-
	116	5	1	-	-	-	-	-	-
	117	5	1	+	-	-	-	-	-
	118	5	3	-	-	-	+	+	-
	119	6	1	-	-	+	-	-	-
	120	5	1	-	-	-	-	-	-

Tablo 4.13. (Devam) Paratüberküloz yönünden incelenen 150 koyunun test sonuçları.

İşletme No	Hayvan No	Yaş	VKS	İshal	IFN- γ ELISA	Antikor ELISA	ZN Boyama	PZR	Kültür
13	121	7	1	-	-	-	-	-	-
	122	8	1	-	-	+	-	-	-
	123	8	1	-	-	-	-	-	-
	124	4	1	-	-	-	-	-	-
	125	6	1	-	-	-	-	-	-
	126	6	3	-	+	-	-	-	-
	127	5	2	-	-	-	-	-	-
	128	5	3	-	-	-	-	-	-
	129	5	1	-	-	-	-	-	-
	130	8	3	-	+	-	-	-	-
14	131	5	1	-	-	+	-	-	-
	132	3	4	-	-	+	-	-	-
	133	4	1	+	+	+	-	-	-
	134	4	5	-	-	-	-	-	-
	135	4	2	-	-	-	+	+	-
	136	3	3	-	+	-	-	-	-
	137	2	4	-	-	-	-	-	-
	138	2	4	-	-	-	+	+	-
	139	3	3	-	-	-	-	-	-
	140	2	5	-	+	-	-	-	-

Tablo 4.13. (Devam) Paratüberküloz yönünden incelenen 150 koyunun test sonuçları.

İşletme No	Hayvan No	Yaş	VKS	İshal	IFN- γ ELISA	Antikor ELISA	ZN Boyama	PZR	Kültür
15	141	6	2	+	-	-	-	-	-
	142	4	1	-	+	-	+	+	-
	143	5	2	-	-	-	-	-	-
	144	6	1	+	-	-	+	+	-
	145	4	1	-	-	+	-	-	-
	146	5	1	-	-	+	+	+	-
	147	6	2	-	-	-	+	+	-
	148	4	2	-	-	-	+	+	-
	149	5	1	-	-	-	-	-	-
	150	7	1	-	-	-	-	-	-

Koyunların 23 (%31,51)'ü PZR, ZN boyama; 5 (%6,85)'i IFN- γ ELISA, ZN boyama, PZR; 3 (%4,11)'ü antikor ELISA, ZN boyama, PZR; 3 (%4,11)'ü ZN boyama, PZR, kültür ve 2 (%2,74)'si ise IFN- γ ELISA, antikor ELISA, ZN boyama, PZR yöntemleri ile pozitif olarak belirlendi. Sadece gaitasında ZN boyama ile AFB'ler gözlenen ve diğer testlerde negatif bulunan bir koyun hariç, tanı testleri ile paratüberküloz yönünden pozitif kabul edilen 73 koyundan 27 (%36,98)'sinde IFN- γ , 11 (%15,06)'inde ise antikor yanıtı saptanırken, 6 (%8,21) koyunda hem antikor ve hem de IFN- γ yanıtı belirlendi. Diğer taraftan 73 koyundan 42 (%57,53)'si PZR ve kültür yöntemlerinden biri veya her ikisi ile pozitif saptandı. Bu koyunların sadece 4 (%9,52)'ünde antikor, 7 (%16,66)'sinde ise IFN- γ yanıtı saptanırken, 2 (%4,76) koyunda IFN- γ ve antikor yanıtı birlikte tespit edildi (Tablo 4.14).

Tablo 4.14. Tanı testlerine göre paratüberküloz pozitif saptanan koyun sayıları.

Testler	n	%
IFN- γ ELISA	20	27,39
Antikor ELISA	6	8,22
PZR	3	4,11
IFN- γ ELISA, antikor ELISA (şüpheli)	1	1,37
IFN- γ ELISA, antikor ELISA	1	1,37
IFN- γ ELISA, PZR	1	1,37
IFN- γ ELISA, kültür	1	1,37
Antikor ELISA, ZN boyama	1	1,37
ZN boyama, PZR	23	31,51
IFN- γ ELISA, ZN boyama, PZR	5	6,85
Antikor ELISA, ZN boyama, PZR	3	4,11
ZN boyama, PZR, kültür	3	4,11
IFN- γ ELISA, antikor ELISA, ZN boyama	2	2,74
Antikor ELISA, ZN boyama, kültür	1	1,37
IFN- γ ELISA, antikor ELISA, ZN boyama, PZR	2	2,74
Toplam	73	100

n: koyun sayısı

Antikor ELISA testi ile özellikle 2-3 yaş ile 5 yaş ve üzerindeki gruplarda pozitif saptanan 16 koyundan 12 (%75)'sinin VKS 1 olarak belirlendi ve 6 (%37,5)'sında ishal gözlemlendi (Tablo 4.15). IFN- γ ELISA ile çoğunlukla 2-3 yaş grubunda (n: 15, %45,45) yer alan ve VKS'ları 3 olarak belirlenen (n: 19, %57,57) 33 koyun pozitif saptandı ve bu koyunların 16 (%48,48)'sında ishal gözlemlendi. ZN boyama metodu ile pozitif olarak belirlenen 41 koyundan 16 (%39,02)'si 2-3 yaş grubunda yer

aldı. En yüksek pozitiflik VKS 1 olan hayvanlarda (n: 17, %41,46) saptandı ve bu koyunların 15 (%36,58)'inde ishal tespit edildi. PZR ile 2-3 yaş arasındaki koyunlarda (% 37,5) daha fazla pozitiflik belirlendi. Test ile pozitif belirlenen koyunların 13 (%32,5)'ünde ishal gözlenirken, 16 (%40)'ının VKS 1 olarak tespit edildi. *Map*'in izole edildiği 5 koyundan 3 (%60)'ünün 2-3 yaş grubunda, 2 (40)'sinin ise 4 yaşında olduğu belirlendi. Koyunların 3 (%60)'ünde ishal gözlenirken, 4 (%80)'ünün VKS 1 olarak belirlendi. Paratüberküloz yönünden tanı testleri ile pozitif ve negatif olarak değerlendirilen hayvanlar arasında yaş grupları yönünden istatistiksel bir fark ($p>0,05$) saptanmazken, diyare bulgusu ve VKS'ları bakımından fark ($p<0,01$) anlamlı bulundu (Tablo 4.15).

Tablo 4.15. Tanı testlerine göre paratüberküloz pozitif saptanan koyunların yaş, ishal durumu ve VKS sonuçları

Test pozitif	Yaş			İshal	VKS				
	2-3	4	≥ 5		1	2	3	4	5
IFN- γ ELISA (n=33)	15	10	8	16	5	7	19	1	1
Antikor ELISA (n=16)	6	4	6	6	12	0	3	1	0
ZN boyama (n=41)	16	13	12	15	17	10	10	3	1
PZR (n=40)	15	11	14	13	16	10	8	5	1
Kültür (n=5)	3	2	0	3	4	0	0	1	0

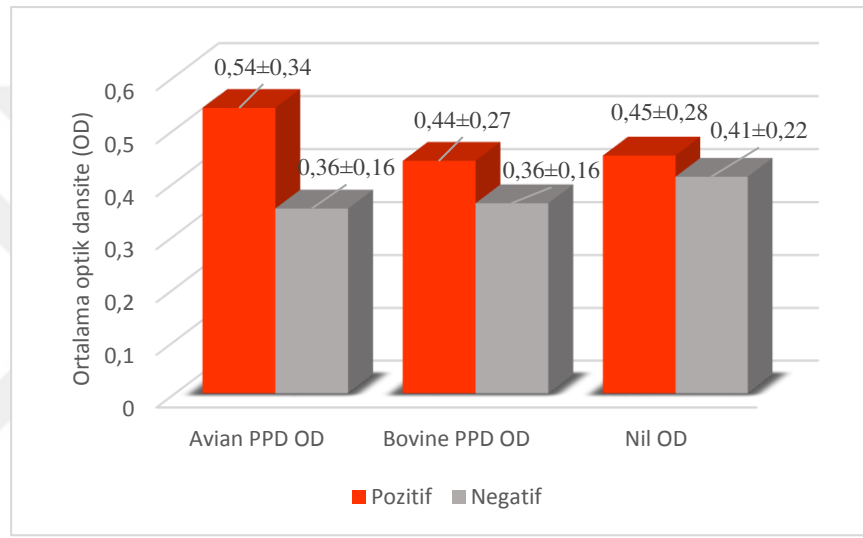
4.12. Sitokin Düzeyleri

Koyunların sitokin düzeylerinin değerlendirilmesinde; IFN- γ ELISA, antikor ELISA, ZN boyama, PZR ve kültür sonuçlarına göre paratüberküloz yönünden pozitif (n:40) ve negatif (n:40) olarak belirlenen koyunların plazma veya serum örneklerinden elde edilen OD değerlerinden yararlanıldı.

4.12.1. IFN- γ Düzeyi

Pozitif hayvanlarda avian PPD antijeni, bovine PPD antijeni ve nil antijeni ile uyarılan kuyucuklarından elde edilen IFN- γ ortalama OD değerlerinin negatif hayvanların ortalama OD değerlerinden daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.15). Pozitif ve negatif hayvanların avian PPD ile uyarılan IFN- γ düzeylerinin ortalama

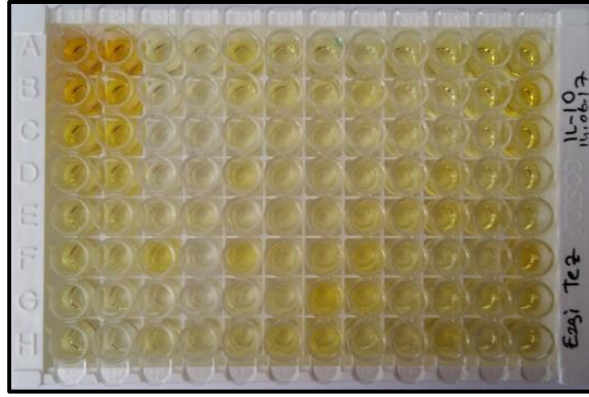
OD'leri arasındaki fark istatistiksel bakımdan anlamlı bulunurken ($p<0,01$), nil antijeni ve bovine PPD antijeni ile uyarılan IFN- γ düzeyleri arasında önemli bir fark saptanmadı ($p>0,05$). Pozitif örneklerin avian PPD antijeni ile uyarılan IFN- γ düzeylerinin ortalama OD değerleri ($0,54\pm0,34$) ile bovine PPD antijeni ile uyarılan IFN- γ düzeylerinin ortalama OD değerleri ($0,44\pm0,27$) arasında önemli bir fark saptanırken ($p<0,01$), negatif örneklerin avian PPD ($0,35\pm0,18$) ve bovine PPD ($0,36\pm0,16$) antijeni ile uyarılan IFN- γ düzeylerinin ortalama OD değerleri arasındaki fark anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).



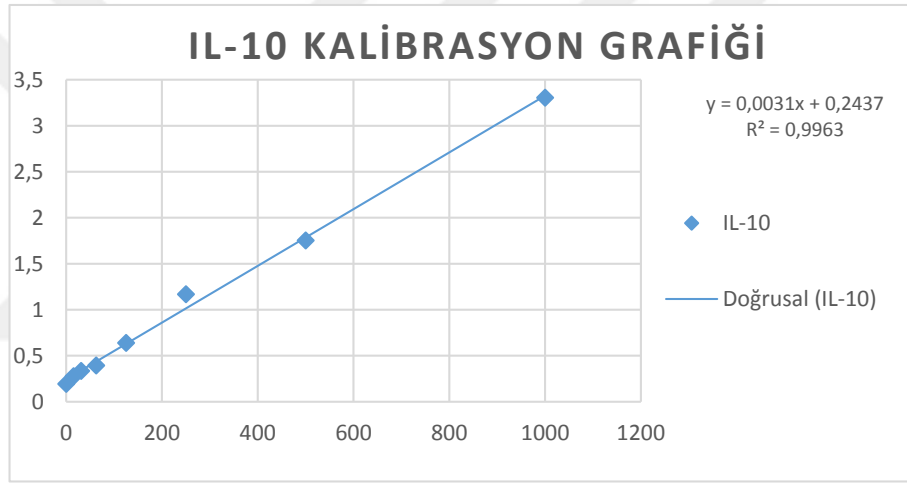
Şekil 4.15. Paratüberküloz pozitif ve negatif olarak belirlenen hayvanların IFN- γ ortalama OD değerleri.

4.12.2. IL-10 Düzeyi

ELISA ile incelenen kan serumlarının sonuçları kit protokolüne göre değerlendirildi (Şekil 4.16). Standartların OD değerlerinden yararlanılarak çizilen standart eğriye göre 40 pozitif ve 40 negatif koyunun kan serumu örneğinin IL-10 düzeyleri hesaplandı (Şekil 4.17). Paratüberküloz pozitif koyunların IL-10 düzeylerinin ortalama OD değerleri negatiflerin ortalama OD değerlerinden yüksek ve aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p<0,01$).



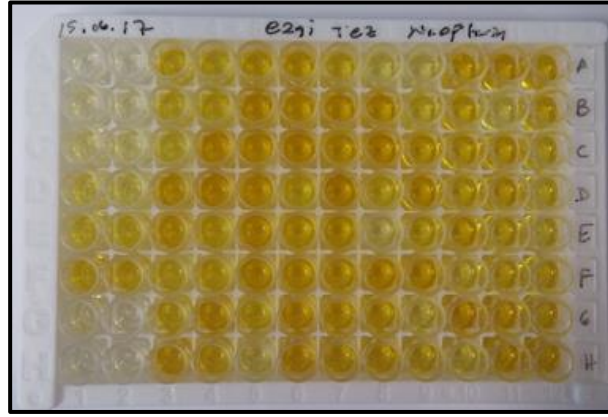
Şekil 4.16. Koyun kan serumu örneklerinin ELISA ile IL-10 sonuçları (1. ve 2. sütundaki kuyucuklar standartlar, diğer kuyucuklar ise örnekler için kullanıldı).



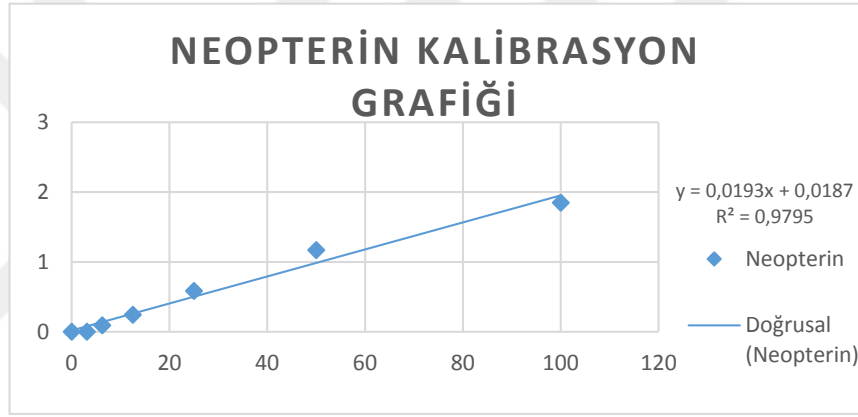
Şekil 4.17. Koyun kan serumu örneklerinin IL-10 düzeylerinin hesaplanmasında kullanılan standart eğri.

4.12.3. NP Düzeyi

ELISA ile incelenen kan serumlarının sonuçları kit protokolüne göre değerlendirildi (Şekil 4.18). Standartların OD değerlerinden yararlanılarak çizilen eğriye göre 40 pozitif ve 40 negatif koyunun kan serumu örneğinin NP düzeyleri hesaplandı (Şekil 4.19). Pozitif ve negatif hayvanların NP düzeylerinin ortalama OD değerleri arasında istatistiki açıdan önemli bir fark tespit edilemedi ($p>0,05$).



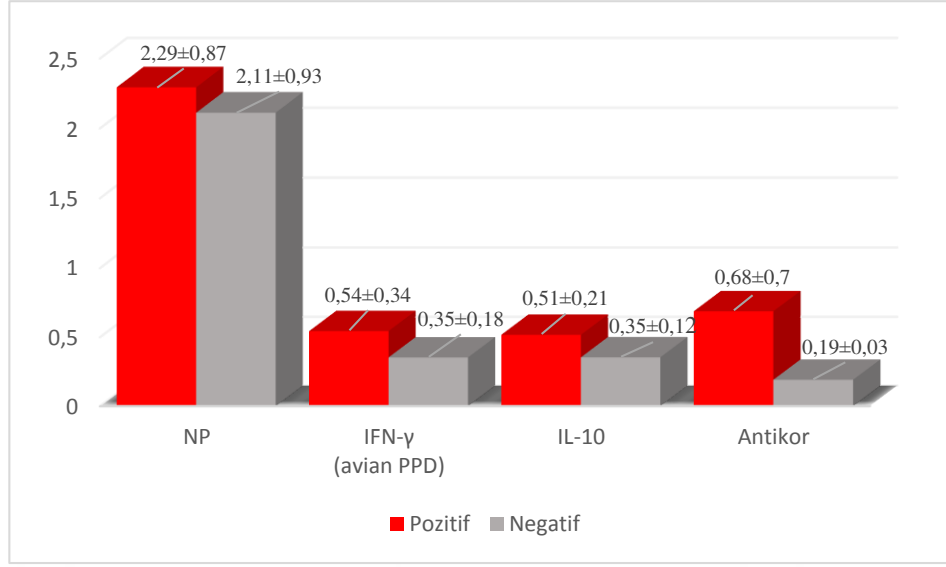
Şekil 4.18. Koyun kan serumu örneklerinin ELISA ile NP sonuçları (1. ve 2. sütundaki kuyular standartlar, diğer kuyular ise örnekler için kullanıldı).



Şekil 4.19. NP düzeyinin hesaplanmasında kullanılan standart eğri.

4.12.4. Antikor ve Sitokin Düzeylerinin Karşılaştırılması

Paratüberküloz yönünden pozitif ve negatif olarak tanımlanan koyunların antikor ve sitokin düzeylerinin değerlendirilmesinde ELISA testlerinden elde edilen ortalama OD değerlerinden yararlanıldı. IFN- γ için avian PPD antijeni ile uyarılmış kuyucuklardan elde edilen OD değerleri kullanıldı (Şekil 4.20).

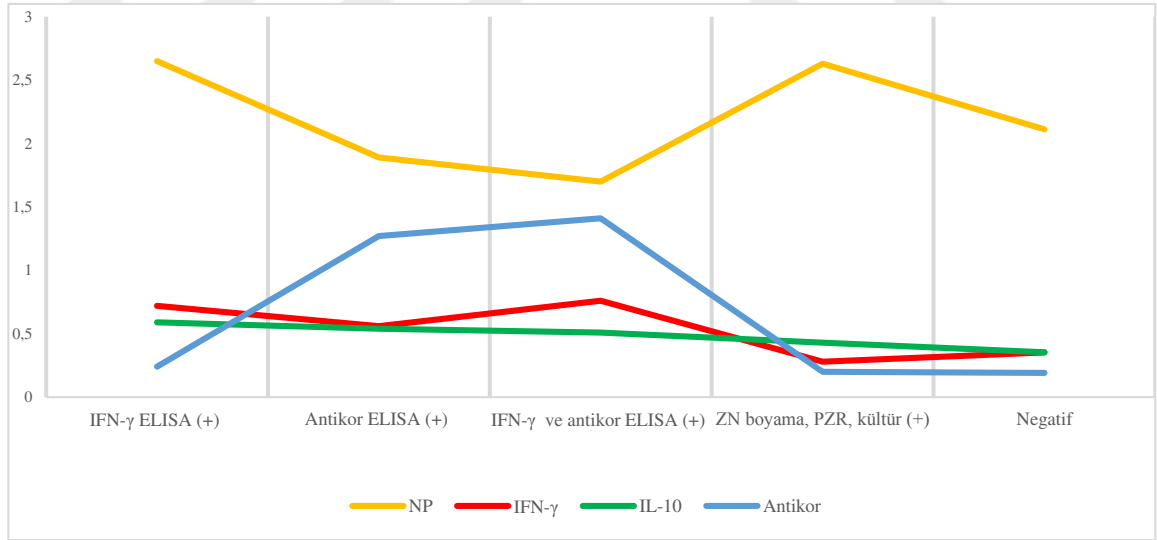


Şekil 4.20. Paratüberküloz pozitif ve negatif koyunların antikör, IFN- γ , IL-10 ve NP ortalama OD değerleri.

Paratüberküloz yönünden pozitif olarak tespit edilen hayvanların antikör, IFN- γ , IL-10 ve NP düzeylerinin ortalama OD değerlerinin paratüberküloz negatif hayvanlardan daha yüksek olduğu saptandı. Ancak antikör yanıtı saptanan hayvanlarda ortalama NP düzeyinin negatif hayvanlara göre daha düşük olduğu belirlendi (Şekil 4.21). Pozitif ve negatif hayvanlar arasında antikör, IFN- γ ve IL-10 düzeyleri açısından istatistiksel olarak önemli bir fark olmasına rağmen ($p < 0,01$), NP düzeyleri arasında önemli bir fark saptanmadı ($p > 0,05$).

Paratüberküloz yönünden pozitif olarak belirlenen 40 hayvan arasından sadece IFN- γ ELISA testi ile pozitif (10 koyun), sadece antikör ELISA ile pozitif (11 koyun), hem IFN- γ ELISA hem de antikör ELISA ile pozitif (6 koyun) saptanan hayvanlar ile IFN- γ ve antikör ELISA testlerinin her ikisi ile de negatif olmasına rağmen, ZN boyama, PZR veya kültür yöntemlerinden herhangi biri ile pozitif (13 koyun) saptanan hayvanların ortalama antikör ve sitokin OD değerleri karşılaştırıldı (Tablo 4.16). Buna göre; NP düzeyinin sadece IFN- γ ELISA ile ZN boyama, PZR ve kültür ile pozitif saptanan koyunlarda en yüksek düzeylerde seyrettiği, antikör yanıtının tespit edildiği hayvanlarda ise en düşük düzeylerde olduğu belirlendi. Antikör ELISA testi ile pozitif saptanan koyunların ortalama NP düzeylerinde saptanan bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,01$) bulundu. IL-10 düzeyi de NP’de gözlemlendiği gibi sadece IFN- γ ELISA

testi ile pozitif koyunlarda en yüksek düzeyde seyretmesine rağmen, diğer tanı testleri ile pozitif bulunan hayvanlardaki düzeyinde bir düşüş saptandı, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Antikor ELISA testi ile pozitif saptanan koyunların sadece IFN- γ ELISA, ZN boyama, PZR ve kültür yöntemleri ile pozitif saptanan koyunlara göre antikor düzeyi belirgin bir şekilde yüksek bulundu ($p<0,01$). IFN- γ ELISA ile pozitif saptanan hayvanlarda IFN- γ düzeyinin de en yüksek düzeylerde seyrettiği tespit edildi. IFN- γ ELISA testi ile negatif bulunmasına rağmen, antikor ELISA testi ile pozitif saptanan hayvanlarda IFN- γ düzeyinde bir düşüş saptandı, ancak bu düşüş istatistiksel olarak önemli bulunmadı ($p>0,05$). Diğer taraftan ZN boyama, PZR ve kültür yöntemi ile pozitif, ancak IFN- γ ve antikor ELISA testleri ile negatif olarak belirlenen koyunların IFN- γ düzeyleri IFN- γ ELISA ile pozitif saptananlardan ve hatta negatif kabul edilen 40 koyunun ortalama IFN- γ düzeylerinden çok daha düşük bulundu (Şekil 4.22). IFN- γ ELISA testi ile pozitif saptanan koyunların IFN- γ düzeyleri ile sadece ZN boyama, PZR ve kültür ile pozitif bulunan hayvanların ortalama IFN- γ düzeyleri arasındaki bu fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0,01$).

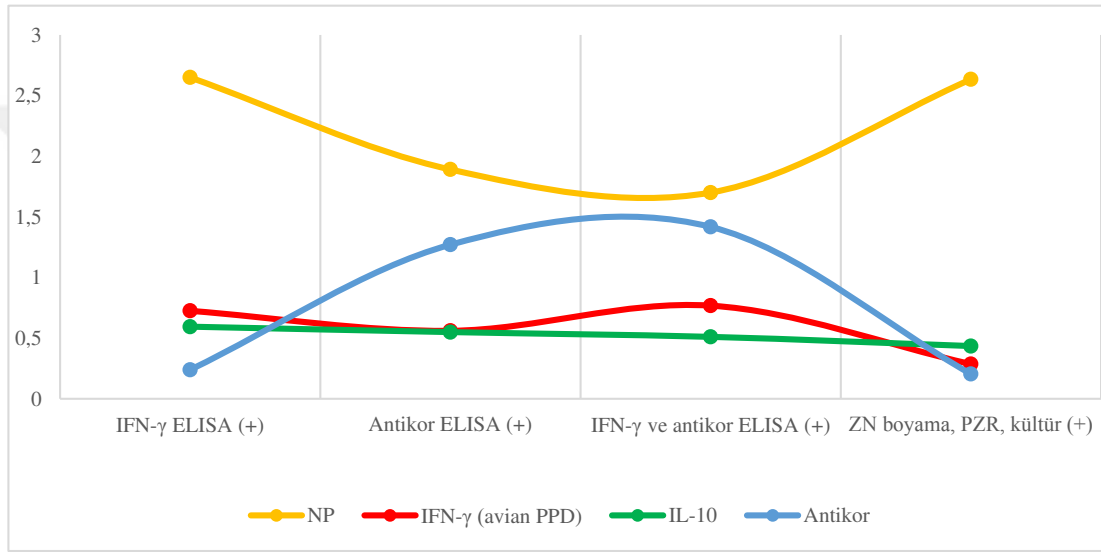


Şekil 4.21. Paratüberküloz pozitif ve negatif hayvanların teşhis testlerine göre antikor ve sitokin düzeyleri.

Tablo 4.16. Paratüberküloz yönünden pozitif saptanan 40 koyunun test sonuçlarına göre ortalama antikor ve sitokin OD değerleri.

Testler	NP OD±SD	IFN- γ (avian PPD) OD±SD	IL-10 OD±SD	Antikor OD±SD
IFN- γ ELISA (n=10)	2,65±0,83	0,72±0,29	0,59±0,29	0,24±0,10
Antikor ELISA (n=11)	1,89±0,77	0,56±0,29	0,54±0,21	1,27±0,72
IFN- γ ve antikor ELISA (n=6)	1,70±0,85	0,76±0,47	0,51±0,18	1,41±0,67
ZN, PZR veya kültür (n=13)	2,63±0,77	0,28±0,16	0,43±0,16	0,20±0,04

SD: standard sapma.



Şekil 4.22. Paratüberküloz pozitif hayvanların teşhis testlerine göre antikor ve sitokin düzeyleri.

5. TARTIŞMA

Paratüberküloz (Johne hastalığı), evcil ve yabani ruminantlar dışında tavşan, tilki, maymun, porsuk, çakal, kuş, kedi, rakun gibi hayvanlarda da görülebilen yavaş seyirli ve hatta ölümle sonuçlanabilen bir hastalıktır (Arsenault ve ark., 2014; Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; OIE, 2018; Wadhwa ve ark., 2013; Yardımcı, 2006). Karkas değerinde ve süt üretiminde azalmaya yol açarak hayvancılıkta büyük ekonomik kayıplara neden olan hastalığın sadece ABD'nde yılda 250 milyon dolar zarara neden olduğu bildirilmiştir (Ott ve ark., 1999). Ayrıca enfekte hayvanların dışkı ve/veya sütleri ile kontamine olmuş süt ve süt ürünlerinin insanlar için potansiyel bir bulaşma kaynağı olabileceği ileri sürülmüştür (Ayele ve ark. 2001; Cetinkaya ve ark. 2000).

Paratüberkülozun teşhisinde; klinik bulguların yanı sıra nekropsi, histopatoloji, bakteriyoskopi, kültür, PZR, humoral ve hücrel immün yanıtı ölçen testler gibi farklı tanı yöntemlerinin kullanıldığı, ancak hastalığın yavaş seyirli olması, enfeksiyonun farklı evrelerden (erken, subklinik ve klinik dönem) oluşması ve bu evrelerde gelişen immün yanıtın farklı olması nedeniyle kullanılan testlerden hiçbirinin %100 sensitivite ve spesifiteye sahip olmadığı ve bu nedenle her aşamasında enfeksiyonu tespit edebilen bir yöntemin bulunmadığı bildirilmiştir (Nielsen, 2010; OIE, 2008; OIE, 2018). Bu çalışmada da paratüberküloz teşhisinde kullanılan testlerin (IFN- γ ELISA, antikor ELISA, ZN boyama, PZR ve kültür) hepsinde birden pozitif sonuç veren bir koyun tespit edilemedi.

Koyunlarda klinik belirtilerin 2 yaşından itibaren görüldüğü, belirtilerin genellikle kronik kilo kaybı ile sınırlı olduğu ve çoğu hayvanın 3-5 yaşlarında hastalığa yenik düştüğü bildirilmiştir (Clarke, 1997; Whitlock ve Buergelt, 1996). Sığırlarda gözlenen yeşilimsi ishal bulgusunun aksine koyunlarda ishalin daha az belirgin olduğu veya hiç görülmediği belirtilmiştir (Begg ve Whittington, 2010; Carrigan ve Seaman, 1990; Eamens ve ark., 2015). *Map* ile enfekte 50 koyunun %90'ında klinik olarak zayıflama dikkati çekerken, ciddi bir ishal bulgusunun bu koyunların sadece %20'sinde gözlemlendiği bildirilmiştir (Carrigan ve Seaman, 1990). Bu çalışmada, örneklenen koyunlar arasında paratüberküloz yönünden en yüksek pozitiflik oranı 2-3 yaş grubunda (%41,09) tespit edildi. Enfeksiyonun klinik döneminde ZN boyama, antikor

ELISA, PZR veya kültür yöntemi ile teşhis yapılabileceği belirtilmiştir (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; OIE, 2018; Whittington ve ark., 2017). Bu çalışmada da söz konusu testler ile paratüberküloz yönünden pozitif saptanan 52 koyundan 34'ünün (%65,38) VKS 1-2 olarak belirlendi. Aynı koyunların 18 (%34,61)'inde ishal görüldü. Aşırı derecede sürekli ve fişkırır tarzda yeşilimsi bir ishal bulgusu bu koyunların sadece 8 (%15,38)'inde dikkati çekti. IFN- γ ELISA'nın hastalığın henüz klinik bulgularının gözlenmediği erken döneminde kullanılabileceği bildirilmiştir (Jungersen ve ark., 2002; Jungersen ve ark., 2012; Stevenson, 2010b, Vazquez ve ark., 2013). Bu çalışmada da sadece IFN- γ ELISA ile pozitif olarak belirlenen 20 koyunun 12 (%60)'sinde hastalığa ilişkin klinik bulgu saptanmadı. İstatistiksel olarak hastalığın yaş gruplarına göre görülme oranında bir fark olmamasına rağmen, diyare ve zayıflığın hastalık için önemli bir klinik bulgu olduğu belirlendi. Hastalığın kliniğine yönelik bu bulgular koyunlarda paratüberküloza ilişkin belirtilerin 2 yaşından itibaren görülebileceğini ve evresine bağlı olarak 2 yaş kadar erken bir dönemde de IFN- γ ELISA, antikor ELISA, ZN boyama, PZR veya kültür gibi yöntemler ile hastalığın tespit edilebileceği sonucuna varıldı.

Paratüberküloz teşhisinde kullanılan ZN boyama yönteminin basit, hızlı ve ucuz bir teşhis metodu olmasına rağmen, tespit edilebilir bakteri limitinin 10^6 bakteri/g doku olduğu ve bu yöntemle sadece zarar görmemiş hücrelerin boyandığı rapor edilmiştir (Thoresen ve ark., 1994). Ayrıca bu yöntem ile *Map*'in diğer mikobakteri türlerinden ayırımının yapılamaması ve sensitivite ile spesifitesinin de oldukça düşük olması nedeniyle yanlış negatif sonuç alınabileceği bildirilmiştir (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008; Ris ve ark., 1988; Thoresen ve ark., 1994; Weber ve ark., 2009; Zimmer ve ark., 1999). Bu çalışmada rastgele örnekleme ile seçilen koyunlardan alınan gaita örneklerinden direkt hazırlanan preparatların ZN boyama ile 33 (%22)'ünde, sedimentlerinden hazırlanan preparatların ise 41 (%27,33)'inde AFB'ler gözlemlendi. Aynı gaita örneklerinin kültüründen (%3,33) elde edilen orandan daha yüksek pozitiflik saptandığı için bu durumun diğer mikobakterilerden kaynaklanabileceği düşünüldü (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008). Ancak bir örnek haricinde ZN boyama ile AFB gözlenen 40 koyunun PZR, kültür veya antikor ELISA testlerinden herhangi biri ile *Map* yönünden pozitif olduğu belirlendi. Bu nedenle ZN

boyamanın, sensitivite ile spesifitesinin düşük olduğunu bildiren araştırmacıların (Ris ve ark., 1988; Thoresen ve ark., 1994; Weber ve ark., 2009; Zimmer ve ark., 1999) aksine, sürü taramaları için kullanılabileceği sonucuna varıldı. Ayrıca direk gaitaya oranla sedimentten hazırlanan preparatların incelenmesi ile daha fazla sayıda örnek pozitif tespit edildi ($p<0,01$) ve preparatlarda AFB sayısının arttığı görüldü. Bu sonuç, gaita örneklerine uygulanan santrifüj ve dekontaminasyon işleminin testin sensitivitesini arttırabileceğini ve daha doğru sonuç alınabileceğini bildiren araştırmacıları (Sayın, 2010; Singh ve ark., 2010; Singh ve ark., 2013b) desteklemektedir. Coelho ve ark. (2008a), klinik bulgu gösteren ve paratüberküloz olduğu serolojik, histolojik ve mikrobiyolojik olarak doğrulanmış 26 koyundan alınan gaita ve doku örneklerini ZN boyama yöntemi ile incelemiş ve yöntemin sensitivitesini gaita ve dokulardan hazırlanan preparatlarda sırasıyla %61,5 ve %76,9 olarak hesaplamıştır. Sunulan bu çalışmada da altın standart test olarak kabul edilen kültür sonuçları göz önünde bulundurularak direk gaitadan ve sedimentten hazırlanan ZN boyama yöntemlerinin sensitivite ve spesifite oranları sırasıyla %60-%79 ve %80-%74 olarak hesaplandı ve bu oranlar Coelho ve ark. (2008a) tarafından bildirilen oranlara benzer bulundu.

Koyunlarda bağırsak dokularından yapılan kültürün paratüberküloz tanısında altın standart olarak kabul edilmesine rağmen, canlı hayvanlarda doku yerine fekal kültürün kullanılabileceği ve kültür yönteminin %100 spesifiteye sahip yani yanlış pozitif sonuçlar vermeyen tek test olduğu ileri sürülmüştür (Nielsen ve Toft, 2008; OIE, 2008; OIE, 2018; Whittington, 2010). Bu çalışmada rastgele örnekleme metodu ile seçilen 150 koyundan alınan gaita örneklerinden 5'inde AFB izolasyonu yapıldı ve izolatların hepsi PZR ile *Map* olarak doğrulandı. Bu sonuç, kültür metodunun yanlış pozitif sonuç vermediğini ve spesifitesinin %100 olduğunu rapor eden araştırmacıları (Ayele ve ark., 2001; Nielsen ve Toft, 2008; Sirak, 2010; Whittington, 2010) desteklemektedir. Uygulanan kültür protokolleri arasındaki farklılıkların testin sensitivitesini etkileyebileceği bildirilmiştir (Harris ve Barletta, 2001; Whittington, 2010). Eamens ve ark. (2000), sığır gaitalarından radyometrik bir sıvı kültür yöntemi (BACTEC) ile %89 oranında izolasyon sağladıkları halde klasik katı kültür yönteminde bu oranı %68 bulduklarını ve sensitivitesi radyometrik yöntemden daha

düşük olan kültür yöntemi ile etkenin ancak 12-16 haftada üreyebileceğini veya bazen hiç üreme olmayacağını rapor etmiştir. Koyun ve keçilerde ise ince barsakların son bölümü ile ileosekal valf ve lenf düğümlerinden yapılan katı kültürün spesifitesi %100, sensitivitesi ise %9 olarak belirlenmiştir (Sirak, 2010). Bu çalışmada da katı kültür yöntemi kullanıldı ve tüm tanı testleri dikkate alınarak 73 koyun paratüberküloz yönünden pozitif bulunmasına rağmen, bu hayvanlardan sadece 5'inde *Map* izole edilebildi. İzolasyon oranının az olmasına diğer araştırmacıların (Eamens ve ark., 2000; McDonald ve ark., 1999; Sirak, 2010; Whittington, 2009; Whittington ve ark., 1999a) da belirttiği gibi katı kültür yönteminin düşük sensitiviteye sahip olmasının neden olabileceği düşünüldü.

Gaita örnekleri için önce HPC ve sonra antimikrobiyal maddeleri içeren yarı-kuvvetli BHI buyyon ile iki aşamalı inkübasyon olarak uygulanan dekontaminasyon yönteminin yaygın kullanıldığı bildirilmiş (Whittington, 2010) ve bu yöntemin kültürün duyarlılığını arttırdığı ileri sürülmüştür (Eamens ve ark., 2000; McDonald ve ark., 1999; OIE, 2008). Bu çalışmada HPC ve antimikrobiyal maddeleri içeren yarı-kuvvetli BHI buyyon ile çift inkübasyon metodu kullanıldı ve gaita örneklerinin sadece 5'inden *Map* izole edildi. Bazı araştırmacılar (Dundee ve ark., 2001; Gao ve ark., 2005; Sweeney ve ark., 1992), iki aşamalı protokol yerine, genellikle süt ile doku örnekleri için önerilen ve sadece %0,75 HPC'nin kullanıldığı tek aşamalı inkübasyonun *Map*'e daha az zarar vereceğini ifade etmiştir. Antimikrobiyal maddeler kullanılmadan ve sadece HPC ile doku örneklerinin uzun süre inkübe edilmesinin özellikle *Map*'in S tipinin üremesi üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı ileri sürülmüştür (Reddacliff ve ark., 2003). Ayrıca koyunlardan alınan bağırsak dokusu ve ilişkili lenf düğümü HPC ile dekontamine edildikten sonra modifiye BACTEC 12B besiyerine ekilmesinin yeterli olduğuna ve bu şekilde yapılan kültürde kontaminasyon oranının %0,2'den daha az bulunduğuna dikkat çekilmiştir (Whittington, 2009). Sunulan bu çalışmada, gaita örneklerinden ZN boyama ve PZR'a göre az sayıda pozitiflik belirlenmesinde kültür için kullanılan çift aşamalı inkübasyon yönteminin rolü olabilir. Zira birçok araştırmacı (Cousins ve ark. 1995; Dundee ve ark., 2001; Gao ve ark., 2005; Sweeney ve ark., 1992; Whittington, 2009; Whittington, 2010;

Whittington ve ark., 1999a) çift aşamalı inkübasyonun *Map* canlılığını etkileyerek izolasyon oranını azaltabileceğine dikkat çekmiştir.

Uygulanan yöntemin sensitivitesinin yanı sıra izolasyonu etkileyen en önemli problemlerden birisinin kontaminasyon olduğu belirtilmiştir (Eamens ve ark., 2015; Whittington, 2010). Gaita ve bağırsak doku örneklerinde *Map*'in diğer bakteri ve mantarlara göre daha az miktarda bulunduğu ve izolasyon şansının istenmeyen mikroorganizmaların etkin bir şekilde inaktive edilmesine bağlı olacağı bildirilmiştir (Eamens ve ark., 2015; OIE, 2008). Kim ve ark. (1989), HEYM besiyerine sığır gaita örneklerinden sadece sedimantasyon ve sedimantasyon ile takibinde uygulanan santrifüj sonrası yapılan ekimlerde sırasıyla %26 ve %60 oranında kontaminasyon görüldüğünü rapor edilmiştir. HPC ve antimikrobiyal maddelerin kullanıldığı çift aşamalı inkübasyon metodunda ise bu oran %30 (Secott ve ark., 1999), sadece HPC ile bir gece inkübasyona bırakıldığında da %44 (Cousins ve ark., 1995) olarak bildirilmiştir. Whittington (2009) ise iki aşamalı inkübasyonda kontaminasyon oranını %7 olarak rapor etmiştir. Bununla birlikte bazı kontamine besiyerlerinde *Map*'in de izole edilmesi veya yoğun kontaminasyon gözlenen besiyerlerinde inkübasyonun sonlandırılması nedeniyle fekal kültürlerdeki kontaminasyon oranlarında bir karışıklık olduğuna dikkat çekilmiştir (Whittington, 2009). Örneklerin dekontaminasyonunda çift inkübasyon metodunun kullanıldığı bu çalışmada; HEYM'de 52 (%34,66), modifiye Middlebrook 7H10 besiyerinde ise 70 (%46,66) örnekte kontaminasyon belirlendi. Bu besiyerlerinden yoğun kontaminasyon gözlenen 12 (%8) HEYM ve 36 (%24) modifiye Middlebrook 7H10 besiyerinde inkübasyon işlemi sonlandırıldı. Tespit edilen kontaminasyon oranları diğer araştırmacılar tarafından bildirilen (Cousins ve ark., 1995; Kim ve ark., 1989; Secott ve ark., 1999) oranlara benzer bulundu. Ayrıca bu çalışmada yüksek enterik bakteri yükü nedeniyle gaita örneklerinde HPC ve antimikrobiyal maddelerden oluşan iki aşamalı bir dekontaminasyon uygulanmasına rağmen, yoğun *Bacillus* sp. kontaminasyonu ile karşılaşıldı. Besiyerlerine ilave edilen malaşit yeşili, sikloheksimid, amfoterisin B, vankomisin, nalidiksik asit, kloramfenikol, penisilin G, polimiksin B, trimetoprim, azlosilin ve ampisilin gibi antimikrobiyallerin *Map* üremesini engelleyip engellemediği konusu henüz tam olarak bilinmemektedir (Gumber ve Whittington, 2007; Stabel, 1997; Whittington, 2009;

Whittington ve ark., 1999a). Whittington (2009) tarafından BACTEC besiyerine ampisilin ilave edilmesinin koyun gaita örneklerinden *Map* izolasyonunu engellemediği gibi kontaminasyon oranını da %7'ye kadar azalttığı bildirilmiştir. Bu çalışmada da yüksek oranda kontaminasyon saptanması nedeniyle gaita kültüründe kontaminasyon oranını azaltacak daha iyi bir metoda veya dekontaminasyon metodunun ampisilin gibi antimikrobiyal bir madde ilavesi ile modifiye edilmesine ihtiyaç olduğu söylenebilir. Ancak mevcut protokollerin, besiyerlerinin sensitivitesinde azalmaya veya kontaminasyon oranında artışa yol açmayacağı kesinleştirilmeden, değiştirilip değiştirilemeyeceği konusunun hala belirsiz olduğu da açıklanmıştır (Whittington, 2010). Örneğin besiyerine ilave edilen vankomisin *Map*'in S tipinin üremesini engellediği, ancak C tipi üzerinde inhibitör etkisinin daha az olduğu belirtilmiştir (Gumber ve Whittington, 2007). Ayrıca dekontaminasyon işleminin ikinci aşamasında kullanılan antibiyotik karışımı içinde vankomisin bulunması nedeniyle bu aşamadaki inkübasyon süresinin daha kısa tutulabileceği, ancak bu durumda kontaminasyon riskinin artabileceği de bildirilmiştir (Whittington, 2009).

Kültür duyarlılığının sadece dekontaminasyon aşamasına değil aynı zamanda kullanılan besiyeri ile izole edilecek *Map*'in tipine göre değişebileceği bildirilmiştir (Whittington, 2010). S tipi *Map* suşlarının HEYM, LJ veya MGIT ParaTB besiyerlerinde zor üredikleri veya hiç üremedikleri, modifiye Middlebrook 7H10 agar, 7H11 agar ve BACTEC 12B besiyerlerinde ise makul inkübasyon süresi içinde üredikleri rapor edilmiştir (Collins ve ark., 1990b; Eamens ve ark., 2015; Whittington, 2009; Whittington, 2010). Bu çalışmada da koyun gaita örneklerinden izole edilen *smooth* koloni yapısına sahip 5 *Map* izolatının IS1311 PZR-REA ile S tipi oldukları belirlendi ve hepsi sadece modifiye Middlebrook 7H10 besiyerinde üredi. C tipi suşlara göre S tipindeki suşların üretilmesinin zor olması nedeniyle BACTEC 460 ile modifiye BACTEC 12B gibi sıvı besiyerlerinin kullanılması önerilmiştir (Eamens ve ark., 2015; Whittington, 2009; Whittington ve ark., 1999a; Whittington ve ark., 2011). Koyun gaita örneklerinden *Map* izolasyonu için modifiye Middlebrook 7H10 agar ile BACTEC 12B sıvı besiyeri kullanılmış ve BACTEC 12B besiyerinde pozitif saptanan örneklerden sadece %37'sinin modifiye Middlebrook 7H10 agarda ürediği rapor

edilmiştir (Whittington, 2009). Jakobsen ve ark. (2000), koyun suşları için kesinleşmiş bir kültür protokolünün olmadığına ve kültür duyarlılığının ancak %10 olabileceğine dikkat çekmiş olmasına rağmen, bu çalışmada HEYM ve modifiye Middlebrook 7H10 agar olmak üzere sadece katı besiyeri kullanılmasının izolasyon sayısının az olmasında etkisi olabilir.

Hastalığın klinik aşamasında olan hayvanların günde bir gram gaita ile ortalama 10^8 veya 10^{10} sayıda bakteriyi dışarı çıkarabileceği (Whittington ve ark., 2000) ve bu hayvanlardan etkeninin genellikle izole edilebileceği (OIE, 2008; Whitlock ve ark., 2000; Whitlock ve ark., 2005) bildirilmiştir. Bununla birlikte ciddi klinik bulgular gözlenen koyunlarda izolasyon oranının %8 olduğu da rapor edilmiştir (Menzies, 2001). Enfeksiyonun erken evresinde gaita ile atılım olmadığı için izolasyon yapılamayacağı (Menzies, 2001), klinik bulgu göstermeyen subklinik enfekte hayvanların ise gaitaları ile az sayıda (10^4 kob/g dışkı) da olsa etkeni çıkarabilecekleri (OIE, 2008; Wadhwa ve ark., 2013; White ve ark., 2010), ancak gaita ile atılımın aralıklı olması nedeniyle bu hayvanlarda gaitadan izolasyon şansının azalabileceği ileri sürülmüştür (Clarke, 1997; Correa-Valencia ve ark., 2017; Kawaji ve ark., 2011; McDonald ve ark., 1999; OIE, 2008; Stevenson, 2010b; Whitlock ve ark., 2000; Whittington, 2010). Rastgele örnekleme ile seçilen 580 keçi ve 397 koyundan alınan gaita örneklerinin RT-PZR ve BD BACTECTM MGITM 960 kültür sistemi kullanılarak *Map* yönünden incelendiği bir çalışmada (Bauman ve ark., 2016a), inkübasyon süresi ile ilişkili olarak gaita kültürünün sensitivitesinin keçi ve koyunlarda sırasıyla %23,1-%42,7 ile %5,8-%19 arasında değiştiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada *Map*'in izole edildiği koyunlardan 4'ünde zayıflık ve ishal gibi klinik bulgular saptanmasına rağmen, 1'inde hiçbir bulgu gözlenmedi ve bu koyunun enfeksiyonun subklinik döneminde olabileceği varsayıldı. Ayrıca bir işletmede örnekleme yapılan 10 koyundan 8'inde zayıflık ve fişkırr tarzda yeşilimsi ishal gibi ciddi klinik bulgular gözlenmesine rağmen, sadece 3 hayvanın gaitasından *Map* izole edilebildi. Bu bulgular koyunlarda gaita kültürü ile her zaman etkenin izole edilemeyeceğini bildiren araştırma sonuçlarını (Bauman ve ark., 2016a; Jakobsen ve ark., 2000; Menzies, 2001; Whittington ve ark., 2011) desteklemektedir.

Map enfeksiyonunda en erken tespit edilebilir immun yanıtlardan birisinin IFN- γ üretimi olduğu ve bu nedenle subklinik enfekte hayvanların belirlenmesi için IFN- γ ELISA testinin en iyi seçenek olduğu ileri sürülmüştür (Alvarez ve ark., 2008; Jungersen ve ark., 2002; Jungersen ve ark., 2012; Stevenson, 2010; Vazquez ve ark., 2013). Ancak paratüberkülozun teşhisinde IFN- γ ELISA için henüz standart bir yorumlama kriteri bulunmamaktadır (Jungersen ve ark., 2002; McDonald ve ark., 1999). Test için PPDa-PBS>0,05 kriteri kullanıldığında çok sayıda subklinik enfekte hayvanın tespit edilebildiği açıklanmıştır (Jungersen ve ark., 2002, Reddacliff ve Whittington, 2003). Diğer taraftan PPDa'nın PPDb'den daha büyük ve PPDa-PBS $\geq$ 0,05 olması durumunda hayvanların paratüberküloz yönünden daha doğru bir şekilde pozitif olarak değerlendirilebileceği ileri sürülmüştür (Alvarez ve ark., 2008; Vazquez ve ark., 2013). Bu kriterin kullanıldığı bir çalışmada (Vazquez ve ark., 2013), IFN- γ ELISA ile pozitif olarak belirlenen hayvanların çoğunluğunun gaitasında *Map* tespit edilmediği (%63,9) gibi ciddi bir doku hasarı da (%86,1) saptanmamış ve bu nedenle bu yöntem ile yorumlama kriterinin genç veya enfeksiyonun erken dönemindeki hayvanların belirlenmesi için kullanılabileceği ifade edilmiştir (Vazquez ve ark., 2013). Bu çalışmada da Alvarez ve ark. (2008) ve Vazquez ve ark. (2013) tarafından bildirilen kriter kullanıldı ve 150 koyundan 33 (%22)'ü pozitif saptandı. Kullanılan teşhis testleri arasında ZN boyama (%27,33) ve PZR (%26,66)'dan sonra en yüksek pozitiflik oranı bu test ile belirlendi. Sürü bazında değerlendirildiğinde ise en yüksek pozitiflik oranı IFN- γ ELISA (%86,67) ile elde edildi. Çalışmada diğer testler de dikkate alınarak paratüberküloz yönünden pozitif kabul edilen 73 koyundan 20 (%27,39)'si sadece IFN- γ ELISA ile pozitif bulundu. Bu koyunlarda hiçbir klinik bulgunun gözlenmemesi ve gaitalarında *Map*'in de tespit edilmemesi nedeniyle bu hayvanların diğer araştırmacıların (Alvarez ve ark., 2008; Jungersen ve ark., 2002; Reddacliff ve Whittington, 2003; Vazquez ve ark., 2013) da bildirdiği gibi enfeksiyonun erken veya subklinik döneminde olabilecekleri düşünüldü.

Kullanılan farklı yorumlama kriterlerine bağlı olarak sığır (Alvarez ve ark., 2008; Jungersen ve ark., 2002; Kalis ve ark., 2003; McDonald ve ark., 1999) ve koyunlarda (Gwozdz ve ark., 2000; Reddacliff ve Whittington, 2003; Robbe-Austerman ve ark., 2006a) IFN- γ ELISA'nın sensitivite ve spesifitesi farklı

bulunmuştur. Deneysel olarak enfekte edilen koyunlarda testin sensitivitesi bakteriyolojik kültür ile karşılaştırıldığında %66,7 olarak saptanmış, enfekte olmayan sürülerde de spesifitesi %98,3 olarak hesaplanmıştır (Robbe-Austerman ve ark., 2006a). Reddacliff ve Whittington (2003) ise testin sensitivitesini %83, spesifitesini ise %56 olarak hesapladıklarını bildirmiştir. Bu çalışmada altın standart test olarak kabul edilen kültür sonuçları göz önünde bulundurularak IFN- γ ELISA'nın sensitivite ve spesifite oranları sırasıyla %20-%77 olarak hesaplandı. Deneysel enfekte edilen hayvanlardan elde edilen test sonuçları (Gwozdz ve ark., 2000; Reddacliff ve Whittington, 2003; Robbe-Austerman ve ark., 2006a) dikkate alındığında testin sensitivitesinin düşük bulunmasında birçok nedenin olabileceği ve bunlar arasında; I) diğer tanı testleri ile klinik olarak enfekte olan hayvanların belirlenebilmesine rağmen, IFN- γ ELISA ile erken veya subklinik dönemdeki hayvanların tespit edilebilir olması, II) klinik dönemdeki hayvanlarda hücresel immün yanıtın düşük olmasından dolayı IFN- γ ELISA ile bu hayvanların negatif olarak saptanabilmesi, III) hastalığın ileri dönemlerinde gelişen anerji nedeniyle IFN- γ ELISA ile pozitif hayvanların belirlenememesi, IV) kültür metodu ile klinik aşamadaki hayvanlar tespit edilebilirken, erken veya subklinik dönemdeki hayvanları saptayabilen altın standart bir testin olmaması gibi nedenlerin sayılabileceği düşünüldü. Diğer taraftan Stewart ve ark. (2004) tarafından koyunlarda yürütülen deneysel bir çalışmada, S tipi suşların C tipi suşlara nazaran daha az patojen olduğu ve bunun sonucunda da IFN- γ yanıtının daha düşük düzeyde ve daha kısa süreli olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada da kültür yöntemi ile izole edilen tüm *Map* izolatlarının S tipi olması nedeniyle enfeksiyonun latent dönemindeki koyunlarda IFN- γ düzeyinin kısa süreli veya düşük düzeyde olabileceği ve bu durumun da testin sensitivitesini etkileyebileceği kanısına varıldı.

Hastalığın erken evresindeki hayvanların *Map*-spesifik antikorların ölçümüne dayanan ELISA ve kültür ile sıklıkla negatif olarak teşhis edildiği rapor edilmiştir (Magombedze ve ark., 2017). Subklinik dönemde antikor düzeyinin genellikle düşük olduğu, ancak bu dönemin geç aşamalarında hayvanların dışkı ile etkeni aralıklı olarak çıkarabilecekleri bildirilmiştir (Nielsen, 2010; Stevenson, 2010; Wadhwa ve ark., 2013; Whittington ve ark., 2017). Bu evredeki hayvanların yaklaşık %10'unda IFN- γ ve antikor yanıtının saptanabileceği (Jungersen ve ark., 2012) ve özellikle IgG1 sınıfı

antikorların subklinik enfeksiyonun özellikle orta ve ileri aşamalarında tespit edilebileceği (Nielsen, 2010; Stevenson, 2010; Wadhwa ve ark., 2013; Whittington ve ark., 2017) rapor edilmiştir. Nielsen (2010), enfekte sığırlarda tespit edilebilir düzeyde gaita ile *Map* atılımı başlamadan önce antikor üretiminin olabileceğini, ancak *Map* atılımının çok az olduğu hayvanlarda yani enfeksiyonun erken evrelerinde antikorların tespit edilemeyebileceğini belirtmiştir. Diğer taraftan özellikle koyunlarda klinik aşamasında dahi serolojik testler ile negatif sonuçlar alınabileceği rapor edilmiştir (Hope ve ark., 2000; Nielsen, 2010; Stewart ve ark., 2004). Bu çalışmada 150 koyunun *Map*’e karşı gelişen antikorlar yönünden 16’sı (%10,66) pozitif, 1’i (%0,66) şüpheli olarak belirlendi. Tanı testleri ile paratüberküloz yönünden pozitif kabul edilen 73 koyundan 27 (%36,98)’sinde IFN- γ , 11 (%15,06)’inde ise antikor yanıtı saptanırken, 6 (%8,21) koyunda hem antikor ve hem de IFN- γ yanıtı belirlendi. Aynı zamanda pozitif bu 73 koyundan 42 (%57,53)’si PZR ve kültür yöntemlerinden biri veya her ikisi ile pozitif saptandı. Bu koyunların sadece 4 (%9,52)’ünde antikor, 7 (%16,66)’sinde ise IFN- γ yanıtı saptanırken, 2 (%4,76) koyunda IFN- γ ve antikor yanıtı birlikte tespit edildi. Bu sonuçlara göre; sadece IFN- γ yanıtının saptandığı koyunların enfeksiyonun erken veya subklinik dönemin erken aşamasında, hem antikor hem de IFN- γ yanıtının saptandığı koyunların subklinik dönemin orta veya geç döneminde, sadece antikor yanıtının saptandığı hayvanların ise subklinik dönemin geç aşamasında veya klinik dönemde olabileceği sonucuna varıldı. Antikor yanıtının saptanmadığı, ancak PZR veya kültür yöntemi ile pozitif bulunan koyunların ise *Map* atılımının çok az olduğu enfeksiyonun erken evrelerinde veya klinik aşamanın ilerlemesi ile gelişen anejik dönemde olabilecekleri düşünüldü.

Antikor ELISA testinin sensitivitesinin enfeksiyonun aşamasına, *Map*’in gaita ile atılım düzeyine ve hayvanların yaşına bağlı olarak değişebileceği bildirilmiştir (Eamens ve ark., 2015; Nielsen ve Toft, 2008; OIE, 2008). Enfekte hayvanların saptanmasında antikor ELISA testinin sensitivitesinin düşük (yaklaşık %5-30) olduğu (Nielsen ve Toft, 2006) ve gaita kültürü ile paratüberküloz olduğu tespit edilen sığırların ancak %30-40’ının ELISA ile pozitif olarak saptandığı (Whitlock ve ark., 2000) bildirmiştir. Bir başka çalışmada (Jubb ve ark., 2004) ise tüm yaş grupları için testin ortalama sensitivitesinin yaklaşık %15 olacağı belirlenmiştir. Bu çalışmada da

kullanılan antikor ELISA'nın kültür yöntemi ile karşılaştırıldığında sensitivitesi diğer araştırma sonuçlarına benzer (Jubb ve ark., 2004; Nielsen ve Toft, 2006; Whitlock ve ark., 2000) ve %20 olarak bulundu.

Paratüberküloz tanısında kullanılan PZR ve kültür yöntemleri karşılaştırılmış ve PZR ile daha fazla sayıda örneğin pozitif saptandığı açıklanmıştır (Coelho ve ark., 2017; Kumar ve ark., 2012). Benzer şekilde bu çalışmada da PZR ile 40 örnek pozitif belirlenirken, sadece 5 örnekte izolasyon yapılabildi. Kültür ile karşılaştırıldığında PZR analizinin sensitivite ve spesifite oranları sırasıyla %60-%74 olarak hesaplandı. Sunulan çalışmada ticari bir dışkı ekstraksiyon kiti (ZR Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit, Zymo Research Corp., USA) kullanıldı. Bu kitin diğer ticari kitlere göre PZR sensitivitesini %94 oranında arttırabildiği (Leite ve ark., 2013) ve gaitada az miktarda bakteri olan (1-10 kob) enfekte hayvanların dahi tespit edilmesini sağlayabildiği (Mita ve ark., 2016) açıklanmıştır. Diğer taraftan gaitadaki canlı veya ölü bakteri sayısı az olsa dahi PZR ile saptanabileceği bildirilmiştir (Plain ve ark., 2014; Whittington ve ark., 2017). Gaita ile çıkarılan bakteri sayısının az veya çok olması yanında canlı veya ölü olmasının testi etkilememesi ve dışkı ekstraksiyon kitinin sensitivitesinin yüksek olması gibi nedenlere bağlı olarak çalışmada kültüre oranla PZR ile daha fazla sayıda pozitiflik saptandığı kanısına varıldı.

El-Malek ve ark. (2015) *Map*'in teşhisine yönelik farklı gen bölgeleri ile farklı primer çiftleri kullanarak karşılaştırma yaptıkları çalışmalarında; IS900 gen bölgesi ve 150C/921 primer çiftinin kullanıldığı PZR analizlerinde daha iyi sonuç aldıklarını, nested PZR ile 150C/921 primer çifti ile uygulanan konvansiyonel PZR analizinin %100 sensitiviteye sahip olduğunu açıklamıştır. Diğer taraftan Whittington ve ark. (1999b) 150C/921 primer çiftinin yanlış pozitif sonuç vermediğini rapor etmiştir. Bu çalışmada direk gaitadan izole edilen DNA örneklerinde IS900 gen bölgesine yönelik 150C/921 ve P90/P91 olmak üzere iki farklı primer çifti kullanıldı. 150C/921 primer çiftinin kullanıldığı konvansiyonel PZR ile birlikte daha fazla sayıda gaita örneği pozitif saptandı. Diğer taraftan gaita kültüründen elde edilen 5 *Map* izolatının tümü 150C/921 primer çifti ile pozitif saptanırken, P90/P91 primer çifti ile hiçbir izolatta *Map* DNA'sı tespit edilemedi. Bu nedenle diğer araştırmacıların (El-Malek ve ark., 2015; Whittington ve ark., 1999b) da belirttiği gibi 150C/921 primer çiftinin kullanıldığı

PZR ile enfekte hayvanların daha doğru olarak saptanabileceği sonucuna varıldı. Diğer taraftan nested PZR analizlerinde ilk PZR ürününün ikinci PZR için kalıp DNA olarak kullanılması nedeniyle inhibitör madde oranında azalma olacağı ve bu nedenle konvansiyonel PZR'undan daha doğru sonuç alınabileceği bildirilmiştir (Bölske ve Herthnek, 2010; Leite ve ark., 2013; Kumar ve ark., 2012). Bu çalışmada da primerler arasında farklı sonuçlar elde edilmesi nedeniyle P90/P91 primer çifti ile çalışılan tüm PZR ürünlerine 150C/921 primer çifti ile nested PZR uygulandı. Nested PZR'da 150C/921 primer çiftinin kullanıldığı konvansiyonel PZR ile aynı sonuç elde edildi. Bu bulgu, kullanılan primer çiftinin sensitivitesi (El-Malek ve ark. 2015; Whittington ve ark., 1999b) ile birlikte inhibitör madde oranındaki azalmanın (Bölske ve Herthnek, 2010; Leite ve ark., 2013; Kumar ve ark., 2012) PZR uygulamalarına etkisi olacağını bildiren çalışmaları desteklemektedir.

Koyun ve sığır tipi *Map* suşlarının IS900 gen bölgesinin nükleotid dizisinde büyük farklılıklar tespit edilmiştir (Castellanos ve ark., 2009; Semret ve ark., 2006; Sohal ve ark., 2009). Genom çalışmalarında da koyun ve sığır tipi *Map* suşlarında saptanan inversiyon, insersiyon/delesyon ve duplikasyonlar nedeniyle farklılıklar olduğu dikkat çekmiştir (Bannantine ve ark., 2012; Castellanos ve ark., 2009; Stevenson, 2015). Nükleotid düzeyinde ise tek nükleotid polimorfizminin saptandığı koyun S397 ve sığır K-10 suşlarının birbirine taban tabana zıt olduğu rapor edilmiştir (Bannantine ve ark., 2012). Diğer taraftan Whittington ve ark. (1999b), PZR uygulamalarında IS900'un uzun fragmentlerine nazaran kısa fragmentlerinin amplifiye edilmesinin daha doğru olacağını ifade etmiştir. Bu tez çalışmasında da P90/P91 primer çifti ile direk gaitadan sadece 4 DNA örneğinin pozitif ve kültürden izole edilen S tipi *Map* izolatlarının bu primer çifti ile negatif olarak değerlendirilmesinde; amplifiye olacak fragmentin daha uzun olmasından veya hedef gen bölgesinin nükleotid dizilimindeki farklılıktan kaynaklanabileceği düşünüldü. *Map* dışındaki izolatlarda nadir de olsa IS900 benzeri sekansların bulunabileceği ve bu nedenle rutin teşhis uygulamalarında testin spesifitesi ile ilgili hala bazı belirsizliklerin olduğu bildirilmiştir (Eamens ve ark., 2015). Nitekim bazı çalışmalarda (Green ve ark., 1989; Lauf ve ark., 1999;) *Pseudomonas* türlerinin IS900 gen bölgesi ile zayıf bir homoloji gösterdiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada P90/P91 primer çifti ile 400 bp yerine 500

bp’de bant tespit edilen bir örneğin DNA dizi analizinde *Pseudomonas* sp. olduğu belirlendi. Bu bulgu, *Map* dışında bazı mikroorganizmalarda da IS900 benzeri sekansların bulunabileceği bildiren araştırmacıları (Eamens ve ark., 2015; Green ve ark., 1989; Lauf ve ark., 1999) desteklemektedir. Diğer taraftan bu araştırmada kültür ile *Map* izolasyonu yapılmış olan 5 gaita örneğinden elde edilen DNA’ların kullanıldığı PZR analizinde sadece 3 örnekte *Map* DNA’sı tespit edildi. Test edilen DNA’ların gaita kökenli olması nedeniyle hedef ve hedef olmayan DNA konsantrasyonları ile örnek DNA’sında bulunan çeşitli inhibitör maddelerin bu duruma yol açmış olabileceği düşünüldü (Correa-Valencia ve ark., 2017; Kawaji ve ark., 2011; Kim ve ark., 2016; Leite ve ark., 2013; Mita ve ark., 2016; Sevilla ve ark., 2014; Youssef ve ark., 2014).

Paratüberküloz teşhisinde kullanılan test sonuçları arasında uyumsuzluk olduğu ve herhangi bir test ile hastalık yönünden negatif bulunan bir hayvanın gerçekten enfekte olmadığını söylenemeyeceği ve bu nedenle birden fazla testin kullanılması gerektiği belirtilmiştir (Dreier ve ark., 2006; Glanemann ve ark., 2004; Muskens ve ark., 2003). Ayrıca enfeksiyonun her aşamasında hastalığı tespit edebilen bir yöntemin bulunmadığı da ileri sürülmüştür (Nielsen, 2010; OIE, 2008; OIE, 2018). Bu çalışmada pozitif kabul edilen 73 koyuna ait test sonuçları farklılık gösterdi. Koyunların 23 (%31,51)’ü PZR, ZN boyama; 5 (%6,85)’i IFN- γ ELISA, ZN boyama, PZR; 3 (%4,11)’ü antikor ELISA, ZN boyama, PZR; 3 (%4,11)’ü ZN boyama, PZR, kültür ve 2 (%2,74)’si ise IFN- γ ELISA, antikor ELISA, ZN boyama, PZR yöntemleri ile pozitif olarak belirlendi. Enfeksiyonda antikorların gaita ile bakteri atılımı başlamadan önce saptanabileceği belirtilmiştir (Nielsen ve Toft, 2008). Nitekim bu çalışmada da antikor yanıtının saptandığı 10 koyun PZR veya kültür ile negatif bulundu. Bu hayvanlarda gaita ile etken atılımının henüz başlamamış veya gaita ile atılım aralıklı olacağından örnekleme sırasında gaitada bakterinin bulunmamış olabileceği düşünüldü. Diğer taraftan 6 koyunda hem antikor yanıtı saptandı ve hem de gaita örneklerinde *Map* DNA’sı belirlendi. Enfeksiyonun gelişim evreleri göz önünde bulundurulduğunda (Nielsen, 2010; OIE, 2008; OIE, 2018; Whittington ve ark., 2017), saptanabilir bir antikor düzeyi ile gaita ile *Map*’in atılımının birlikte olması olası bir durum olarak değerlendirildi.

Çalışmalarda enfeksiyonun erken döneminde hücrel (Th1) yanıtın baskın olduğu (Coussens ve ark., 2004; Gillan ve ark., 2010; Khalifeh ve Stabel, 2004a; Magombedze ve ark., 2015; Stabel ve Robbe-Austerman, 2011), enfeksiyon ilerledikçe artan antikor yanıtı ile birlikte hücrel yanıtın azalarak humoral yanıtla dönüştüğü (Th1-Th2) rapor edilmiştir (Begg ve Whittington, 2010; Coussens ve ark., 2004; Maroudam ve ark., 2015; Stabel, 2010). Ancak bu çalışmada antikor yanıtının saptandığı 5 koyunda aynı zamanda IFN- γ yanıtı da tespit edildi. Begg ve ark. (2011) deneysel enfekte edilen koyunlarda; IFN- γ yanıtı gibi antikor yanıtının da enfeksiyonun erken dönemlerinde arttığını ve deneyde yer alan koyunların çoğunda IFN- γ ile antikor yanıtının geçici bir süre birlikte saptandığını rapor etmiştir. Bu çalışmada da benzer bir sonuç elde edilmesi nedeniyle koyunlarda her iki yanıtın eş zamanlı olarak tespit edilebileceği kanısına varıldı. Diğer taraftan IFN- γ yanıtı, kültür (n: 1) ya da PZR (n: 8) ile enfekte olduğu belirlenen hayvanlarda da saptandı. IFN- γ ELISA ile daha fazla sayıda subklinik enfekte hayvanın belirlenebileceğini raporlayan araştırmacılar (Alvarez ve ark., 2008; Vazquez ve ark., 2013) ile aynı yorumlama kriterinin kullanıldığı bu çalışmadan elde edilen bulgulara dayanılarak gaita ile aralıklı da olsa *Map* atılımının olacağı subklinik enfekte hayvanların IFN- γ ELISA ile de saptanabileceği söylenebilir.

Koyunlarda paratüberkülozun *paucibasiller*, *multibasiller* ve asemptomatik olmak üzere üç farklı patolojik formu olduğu ve bu formların baskın olan immun yanıt ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Clarke, 1997; Smeed ve ark., 2007). *Paucibasiller* form Th1 (IFN- γ) tip immun yanıt, *multibasiller* form ise Th2 (antikor) tip immun yanıt ile karakterize edilmektedir (Clarke 1997; Gillan ve ark., 2010; Smeed ve ark., 2007). Asemptomatik hayvanlarda klinik semptom veya patolojik bir bulgu olmadığı halde hayvanların *Map* ile enfekte olduğu ve bu hayvanların kültür, PZR veya antikor ELISA testi ile tespit edilebileceği bildirilmiştir (Smeed ve ark., 2007). Bu immun yanıt farklılıklarını daha iyi anlayabilmek için bu çalışmada paratüberküloz yönünden pozitif saptanan 40 koyun ile tanı testlerinin tümünde negatif bulunan 40 koyun seçildi. Bu koyunlarda hücrel immunitiyi değerlendirebilmek için IFN- γ ve bu sitokine alternatif olabileceği düşünülerek NP düzeyleri, humoral immun yanıt için ise IL-10 ile antikor düzeyleri araştırıldı. Birçok araştırmacı (Barry ve ark., 2011; Bosward ve

ark., 2010; Delgado ve ark., 2012; Seward ve ark., 2007) paratüberkülozlu hayvanların IFN- γ yanıtlarını IFN- γ ELISA ile ölçmüştür. Plazma örneklerinde non-spesifik olarak IFN- γ bulunabileceği ve bu nedenle testte antijen yerine steril PBS ile uyarılan hücrelerden üretilen IFN- γ düzeylerinin non-spesifik olduğu belirtilmiştir (Delgado ve ark., 2012). Barry ve ark. (2011) paratüberkülozlu sığırların avian PPD ve Johnin PPD antijenleri ile uyarılan hücrelerinden üretilen IFN- γ yanıtlarını benzer seviyede ölçtüklerini ve bu nedenle IFN- γ ELISA testinde avian PPD'nin kullanılabileceğini belirtmiştir. Bu sonuçlar göz önünde bulundurularak bu çalışmada hasta ve hasta olmayan koyunların avian PPD antijeni ile uyarılan hücrelerinden üretilen IFN- γ ortalama OD değerleri kullanılarak karşılaştırıldı. İnsanlarda bruselloz (Akbulut ve ark., 2005; Cesur ve ark., 2011) ve tüberküloz (Cesur ve ark., 2011; Yeğen, 2004) gibi kronik hastalıklarda NP düzeyinin arttığı ve bu hastalıkların tanısında veya takibinde NP'den yararlanılabileceği ileri sürülmüştür. Bu çalışmada da sitokin profillerini etkileyebileceğinden örneklenen 150 koyun, bruselloz ve tüberküloz yönünden incelendi ve koyunlar her iki hastalık yönünden de negatif bulundu. Antikor, IFN- γ ve IL-10 düzeyleri açısından pozitif ve negatif hayvanlar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark saptandı ($p < 0,01$). Nitekim Begg ve ark. (2005), deneysel enfekte edilen koyunlarda IFN- γ düzeyinin kontrol grubuna göre ($p < 0,01$) çok daha yüksek olduğunu, antikor seviyesinde 3 ay kadar erken bir dönemde artış saptadıklarını, ancak kontrol grubundaki koyunlarda antikor seviyesinin çalışma boyunca minimum düzeyde kaldığını bildirmiştir. Diğer bir deneysel çalışmada (Silva ve ark., 2011) da koyunların periferik kanında antijene spesifik IL-10 düzeyinin kontrol grubundan çok yüksek bulunduğu ve 4 aydan itibaren kademeli olarak arttığı bildirilmiştir. İnsanlardaki bruselloz ve tüberküloz çalışmalarının (Akbulut ve ark., 2005; Cesur ve ark., 2011; Yeğen, 2004) aksine, bu çalışmada paratüberküloz pozitif ve negatif olarak tanımlanan koyunların serum NP düzeyleri arasında istatistiksel bir fark ($p > 0,05$) saptanmadı. Bu bulgu, koyunlarda NP'in paratüberkülozdaki rolü üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamasına rağmen, *Map* ile enfekte ve enfekte olmayan sığırların NP düzeylerinin benzer bulunduğunu bildiren bir araştırma (Mikkelsen, 2011) sonucunu desteklemektedir. Paratüberküloz yönünden pozitif olarak belirlenen 40 koyunun antikor ve sitokin düzeyleri tanı testlerine göre gruplara ayrılarak değerlendirildiğinde; sadece IFN- γ ELISA ile pozitif saptanan koyunların

enfeksiyonun *paucibasiller* formunda, antikor ELISA, ZN boyama, PZR veya kültür yöntemi ile pozitif olarak belirlenen hayvanların ise *multibasiller* formda olabileceği düşünüldü. IFN- γ düzeyi, IFN- γ ELISA ile pozitif saptanan hayvanlarda en yüksek düzeylerde seyretmesine rağmen, ZN boyama, PZR veya kültür yöntemi ile pozitif belirlenen hayvanlarda en düşük düzeyde ölçüldü ($p<0,01$). Elde edilen bu sonuç, dışkı, süt, doku gibi örneklerde az miktarda veya hiç basil bulundurmayan paratüberkülozlu hayvanlarda Th1 (IFN- γ) yanıtının baskın olduğunu bildiren araştırmalar (Clarke, 1997; Coussens ve ark., 2004; Gillan ve ark., 2010; Khalifeh ve Stabel, 2004a; Magombedze ve ark., 2015; Smeed ve ark., 2007; Smeed ve ark., 2010; Stabel ve Robbe-Austerman, 2011) ile uyumlu bulundu. Aynı zamanda bu bulgu, güçlü bir IFN- γ yanıtının konakçı tarafından patojenin etkin bir şekilde kontrolünün sağlanması veya ortadan kaldırılmasında etkili olabileceği görüşünü (Krüger ve ark., 2015; Mikkelsen ve ark., 2009; Plattner ve ark., 2009; Sohal ve ark., 2008) de desteklemektedir.

Deneyssel olarak enfekte edilen hayvanlarda yapılan bazı çalışmalarda (Begg ve ark., 2011; Robinson ve ark., 2008; Waters ve ark., 2003), IFN- γ gibi antikor yanıtının da erken dönemde gelişebildiği saptanmıştır. Benzer şekilde sunulan çalışmada da doğal olarak enfekte olduğu belirlenen 6 koyunda hem antikor hem de IFN- γ yanıtı birlikte saptandı. Ayrıca IFN- γ ELISA ile pozitif saptanan koyunlar ile sadece antikor ELISA testi ile pozitif saptanan koyunlar karşılaştırıldığında IFN- γ düzeyinde bir düşüş saptanmış olsa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Deneyssel olarak enfekte edilen koyunlarda yürütülen bir çalışmada (Begg ve ark., 2011), IFN- γ ve antikor yanıtı birlikte tespit edilmiş ve tespit edilen bu antikor yanıtının erken dönemde üretilen IL-10 yanıtı ile ilişkili olabileceğini ileri sürülmüştür. Bu tez çalışmasında da IFN- γ ile birlikte IL-10 yanıtı da tespit edildi. IL-10 düzeyinde pozitif koyunlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamış olmasına rağmen, sadece IFN- γ ELISA ile pozitif bulunan koyunlarda en yüksek düzeyde olduğu belirlendi ve bu sonuçların Begg ve ark. (2011)'nin öngörüsünü destekleyebileceği kanısına varıldı.

Hastalığın ilerlemesiyle birlikte IFN- γ üretiminin engellendiği ve IL-10 gibi immunosupresif sitokinlerin baskın hale geldiği bildirilmiştir (Buza ve ark., 2004;

Smeed ve ark., 2007). Bu durumun *Map*'in hayatta kalmasını desteklediği ve konakçıda enfeksiyonun ilerleyerek klinik aşamaya geçmesini sağladığı rapor edilmiştir (Magombedze ve ark., 2015). IL-10 üretiminin sığır makrofajlarında antimikrobiyal yanıtı baskılayan en önemli mekanizma olduğu (Weiss ve Souza, 2008) ve IL-10'un bu immunosupresif aktivitesinin *Map*'in hayatta kalma olasılığını arttırdığı ortaya konulmuştur (de Almeida ve ark., 2008; Khalifeh ve Stabel, 2004a; Khalifeh ve Stabel, 2004b, Weiss ve ark., 2005). Buzağılarda etkenin dışkı ile çıkarılmadığı zamanlarda IFN- γ yanıtının yüksek, IL-10 yanıtının ise düşük saptandığı, dışkı ile bakteri atılımı başladığında bu durumla orantılı olarak IL-10 sentezi ile Th2 sayısında artış olduğu belirlenmiştir (Magombedze ve ark., 2015). Ancak bu çalışmada, doğal enfekte koyunlar tanı testlerine göre gruplara ayrılarak incelendiğinde enfeksiyonun her döneminde IL-10 yanıtının ölçülebildiği görüldü. Bu bulgu, *Map* ile enfekte koyunlarda IL-10 yanıtının IFN- γ yanıtı kadar erken bir dönemde dâhil olmak üzere enfeksiyonun her aşamasında tespit edilebilir düzeyde olabileceğini gösterdi. Sonawane ve Tripathi (2016) tarafından IL-10 üretiminin hem *multibasiller* hem de *paucibasiller* formdaki koyunlarda kontrol grubuna göre çok daha yüksek olduğunu bildirilmiş olmasına rağmen, Silva ve ark. (2011) deneysel enfekte koyunlarda IL-10 sentezini incelemiş ve IL-10 düzeyinin lezyonsuz veya az basil bulunduran hayvanlarda çok basil bulunduranlara oranla daha yüksek olduğunu rapor etmiştir. Bu çalışmada da paratüberküloz olarak tanımlanan koyunlarda IL-10 üretimi saptandı ve hastalığı erken dönemde tespit edebilen bir test olan IFN- γ ELISA ile pozitif bulunan koyunlarda IL-10 en yüksek düzeyde tespit edildi. Bu bulgular Silva ve ark. (2011) ile Sonawane ve Tripathi (2016)'nin sonuçlarını desteklediği gibi, aynı zamanda hastalığın koyunlarda sığırlardan farklı olarak erken evrede hem Th1 (IFN- γ) hem de Th2 (IL-10) yanıtının saptanabileceğini gösterdi (Begg ve ark., 2011; Silva ve ark., 2011). Diğer taraftan, paratüberküloz pozitif ve negatif hayvanlar arasında IL-10 düzeyi bakımından önemli bir fark saptanmış olması, bu sitokinin IFN- γ gibi enfekte hayvanların belirlenmesinde kullanılabileceğini düşündürdü.

Hastalığın ileri aşamalarında IL-10'un Th2 yanıtına yol açtığı, IL-10 ve Th2 yanıtının Th1 yanıtını baskıladığı, Th2 yanıtının makrofajlar tarafından bakteri opsonizasyonunu arttırdığı ve böylece *Map*'in makrofajlar içinde canlı kalarak

çoğaldığı ileri sürülmüştür (Cope ve ark., 2011; Magombedze ve ark., 2015). Bu dönemde hayvanların intestinal mukozasında *Map* yükü arttığı için gaita kültürü veya PZR ile pozitif sonuç alınabileceği ve gelişen antikorların ELISA ile tespit edilebileceği rapor edilmiştir (Clarke, 1997; Correa-Valencia ve ark., 2017; Heidarnejhad ve Safi, 2015; Nielsen, 2010; Salgado ve ark., 2007; Stevenson, 2010; Whittington ve ark., 2017). Ancak Begg ve ark. (2011), deneysel olarak enfekte ettikleri koyunların %39'unda immun yanıtın güçlü bir IFN- γ yanıtından antikor yanıtına dönüştüğünü, %16'sında ise antijene spesifik antikor yanıtının engellediğini saptayarak enfekte koyunlarda her zaman Th1 yanıtının Th2 yanıtına dönüşmesinin görülmeyeceğine dikkat çekmiştir. Gossner ve ark. (2017) da *paucibasiller* veya *multibasiller* formdaki koyunlarda Th1 yanıtının Th2 yanıtına dönüşmediğini rapor etmiştir. Ayrıca immun yanıtın Th1'den Th2'ye dönüşmesinde IL-10'un tek başına yeterli olmadığı, immun yanıtın değişiminde IL-10'un yanı sıra TGF- β ve IL-4 gibi sitokinlerin önemli rol oynadıkları açıklanmıştır (Coussens ve ark., 2004; Gillan ve ark., 2010; Magombedze ve ark., 2015). Sonawane ve Tripathi (2016), kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında *paucibasiller* koyunlarda IL-10 düzeyinde yüksek bir artış, *multibasiller* koyunlarda ise IL-10 ve TGF- β düzeylerinde önemli bir artış ile birlikte IFN- γ düzeyinde yüksek oranda düşme saptadıklarını rapor etmiştir. Bu çalışmada, IFN- γ ve antikor ELISA ile negatif, ancak ZN boyama, PZR ve kültür yöntemi ile pozitif bulunan koyunların antikor düzeyi ($0,20 \pm 0,04$), negatif hayvanlar ($0,19 \pm 0,03$) ile benzer bulundu. Ayrıca IL-10 ile antikor düzeyleri arasında da anlamlı bir ilişki saptanmadı. Bu durum, koyunlarda her zaman Th2 yanıtının gelişmemesinden veya antikor oluşumunda IL-10'un tek başına yeterli olmamasından kaynaklanmış olabilir.

Koyunlarda hücresel immun yanıtın diğer bir belirteci olan NP'in paratüberkülozdaki rolü üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Enfekte ve enfekte olmayan sığırlarda ise NP düzeyleri bakımından bir fark saptanmadığı açıklanmıştır (Mikkelsen, 2011). Bu çalışmada pozitif ve negatif hayvanların NP düzeyleri arasında istatistiksel bir fark saptanmadı. Ancak sadece IFN- γ ELISA ile pozitif saptanan koyunlarda en yüksek olmak üzere negatif olduğu belirlenen 40 koyun ile ZN boyama, PZR veya kültür ile pozitif belirlenen hayvanlarda da yüksek düzeyde olduğu belirlendi. Antikor ELISA ile pozitif saptanan koyunlarda enfekte diğer

koyunlara göre NP düzeyi çok düşük ölçüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. NP ile IFN- γ ve IL-10 ile antikor düzeyi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamasına rağmen, paratüberküloz olduğu belirlenen koyunlarda NP ve antikor düzeyi arasında ters bir ilişki saptandı. Bu nedenle enfeksiyonda NP'nin rolünün anlaşılabilmesi için deneysel enfekte edilen hayvanlarda veya hücre kültürü çalışmalarında *Map*'e karşı oluşan spesifik NP yanıtının ölçülmesi gerektiği sonucuna varıldı.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak; bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre;

1. Burdur ilinde farklı testler kullanıldığında farklı sonuçlar alınmış olsa da koyunlarda paratüberküloz oranının yüksek (%48,66) olduğu,

2. Hastalığın teşhisinde kullanılan testler arasında hastalık evrelerine göre farklılık saptanabileceği,

3. Hastalığın sınırlandırılmasında önemli rol oynayan IFN- γ yanıtının azalmasına bağlı olarak gaita ile etkenin çıkarılabileceği ve enfeksiyonun bulaşıcı aşamaya gelebileceği,

4. Enfeksiyonun erken veya subklinik dönemindeki hayvanların belirlenmesinde IFN- γ yanıtı kadar erken bir dönemde saptanan IL-10'un, IFN- γ ELISA ile birlikte sürü taramalarında kullanılabileceği ve böylece enfekte hayvanların gaitaları ile etkeni saçmadan sürüden çıkarılarak sürü sağlığının korunabileceği,

5. Hastalığın farklı evrelerinde üretildikleri bildirilmesine rağmen, bu çalışmada IFN- γ , IL-10 ve antikor yanıtının birlikte saptanması nedeniyle paratüberkülozun koyunlarda sığırlardan farklı seyredebileceği,

6. Hastalığın klinik aşamasında olan koyunların belirlenmesinde; sensitiviteleri çok düşük bulunan antikor ELISA ve kültür yerine basit bir saha testi olan ZN boyama veya sensitivitesi ve spesifitesi diğer tanı testlerinden daha yüksek olan PZR gibi yöntemlerin kullanılabileceği,

7. Paratüberküloz için ülke çapında epidemiyolojik çalışmalar yapılarak kontrol programlarına zemin hazırlanmasına ihtiyaç olduğu,

8. Hastalığın koyun ve sığırlarda farklı seyir izlemesinin nedenlerini, koyun ve sığır suşları arasındaki farklılıkları ve bu farklılıkların hastalığın patogenezindeki rollerini, tüm *Map* suşlarının virulent olup olmadıklarını, ruminant türleri arasındaki duyarlılık farklılıklarını, hangi konakçı faktörlerinin enfeksiyonun gelişimini kontrol ettiğini ve immunopatogeneizde NP'nin rolünü ortaya koyacak yeni çalışmaların yapılması gerektiği söylenebilir.

KAYNAKLAR

Akbulut HH, Celik I, Akbulut A, Yuce P, Kilic SS (2005). Serum neopterin levels in patients with brucellosis. *J. Infection.*, **51**, 281-286.

Albuquerque P, Santos A, Souza Neto OL, Kim PCP, Cavalcanti EFTSF, Oliveira JMB, Mota RA, Júnior JWP (2017). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk from the state of Pernambuco, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, **48**, 113-117.

Al-Dubaib MA, Mahmoud OM (2008). Paratuberculosis of goats at Qassim region of central Saudi Arabia. *Bulg. J. Vet. Med.*, **11**, 65-69.

Alibaşoğlu M, Demirer F, Yücel N (1969). Paratüberkülozda alerjik reaksiyonların patolojik bulgularla uygunluk derecesi üzerine araştırma. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **16**, 236-256.

Alibaşoğlu M, Ertürk E, Yücel N (1973). Türkiyede rastlanan ilk keçi paratüberküloz olayları üzerine patolojik incelemeler. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **20**, 44-63.

Álvarez J, de Juan L, Bezos J, Romero B, Sáez JL (2008). Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection. *Vet. Microbiol.*, **128**, 72-80.

Alzuherri HM, Little D, Clarke CJ (1997). Altered intestinal macrophage phenotype in ovine paratuberculosis. *Res. Vet. Sci.*, **63**, 139-143.

Anonim (2019). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*'in hücre duvarı yapısı. <http://2009.igem.org/wiki/images/1/17/MbMyco.png> (Erişim Tarihi: 17.04.2019).

Anonim (2018a). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. National Center for Biotechnology Information (NCBI) Taxonomic Browser. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/> (Erişim Tarihi: 13.07.2018).

Anonim (2018b). Ziehl-Neelsen stain (ZN-stain): Principle, procedure, reporting and modifications. <https://laboratoryinfo.com/zn-stain/> (Erişim Tarihi: 18.02.2018).

Arda M (2006). *Temel Mikrobiyoloji*. 3. Baskı, Ankara: Medisan Yayınevi, s: 283-289.

Arsenault J, Girard C, Dubreuil P, Daignault D, Galarneau JR, Boisclair J, Simard C, Bélanger D (2003). Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Prev. Vet. Medicine*, **59**, 67-81.

Arsenault RJ, Maattanen P, Daigle J, Potter A, Griebel P, Napper S (2014). From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *BMC Vet. Res.*, **45**, 54.

Atala N, Akçay E (2001). Türkiye genelinde sığır paratüberkülozu prevalansının ELISA ile araştırılması. *Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg.*, **12**, 39-48.

Aydogan A, Haligur M, Ozmen O (2013). *Clinicopathological investigations of paratuberculosis disease in sheep*. XIII Middle European Buiatric's Congress. 5-8 June Belgrade/ Republic of Serbia, p: 268-276.

Ayele WY, Macháčková M, Pavlík I (2001). The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Vet. Med. (Praha)*, **46**, 205-224.

Ayele WY, Bartos M, Svastova P, Pavlik I (2004). Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Vet. Microbiol.*, **103**, 209-217.

Bannantine JP, Wu C-W, Hsu C, Zhou S, Schwartz DC, Bayles DO, Paustian ML, Alt DP, Sreevatsan S, Kapur V, Talaat AM (2012). Genome sequencing of ovine isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* offers insights into host association. *BMC Genomics*, **13**, 89.

Baquero MM, Plattner BL (2016). Bovine WC1(+) $\gamma\delta$ T lymphocytes modify monocyte-derived macrophage responses during early *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **170**, 65-72.

Barkema HW, Hesselink JW, McKenna SLB, Benedictus G, Groenendaal H (2010). *Global prevalence and economics of infection with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in ruminants*. In: Behr MA, Collins DM. (Eds), *Paratuberculosis: organism, disease, control*. Oxfordshire Wallingford, UK: CAB International, p: 10-21.

Barry C, Corbett D, Bakker D, Andersen P, McNair J, Strain S (2011). The effect of *Mycobacterium avium* complex infections on routine *Mycobacterium bovis* diagnostic tests. *Vet. Med. Int.*, ID 145092, doi:10.4061/2011/145092 1-7.

Bastida F, Juste RA (2011). Paratuberculosis control: A review with a focus on vaccination. *J. Immune Based Ther. Vaccines*, **9**, 8.

Bauman CA, Jones-Bitton A, Jansen J, Kelton D, Menzies P (2016a). Evaluation of fecal culture and fecal RT-PCR to detect *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* fecal shedding in dairy goats and dairy sheep using latent class Bayesian modeling. *BMC Vet. Res.*, **12**, 212.

Bauman CA, Jones-Bitton A, Menzies P, Toft N, Jansen J, Kelton D (2016b). Prevalence of paratuberculosis in the dairy goat and dairy sheep industries in Ontario, Canada. *Can. Vet. J.*, **57**, 169-175.

Begg D, Whittington R (2010). *Paratuberculosis in sheep*. In: Behr MA, Collins DM. (Eds), Paratuberculosis: organism, disease, control. Oxfordshire Wallingford, UK: CAB International, p: 157-168.

Begg DJ, O'Brien R, Mackintosh CG, Griffin JFT (2005). Experimental infection model for Johne's disease in sheep. *Infect. Immun.*, **73**, 5603-5611.

Begg DJ, de Silva K, Carter N, Plain KM, Purdie A, Whittington RJ (2011). Does a Th1 over Th2 dominancy really exist in the early stages of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections. *Immunobiology.*, **216**, 840-846.

Begg DJ, de Silva K, Di Fiore L, Taylor DL, Bower K, Zhong L, Kawaji S, Emery D, Whittington RJ (2010). Experimental infection model for Johne's disease using a lyophilised, pure culture, seedstock of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.*, **141**, 301-311.

Berberoğlu M, Civelek T (2016). Seroprevalence of subclinical paratuberculosis in dairy cattle in Manisa region of Turkey. *Kocatepe Vet. J.*, **9**, 194-199.

Berger S, Griffin F (2006). A comparison of ovine monocyte derived macrophage function following infection with *Mycobacterium avium* ssp. *avium* and *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Immunol. Cell. Biol.*, **84**, 349-356.

Bhat AM, Malik HU, Singh S V, Hussain T, Chaubhey KK (2018). Bio-prevalence and molecular diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in small ruminant population of Ganderbal district of Kashmir valley. *J. Entomol. Zool. Stud.*, **6**, 1-4.

Boelaert F, Walravens K, Biront P, Vermeersch JP, Berkvens D and Godfroid J (2000). Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Vet. Microbiol.*, **77**, 269-281.

Borum AE, Çatık S, Mecitoğlu Z, Demir G, Ülgen M, Şentürk S (2014). ELISA ve fekal bakteriyoskopi ile sığırlarda paratüberküloz prevalansının belirlenmesi. *Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg.*, **25**, 1-5.

Bölske G, Herthnek D (2010). *Diagnosis of paratuberculosis by PCR*. In: Behr MA, Collins DM. (Eds), Paratuberculosis: organism, disease, control. Oxfordshire Wallingford, UK: CAB International, p: 267-283.

Böttcher J, Gangl A (2004). *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* combined serological testing and classification of individual animals and herds. *J. Vet. Med. B.*, **51**, 443-448.

Brown CC, Baker DC, Barker IK (2007). *Infectious and parasitic diseases of the gastrointestinal tract*. In: Maxie MG. (Ed), Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals. 5th Edition, Philadelphia: W.B. Saunders, p: 222-225.

Brown-Elliott BA, Wallace RJ (2002). Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing *Mycobacteria*. *Clin. Microbiol. Rev.*, **15**, 716-46.

Bush RD, Toribio JALML, Windsor PA (2006). The impact of malnutrition and other causes of losses of adult sheep in 12 flocks during drought. *Aust. Vet. J.*, **84**, 254-260.

Buyuk F, Celebi O, Akca D, Otlı S, Tazegul E, Gulmez A and Sahin M (2014). Estimated apparent and true prevalences of paratuberculosis in sheep herds of the Kars region in northeastern Turkey. *Vet. Med.-Czech.*, **59**, 331-335.

Buza JJ, Hikono H, Mori Y, Nagata R, Hirayama S, Bari AM, Shu Y, Tsuji NM, Momotani E (2004). Neutralization of interleukin-10 significantly enhances gamma interferon expression in peripheral blood by stimulation with Johnin purified protein derivative and by stimulation with Johnin purified protein derivative and by infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in experimentally infected cattle with paratuberculosis. *Infect. Immun.*, **72**, 2425-2428.

Carrigan MJ, Seaman JT (1990). The pathology of Johne's disease in sheep. *Aust. Vet. J.*, **67**, 47-50.

Castellanos E, Aranaz A, De Buck J (2010). Rapid identification and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* types by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis of the MAP1506 Locus. *J. Clin. Microbiol.*, **48**, 1474-1477.

Castellanos E, Aranaz A, De Juan L, Álvarez J, Rodríguez S, Romero B, Bezos J, Stevenson K, Mateos A, Domínguez L (2009). Single nucleotide polymorphisms in the IS900 sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* are strain type specific. *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 2260-2264.

Celik A, Turutoglu H (2017). Seroprevalence of paratuberculosis in cattle, sheep and goats in Burdur, southwestern Turkey. *Isr. J. Vet. Med.*, **72**, 30-36.

Cesur S, Aksaray S, Irmak H, Tarhan G, Aslan T, Ceyhan İ, Çiftçi A, Güvener E (2011). Akciğer tüberkülozlu hastalar, brusellozlu hastalar ve sağlıklı bireylerde serum neopterin düzeyleri. *Turk J. Clin. Lab.*, **4**, 127-130.

Cetinkaya B, Erdogan HM, Morgan KL (1998). Prevalence, incidence and geographical distribution of Johne's disease in cattle in England and the Welsh borders. *Vet. Rec.*, **143**, 265-269.

Cetinkaya B, Muz A, Ertas HB, Ongor H, Sezen IY, Gulcu HB (2000). Determination of prevalence of paratuberculosis in dairy cattle by polymerase chain reaction (PCR). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **24**, 371-379.

Chaubey KK, Gupta RD, Gupta S, Singh SV, Bhatia AK, Jayaraman S, Kumar N, Goel A, Rathore AS, Sohal JS, Stephen BJ, Singh M, Goyal M, Dhama K and Derakhshandeh A (2016). Trends and advances in the diagnosis and control of paratuberculosis in domestic livestock. *Vet. Q.*, **36**, 203-227.

Chiodini RJ (2005). *The history of paratuberculosis*. 8th International Colloquium on Paratuberculosis, 14-17 August Copenhagen/ Denmark, p: 1-4.

Chiodini RJ, Chamberlin WM, Sarosiek J, McCallum RW (2012). Crohn's disease and the mycobacterioses: A quarter century later. Causation or simple association? *Crit. Rev. Microbiol.*, **38**, 52-93.

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

Coelho AC, Coelho AM, García-Díez J, Pires MA, Pinto ML (2017). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by several diagnostics techniques in clinical suspected sheep. *J. Hell. Vet. Med. Soc.*, **68**, 167-174.

Coelho AC, Pinto ML, Coelho AM, Rodrigues J (2008a). Coloração de Ziehl-Neelsen como método rápido de diagnóstico de paratuberculose ovina. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.*, **60**, 1097-1102.

Coelho AC, Pinto ML, Coelho AM, Rodrigues J, Juste R (2008b). Estimation of the prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by PCR in sheep blood. *Small Rum. Res.*, **76**, 201-206.

Coelho AC, Pinto ML, Silva S, Coelho AM, Rodrigues J, Juste RA (2007). Seroprevalence of ovine paratuberculosis infection in the Northeast of Portugal. *Small Rum. Res.*, **71**, 298-303.

Collins M (1996). Diagnosis of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, **12**, 357-371.

Collins DM, Gabric DM, De Lisle GW (1990a). Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 1591-1596.

Collins MT, Kenefeck KB, Sockett DC, Lambrecht RS, McDonald J, Jorgensen JB (1990b). Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter concentrated bovine fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 2514-2519.

Cook KL, Britt JS, Bolster CH (2010). Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in biofilms on livestock watering trough materials. *Vet. Microbiol.*, **141**, 103-109.

Cope A, Friec GL, Cardone J, Kemper C (2011). The Th1 lifecycle: molecular control of IFN- γ to IL-10 switching. *Trends Immunol.*, **32**, 278- 286.

Corner LA, Pfeiffer DU, Abbott KA (2004). The respiratory tract as a hypothetical route of infection of cattle with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Aust. Vet. J.*, **82**, 170-173.

Correa-Valencia NM, F Ramírezn N, Bülte M, Fernández-Silva JA (2017). Fecal culture and two fecal-PCR methods for the diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a seropositive herd. *Rev Colomb Cienc Pecu.*, **30**, 101-115.

Cousins DV, Evans RJ, Francis BR (1995). Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*. *Aust. Vet. J.*, **72**, 458-462.

Coussens PM, Verman N, Coussens MA, Elftman MD, McNulty AM (2004). Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. *Infect Immun.*, **72**, 1409-1422.

de Almeida DE, Colvin CJ, Coussens PM (2008). Antigen-specific regulatory T cells in bovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **125**, 234-245.

Delgado L, Juste RA, Muñoz M, Morales S, Benavides J, Ferreras MC, Marín JF, Pérez V (2011). Differences in the peripheral immune response between lambs and adult ewes experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **145**, 23-31.

de Silva K, Begg D, Whittington R (2011). The interleukin 10 response in ovine Johne's disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **139**, 10-16.

Dennis MM, Reddacliff LA, Whittington RJ (2011). Longitudinal study of clinicopathological features of Johne's disease in sheep naturally exposed to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.*, **48**, 565-575.

Dhand NK, Toribio JALML, Whittington RJ (2009). Adsorption of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to soil particles. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 5581-5585.

Djønne B (2010). *Paratuberculosis in goats*. In: Behr MA, Collins DM. (Eds), *Paratuberculosis: organism, disease, control*. Oxfordshire Wallingford, UK: CAB International, p: 169-178.

Domingue GJ, Sr Woody HB (1997). Bacterial persistence and expression of disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, **10**, 320-344.

Dreier S, Khol JL, Stein B, Fuchs K, Gutler S, Baumgartner W (2006). Serological bacteriological and molecular biological survey of paratuberculosis (Johne's disease) in Austrian cattle. *J. Vet. Med. B.*, **53**, 477-481.

Dundee L, Grant IR, Ball HJ, Rowe MT (2001). Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *Lett. Appl. Microbiol.*, **33**, 173-177.

Eamens G, Marsh I, Plain K, Whittington R (2015). Australian and New Zealand standard diagnostic test protocols. Paratuberculosis (Johne's disease) Subcommittee on Animal Health Laboratory Standards. <http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/animal/ahl/anzsdp-johnes-disease-july-2015.pdf>. (Erişim Tarihi: 03.10.2017).

Eamens GJ, Whittington RJ, Marsh IB, Turner MJ, Saunders V, Kemsley PD, Rayward D (2000). Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. *Vet. Microbiol.*, **77**, 357-367.

Eisenberg S, Nielen M, Hoeboer J, Bouman M, Heederik D, Koets A (2011). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in bioaerosols after depopulation and cleaning of two cattle barns. *Vet. Rec.*, **168**, 587.

El-Deeb WM, Fouda TA, El-Bahr SM (2014). Clinico-biochemical investigation of paratuberculosis of dromedary camels in Saudi Arabia: Proinflammatory cytokines, Acute phase proteins and oxidative stress biomarkers. *Pak. Vet. J.*, **34**, 484-488.

El-Malek SA, Mohamed KF, Soliman R, El Hariri M (2015). Comparison of the sensitivity of different primers used for identification of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* isolates recovered from clinically suspected cases. *IJSTM.*, **4**, 1-8. ISSN 2394-1537. (Erişim Tarihi: 19.01.2018).

Erganiş O, İstanbulluoğlu E (2002). *İmmünoloji*, 2. Baskı, Konya: Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Yayın Ünitesi, s: 90.

Erganiş O, Hadimli HH, Kav K, Sayın Z, Balevi A, Pınarkara Y, Korro K (2013). *Preparation of paratuberculosis vaccine for anatolian wild sheep: Final report*. The First Western Balkan International Conference about Zoo and Wildlife Diseases. 9-10 May, Tirana, Albania, p: 25-40.

Esen N (2005). *Tüberkülozda mikobakteriyel persistans mekanizmaları*. IV. Tüberküloz Sempozyumu ve IV. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, 8-11 Aralık Malatya, s: 58-62.

Fang Y, Wu W-H, Pepper JL, Larsen JL, Marras SAE, Nelson EA, William BE, Christopher-Hennings J (2002). Comparison of real-time, quantitative PCR with molecular beacons to nested PCR and culture methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 287-291.

Fernández-Silva JA, Correa-Valencia NM, Ramírez NF (2014). Systematic review of the prevalence of paratuberculosis in cattle, sheep, and goats in Latin America and the Caribbean. *Trop. Anim. Health Prod.*, **46**, 1321-1340.

Fischer OA, Matlova L, Dvorska L, Svastova P, Bartos M, Weston RT, Pavlik I (2006). Various stages in the life cycle of syrphid flies (*Eristalis tenax*; Diptera: Syrphidae) as potential mechanical vectors of pathogens causing mycobacterial infections in pig herds. *Folia Microbiol.*, **51**, 147-153.

Fratti RA, Backer JM, Gruenberg J, Corvera S, Deretic V (2001). Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J. Cell Biol.*, **154**, 631-644.

Gao A, Odumeru J, Raymond M, Mutharia L (2005). Development of improved method for isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bulk tank milk: effect of age of milk, centrifugation, and decontamination. *Can. J. Vet. Res.*, **69**, 81-87.

Gao A, Odumeru J, Raymond M, Hendrick S, Duffield T, Mutharia L (2009). Comparison of milk culture, direct and nested polymerase chain reaction (PCR) with faecal culture based on samples from dairy herds infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Can. J. Vet. Res.*, **73**, 58-64.

Gay JM, Sherman DM (1992). Factors in the epidemiology and control of ruminant paratuberculosis. *Vet. Med.*, **87**, 1133-1139.

Giannitti F, Fraga M, Caffarena RD, Schild CO, Banchero G, Armien AG, Travería G, Marthaler D, Wells SJ, Riet-Correa F (2018). *Mycobacterium paratuberculosis* sheep type strain in Uruguay: Evidence for a wider geographic distribution in South America. *J. Infect. Dev. Ctries.*, **12**, 190-195.

Gillan S, O'Brien R, Hughes AD, Griffin JF (2010). Identification of immune parameters to differentiate disease states among sheep infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin. Vaccine Immunol.*, **17**, 108-117.

Glanemann B, Hoelzle LE, Bogli-Stuber K, Jemmi T, Wittenbrink MM (2004). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by culture and serology. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, **146**, 409-415.

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

Gossner A, Watkins C, Chianini F, Hopkins J (2017). Pathways and genes associated with immune dysfunction in sheep paratuberculosis. *Sci. Rep.*, **7**, 1-12.

Grant IR (2010). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Animal-derived Foods and the Environment. In: Behr MA, Collins DM. (Eds), Paratuberculosis: organism, disease, control. Oxfordshire Wallingford, UK: CAB International, p: 29-39.

Grant IR, Williams AG, Rowe MT, Muir DD (2005). Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 2853-2861.

Green EP, Tizard MLV, Moss MT, Thompson J, Winterbourne DJ, Mcfadden JJ, Hermon-Taylor J (1989). Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 9063-9073.

Gumber S, Whittington RJ (2007). Comparison of BACTEC 460 and MGIT 960 systems for the culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* S strain and observations on the effect of inclusion of ampicillin in culture media to reduce contamination. *Vet. Microbiol.*, **119**, 42-52.

Gumber S, Whittington RJ (2009). Analysis of the growth pattern, survival and proteome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* following exposure to heat. *Vet Microbiol.*, **136**, 82-90.

Gumber S, Eamens G, Whittington RJ (2006). Evaluation of a Pourquier ELISA kit in relation to agar gel immunodiffusion (AGID) test for assessment of the humoral immune response in sheep and goats with and without *Mycobacterium paratuberculosis* infection. *Vet. Microbiol.*, **115**, 91-101.

Gümüşsoy KS, Iça T, Abay S, Aydın F, Hizlisoy H (2015). Serological and molecular diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.*, **39**, 147-153.

Gwozdz JM, Thompson KG, Murray A, Reichel MP, Manktelow BW, West DM (2000). Comparison of three serological tests and an interferon- γ . *Aust. Vet. J.*, **78**, 779-783.

Hakioglu F (1968). Bir koyunda tespit edilen paratuberkuloz vakasi (ilk tebliğ). *Pendik Vet. Kont. Arş. Enst. Derg.*, **1**, 144-145.

Harris NB, Barletta RG (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin. Microbiol. Rev.*, **14**, 489-512.

He Z, De Buck J (2010). Localization of proteins in the cell wall of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K10 by proteomic analysis. *Proteome Science*, **8**, 21.

Heidarnejhad O, Safi S (2015). Comparison of culture, ELISA and LAMP-PCR for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Bio. Env. Sci.*, **6**, 279-288.

Hendrick SH, Kelton DF, Leslie KE, Lissemore KD, Archambault M, Duffield TF (2005). Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **227**, 1302-1308.

Hickey SM, Morris CA, Dobbie JL, Lake DE (2003). Heritability of Johne's disease and survival data from Romney and Merino sheep. *Proc. New Zeal. Soc. Anim. Prod.*, **63**, 179-182.

Hope AF, Kluver PF, Jones SL, Condron RJ (2000). Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J.*, **78**, 850-856.

Hughes V, Smith S, Garcia-Sanchez A, Sales J, Stevenson K (2007). Proteomic comparison of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* grown *in vitro* and isolated from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Microbiol.*, **153**, 196-205.

Huntley JFJ, Whitlock RH, Bannantine JP, Stabel JR (2005). Comparison of diagnostic detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in North American bison. *Vet. Pathol.*, **42**, 42-51.

IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.

Irenge LM, Walravens K, Govaerts M, Godfroid J, Rosseels V, Huygen K, Gala JL (2009). 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.*, **136**, 166-172.

İkiz S, Bağcigil AF, Seyyal AK, Özgür NY, İlgez A (2005). Paratuberculosis in cattle in Turkey detected by PCR. *Med. Weter.*, **61**, 881-883.

Jakobsen MB, Albar L, Nielsen SS (2000). A cross sectional study of paratuberculosis in 1155 Danish dairy cows, *Prev. Vet. Med.*, **46**, 15-27.

Janagama HK, Jeong K, Kapur V, Coussens P, Sreevatsan S (2006). Cytokine responses of bovine macrophages to diverse clinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. *BMC Microbiol.*, **6**, 1-12.

Janagama HK, Lamont EA, George S, Bannantine JP, Xu WW, Tu ZJ, Wells SJ, Schefers J, Sreevatsan S (2010). Primary transcriptomes of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* reveal proprietary pathways in tissue and macrophages. *BMC Genomics*, **11**, 1-11.

Jubb TF, Sergeant ES, Callinan AP, Galvin J (2004). Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johne's disease in Victorian dairy cattle herds. *Aust. Vet. J.*, **82**, 569-573.

Jungersen G, Huda A, Hansen JJ, Lind P (2002). Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **9**, 453-460.

Jungersen G, Mikkelsen H, Grell SN (2012). Use of the johnin PPD interferon-gamma assay in control of bovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **148**, 48-54.

Juste RA, Marco JC, de Ocariz S, Aduriz JJ (1991). Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol.*, **28**, 385-390.

Kalis CHJ, Collins MT, Hesselink JW, Barkema HW (2003). Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: The Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Vet. Microbiol.*, **97**, 73-86.

Kanazawa K, Haga Y, Funakoshi O, Nakajima H, Munakata A, Yoshida Y (1999). Absence of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in intestinal tissues from Crohn's disease by nested polymerase chain reaction. *J. Gastroenterol.*, **34**, 200-206.

Kawaji S, Begg DJ, Plain KM, Whittington RJ (2011). A longitudinal study to evaluate the diagnostic potential of a direct faecal quantitative PCR test for Johne's disease in sheep. *Vet. Microbiol.*, **148**, 35-44.

Kawaji S, Taylor DL, Mori Y, Whittington RJ (2007). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. *Vet. Microbiol.*, **125**, 36-48.

Khalifeh MS, Stabel JR (2004a). Effects of gamma interferon, interleukin-10, and transforming growth factor beta on the survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in monocyte-derived macrophages from naturally infected cattle. *Infect. Immun.*, **72**, 1974-82.

Khalifeh MS, Stabel JR (2004b). Upregulation of transforming growth factor-beta and interleukin-10 in cows with clinical Johne's disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **99**, 39-46.

Kim YG, Bech-Nielsen S, Gordon JC, Slemons RD, Spangler E (1989). Comparison of two methods for isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. *Am. J. Vet. Res.*, **50**, 1110-1113.

Kim N, Kang HG, Jang YH, Ryoo S, Lee HM, Shin SJ, Jang B, Cho H, Jung SC, Park YH, Lim YH, Kim JM (2016). Comparison of two immunomagnetic separation methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.*, **14**, 96-104.

Kirkpatrick BW (2010). *Genetics of host susceptibility to paratuberculosis*. In: Behr MA, Collins DM. (Eds), *Paratuberculosis: organism, disease, control*. Oxfordshire Wallingford, UK: CAB International, p: 50-59.

Kormendy B (1994). The effect of vaccination on the prevalence of paratuberculosis in large dairy herds. *Vet. Microbiol.*, **41**, 117-125.

Kruze J, Salgado M, Paredes E, Mella A, Collins MT (2006). Goat paratuberculosis in Chile: First isolation and confirmation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in a dairy goat. *J. Vet. Diagnostic Invest.*, **18**, 476-479.

Krüger C, Köhler H, Liebler-Tenorio EM (2015). Cellular composition of granulomatous lesions in gut-associated lymphoid tissues of goats during the first year after experimental infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **163**, 33-45.

Kumar OR, Faris D, Senthil NR, Gunaseelan L (2012). Comparison of diagnostic tests for paratuberculosis. *Indian Vet. J.*, **89**, 15-17.

Kurade NP, Tripathi BN (2008). Lymphoproliferative response and its relationship with histological lesions in experimental ovine paratuberculosis and its diagnostic implications. *Vet. Res. Commun.*, **32**, 107-119.

Lamont EA, Bannantine JP, Armien A, Ariyakumar DS, Sreevatsan S (2012). Identification and characterization of a spore-like morphotype in chronically starved *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cultures. *PLoS One*, **7**, e30648.

Lauf U, Müller C, Herrmann H (1999). Identification and characterisation of IS1383, a new insertion sequence isolated from *Pseudomonas putida* strain H. *FEMS Microbiol. Lett.*, **170**, 407-412.

Leite FL, Stokes KD, Robbe-Austerman S, Stabel JR (2013). Comparison of fecal DNA extraction kits for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **25**, 27-34.

Li L, Bannantine JP, Zhang Q, Amonsin A, May BJ, Alt D, Banerji N, Kanjilal S, Kapur V (2005). The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 12344-12349.

Liapi M, Leontides L, Kostoulas P, Botsaris G, Iacovou Y, Rees C, Georgiou K, Smith GC, Naseby DC (2011). Bayesian estimation of the true prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in Cypriot dairy sheep and goat flocks. *Small Rumin. Res.*, **95**, 174-178.

Lombard JE, Gardner IA, Jafarzadeh SR, Fossler CP, Harris B, Capsel RT, Wagner BA, Johnson WO (2013). Herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in United States dairy herds in 2007. *Prev. Vet. Med.*, **108**, 234-238.

Lu Z, Mitchell RM, Smith RL, Van Kessel JS, Chapagain PP, Schukken YH, Grohn YT (2008). The importance of culling in Johne's disease control. *J. Theor. Biol.*, **254**, 135-146.

Lybeck KR, Løvoll M, Johansen TB, Olsen I, Storset AK, Valheim M (2013). Intestinal strictures, fibrous adhesions and high local interleukin-10 levels in goats infected naturally with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Comp. Pathol.*, **148**, 157-172.

Magombedze G, Eda S, Stabel J (2015). Predicting the role of IL-10 in the regulation of the adaptive immune responses in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections using mathematical models. *PLoS One*, **10**, e0141539.

Magombedze G, Shiri T, Eda S, Stabel JR (2017). Inferring biomarkers for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection and disease progression in cattle using experimental data. *Sci. Rep.*, **7**, 1-15.

Makav M, Gokce E (2013). Seroprevalence of subclinical paratuberculosis in cattle in Kars Region. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **19**, 913-916.

Mallikarjunappa S (2013). Cytokine gene expression in Holstein-Friesian and Jersey calves infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Thesis of Master Degree, The University of Guelph, Ontario, Canada.

Manning EJB, Collins MT (2010a). *Epidemiology of paratuberculosis*. In: Behr MA, Collins DM. (Eds), *Paratuberculosis: organism, disease, control*. Oxfordshire Wallingford, UK: CAB International, p: 22-28.

Manning EJB, Collins MT (2010b). *History of paratuberculosis*. In: Behr MA, Collins DM. (Eds), *Paratuberculosis: organism, disease, control*. Oxfordshire Wallingford, UK: CAB International, p: 1-9.

Maroudam V, Mohana SB, Praveen KP, Dhinakar RG (2015). Paratuberculosis: diagnostic methods and their constraints. *J. Veterinar. Sci. Technol.*, **6**, 259.

Marquetoux N, Mitchell R, Ridler A, Heuer C, Wilson P (2018). A synthesis of the patho-physiology of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in sheep to inform mathematical modelling of ovine paratuberculosis. *Vet. Res.*, **49**, 1-13.

Marsh I, Whittington R, Cousins D (1999). PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. *Mol. Cell. Probes*, **13**, 115-126.

Martinson SA, Hanna PE, Ikede BO, Lewis JP, Miller LM, Keefe GP, McKenna SLB (2008). Comparison of bacterial culture, histopathology, and immunohistochemistry for the diagnosis of Johne's disease in culled dairy cows. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **20**, 51-57.

McDonald WL, Ridge SE, Hope AF, Condrón RJ (1999). Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle. *Aust. Vet. J.*, **77**, 113-119.

McNees AL, Markesich D, Zayyani NR, Graham DY (2015). *Mycobacterium paratuberculosis* as a cause of crohn's disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **9**, 1-22.

Menzies P (2001). Johne's disease in sheep, Department of population medicine, Ontario veterinary college, Queen's printer for Ontario Canada, Livestock home, [http:// www.omafra.gov.on.ca](http://www.omafra.gov.on.ca). In: Sirak A (2010). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from apparently healthy sheep and goats. *Ethiop. Vet. J.*, **14**, 113-120.

Mikkelsen H (2011). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cattle development, optimization and evaluation of cell-mediated immune based assays. Thesis of PhD, Faculty of Life Sciences University of Copenhagen, Denmark.

Mikkelsen H, Jungersen G, Nielsen SS (2009). Association between milk antibody and interferon-gamma responses in cattle from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infected herds. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **127**, 235-241.

Millar D, Ford J, Sanderson J, Withey S, Tizard M, Doran T, Hermon-Taylor J (1996). IS900 to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of

whole pasteurized cow's milk in England and Wales. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3446-3452.

Mita A, Mori Y, Nakagawa T, Tasaki T, Utiyama K, Mori H (2016). Comparison of fecal pooling methods and DNA extraction kits for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Microbiologyopen*, **5**, 134-142.

Moss MT, Sanderson JD, Tizard ML, Hermon-Taylor J, El-Zaatari FA, Markesich DC, Graham DY (1992). Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* in long term cultures from Crohn's disease and control tissues. *Gut.*, **33**, 1209-1213.

Möbius P, Hölzer M, Felder M, Nordsiek G, Groth M, Köhler H, Reichwald K, Platzer M, Marz M (2015). Comprehensive insights in the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* genome using new WGS data of sheep strain JIII-386 from Germany. *Genome Biol. Evol.*, **7**, 2585-2601.

Muskens J, Mars MH, Elbers AR, van Maanen K, Bakker D (2003). The results of using faecal culture as confirmation test of paratuberculosis-seropositive dairy cattle. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, **50**, 231-234.

Muskens J, Barkema HW, Russchen EW, van Maanen C, Schukken YH, Bakker D (2000). Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in the Netherlands. *Vet. Microbiol.*, **77**, 253-261.

Nalubamba K, Smeed J, Gossner A, Watkins C, Dalziel R, Hopkins J (2008). Differential expression of pattern recognition receptors in the three pathological forms of sheep paratuberculosis. *Microbes Infect.*, **10**, 598-604.

Naser SA, Sagrarsingh SR, Naser AS, Thanigachalam S (2014). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* causes Crohn's disease in some inflammatory bowel disease patients. *World J. Gastroenterol.*, **20**, 7403-7415.

Nielsen SS (2010). *Immune-based diagnosis of paratuberculosis*. In: Behr MA, Collins DM. (Eds), *Paratuberculosis: organism, disease, control*. Oxfordshire Wallingford, UK: CAB International, p: 284-293.

Nielsen SS, Toft N (2006). Age-specific characteristics of ELISA and fecal culture for purpose-specific testing for paratuberculosis. *J. Dairy Sci.*, **89**, 569-579.

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

Nielsen SS, Toft N (2009). A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev. Vet. Med.*, **88**, 1-14.

Nielsen SS, Kolmos B, Christoffersen AB (2004). Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on two different media. *J. Appl. Microbiol.*, **96**, 149-153.

Nielsen SS, Thamsborg SM, House H, Bitsch V (2000). Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, **44**, 1-7.

Ocepek M, Krt B, Pate M, Pogacnik M (2002). Seroprevalence of paratuberculosis in Slovenia between 1999 and 2001. *Slov. Vet. Res.*, **39**, 179-185.

OIE (World Organization for Animal Health) (2008). *Paratuberculosis (Johne's disease)*, Part II, Chapter 2.1.11. In: OIE manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, OIE, Paris, France, p: 276-291.

OIE (World Organization for Animal Health) (2018). *Paratuberculosis (Johne's disease)*, Chapter 3.1.15. In: OIE Terrestrial Manual, OIE, Paris, France, p: 544-559.

Ott SL, Wells SJ, Wagner BA (1999). Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev. Vet. Med.*, **40**, 179-192.

Ozturk D, Pehlivanoglu F, Tok A, Gunlu S, Guldali Y, Turutoglu H (2010). Seroprevalence of paratuberculosis in the Burdur province (Turkey), in dairy cattle using the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Isr. J. Vet. Med.*, **65**, 53-57.

Özpinar H, Tekiner GH, Karaman O, Kurt Y (2015). 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.*, **21**, 247-252.

Paolicchi F, Cirone K, Morsella C, Gioffré A (2012). First isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from commercial pasteurized milk in Argentina. *Braz. J. Microbiol.*, **43**, 1034-1037.

Paustian ML, Bannantine JP, Kapur V (2010). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* genome. In: Behr MA, Collins DM. (Eds), *Paratuberculosis: organism, disease, control*. Oxfordshire Wallingford, UK: CAB International, p: 73-81.

Payeur Jb (2005). *Current culture methods for Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. 8th International Colloquium on Paratuberculosis, 14-17 August, Copenhagen/ Denmark, p: 352-358.

Pieters J (2001). Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microb. Infect.*, **3**, 249-255.

Pithua P, Kollias NS (2012). Estimated prevalence of caprine paratuberculosis in Boer Goat herds in Missouri, USA. *Vet. Med. Int.*, Article ID 674085, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/674085>.

Plain KM, Marsh IB, Waldron AM, Galea F, Whittington A-M, Saunders VF, Begg DJ, de Silva K, Purdie AC, Whittington RJ (2014). High-throughput direct fecal PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep and cattle. *J Clin Microbiol.*, **52**, 745-57.

Plattner BL, Doyle RT, Hostetter JM (2009). Gamma-delta T cell subsets are differentially associated with granuloma development and organization in a bovine model of mycobacterial disease. *Int. J. Exp. Pathol.*, **90**, 587-597.

Rankin JD (1962). The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*. IV. Adult cattle maintained in an infectious environment. *J. Comp. Pathol.*, **72**, 113-117.

Reddacliff LA, Whittington RJ (2003). Experimental infection of weaner sheep with S strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.*, **96**, 247-258.

Reddacliff LA, Vadali A, Whittington RJ (2003). The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces. *Vet. Microbiol.*, **95**, 271-282.

Reddacliff L, Eppleston J, Windsor P, Whittington R, Jones S (2006). Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. *Vet. Microbiol.*, **115**, 77-90.

Ribón W (2012). Biochemical *Isolation and Identification of Mycobacteria*, *Biochemical Testing*. Dr. Jose C. Jimenez-Lopez (Ed.), ISBN: 978-953-51-0249-6, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/biochemical-testing/biochemical-isolation-and-identification-of-mycobacteria>. (Erişim Tarihi: 11.07.2018).

Richards WD (1989). Environmental acidity may be the missing piece in the Johne's disease puzzle. In: Milner AR, Wood PR. (Eds), *Johne's disease current trends in research diagnosis and management*. East Melbourne Australia: CSIRO Publications, p: 99-103.

Ris DR, Hamel KL, Ayling JM (1988). The detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces by isolation and the comparison of isolation with the examination of stained smears by light microscopy. *N. Z. Vet. J.*, **36**, 112-114.

Rita AA, Victor NN, Silvia P, Luciana P, Anastasia D, Vincenzo C (2011). Ovine paratuberculosis: A seroprevalence study in dairy flocks reared in the

Robbe-Austerman S, Stabel JR, Palmer MV (2006a). Evaluation of the gamma interferon ELISA in sheep subclinically infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using a whole-cell sonicate or a johnin purified-protein derivative. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **18**, 189-194.

Robbe-Austerman S, Gardner IA, Thomsen BV, Morrical DG, Martin BM, Palmer MV, Thoen CO, Ewing C (2006b). Sensitivity and specificity of the agar-gel-immunodiffusion test, ELISA and the skin test for detection of paratuberculosis in United States Midwest sheep populations. *Vet. Res.*, **37**, 553-564.

Robinson M, O'Brien R, Mackintosh C, Griffin F (2008). Differential immune responses of red deer (*Cervus elaphus*) following experimental challenge with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin. Vaccine Immunol.*, **15**, 963-969.

Rogall T, Wolters J, Flohr T, Bottger EC (1990). Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, 323-330.

Rowe MT, Grant IR (2006). *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics. *Lett. Appl. Microbiol.*, **42**, 305-311.

Russel A (1984). Body condition scoring of sheep. *In Pract.*, **6**, 91-93.

Salgado M, Kruze J, Collins MT (2007). Diagnosis of paratuberculosis by fecal culture and ELISA on milk and serum samples in two types of Chilean dairy goat herds. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **19**, 99-102.

Salgado M, Collins MT, Salazar F, Kruze J, Bolske G, Soderlund R, Juste R, Sevilla IA, Biet F, Troncoso F, Alfaro M (2011). Fate of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* after application of contaminated dairy cattle manure to agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 2122-2129.

Saviola B, Bishai W (2006). *The genus Mycobacterium*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E. (Eds), *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria*. 3rd Edition, New York, USA: Springer Science+Business Media, pp: 919-944. Doi: 10.1007/0-387-30743-5.

Sayin Z (2010). Sığır tüberkülozunun farklı metotlar ile karşılaştırmalı teşhisi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, Türkiye.

Schönenbrücher H, Abdulmawjood A, Failing K, Bulte M (2008). New triplex real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 2751-2758.

Sechi P, Paolotto P, McCrindle CME, Cenci-Goga BT (2013). Seroepidemiological study of Johne's-disease in dairy cattle in Umbria, Italy. *Ital. J. Anim. Sci.*, **12**, 196-199.

Secott TE, Ohme AM, Barton KS, Wu CC, Rommel FA (1999). *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bovine feces is improved by coupling agar culture enrichment to an IS900-specific polymerase chain reaction assay. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 441-447.

Semret M, Turenne CY, De Haas P, Collins DM, Behr MA (2006). Differentiating host-associated variants of *Mycobacterium avium* by PCR for detection of large sequence polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 881-887.

Sergeant ESG, Marshall DJ, Eamens GJ, Kearns C, Whittington RJ (2003). Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med.*, **61**, 235-248.

Sevilla I, Aduriz G, Garrido JM, Geijo MV, Juste RA (2002). A preliminary survey on the prevalence of paratuberculosis in dairy cattle in Spain by bulk milk PCR. In: Juste RA, Geijo MV, Garrido JM. (Eds), Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Bilbao, Spain, p: 332-336.

Sevilla IA, Garrido JM, Molina E, Geijo M V., Elguezabal N, Vázquez P, Juste RA (2014). Development and evaluation of a novel multicopy-element-targeting triplex PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 3757-3768.

Sevilla I, Singh S V, Garrido JM, Aduriz G, Rodriguez S, Geijo M V, Whittington RJ, Saunders V, Whitlock RH, Juste RA (2005). Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis strains from different hosts and regions. *Rev. Sci. Tech.*, **24**, 1061-1066.

Singh PK, Singh SV, Kumar H, Sohal JS, Singh AV (2010). Diagnostic application of IS900 PCR using blood as a source sample for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in early and subclinical cases of caprine paratuberculosis. *Vet. Med. Int.*, Article ID: 748621. Doi:10.4061/2010/748621.

Singh SV, Singh AV, Kumar A, Singh PK, Deb R (2013a). Survival mechanisms of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* within host species and in the environment - A review. *Nat. Sci.*, **5**, 710-723.

Singh SV, Singh PK, Gupta S, Chaubey KK, Singh B, Kumar A, Singh AV, Kumar N (2013b). Comparison of microscopy and blood-PCR for the diagnosis of clinical Johne's disease in domestic ruminants. *Iran J. Vet. Res.*, **14**, 345-349.

Singh PK, Singh SV, Singh MK, Saxena VK, Horin P, Singh AV, Sohal JS (2012). Effect of genetic variation in the MHC Class II DRB region on resistance

and susceptibility to Johne's disease in endangered Indian Jamunapari goats. *Int. J. Immunogenet.*, **39**, 314-320.

Sirak A (2010). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from apparently healthy sheep and goats. *Ethiop. Vet. J.*, **14**, 113-120.

Smeed JA, Watkins CA, Gossner AG, Hopkins J (2010). Expression profiling reveals differences in immuno-inflammatory gene expression between the two disease forms of sheep paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **135**, 218-225.

Smeed JA, Watkins CA, Rhind SM, Hopkins J (2007). Differential cytokine gene expression profiles in the three pathological forms of sheep paratuberculosis. *BMC Vet. Res.*, **3**, 18.

Sobha Rani M, Prabhakar TG, Samuel Masilmoni Ronald B (2017). Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, **10**, 393-398.

Sohal JS, Singh SV, Singh PK, Singh AV (2010). On the evolution of "Indian Bison type" strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Microbiol. Res.*, **165**, 163-171.

Sohal JS, Singh SV, Subodh S, Sheoran N, Narayanasamy K, Singh PK, Singh AV, Maitra A (2009). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* diagnosis and geno-typing: Genomic insights. *Microbiol. Res.*, **164**, 330-337.

Sohal JS, Singh SV, Subhodh S, Singh AV, Singh PK, Sheoran N, Sandhu K, Narayansamy K, Maitra A (2007). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* diagnosis and strain typing-present status and future developments. *Indian J. Exp. Biol.*, **45**, 843-852.

Sohal JS, Singh SV, Singh B, Thakur S, Aseri GK, Jain N, Jayaraman S, Yadav P, Khare N, Gupta S, Chaubey KK, Dhama K (2015). Control of paratuberculosis: opinions and practices. *Adv. Anim. Vet. Sci.*, **3**, 156-163.

Sohal JS, Singh SV, Tyagi P, Subhodh S, Singh PK, Singh AV, Narayanasamyc K, Sheoran N, Singh Sandhu K (2008). Immunology of mycobacterial infections: with special reference to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Immunobiol.*, **213**, 585-598.

Sonawane GG, Tripathi BN (2016). Expression of inflammatory cytokine and inducible nitric oxide synthase genes in the small intestine and mesenteric lymph node tissues of pauci- and multibacillary sheep naturally infected with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Int. J. Mycobacteriology*, **5**, S77-S78.

Sonawane GG, Tripathi BN (2018). Comparative diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the tissues of clinical and subclinical sheep of paratuberculosis endemic farm. *Comp. Clin. Path.*, <https://doi.org/10.1007/s00580-018-2837-8>. (Erişim Tarihi: 13.11.2018).

Sorge SS, Kurnick S, Streevatsan S (2013). Detection of *Myocbacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the saliva of dairy cows: a pilot study. *Vet Microbiol.*, **164**, 383-386.

Stabel JR (1997). An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**, 375-380.

Stabel JR (2010). *Immunology of paratuberculosis infection and disease*. In: Behr MA, Collins DM. (Eds), *Paratuberculosis: organism, disease, control*. Oxfordshire Wallingford, UK: CAB International, p: 230-243.

Stabel JR, Robbe-Austerman S (2011). Early immune markers associated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in a neonatal calf model. *Clin. Vaccine Immunol.*, **18**, 393-405.

Stabel JR, Kimura K, Robbe-Austerman S (2007). Augmentation of secreted and intracellular gamma interferon following johnin purified protein derivative sensitization of cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **19**, 43-51.

Stevenson K (2010). Diagnosis of Johne's disease: Current limitations and prospects. *Cattle Pract.*, **18**, 104-109.

Stevenson K (2015). Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and the influence of strain type on infection and pathogenesis: A review. *Vet. Res.*, **46**, 64.

Stewart DJ, Vaughan JA, Stiles PL, Noske PJ, Tizard MLV, Prowse SJ, Michalski WP, Butler KL, Jones SL (2004). A long-term study in Merino sheep experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Clinical disease, faecal culture and immunological studies. *Vet. Microbiol.*, **104**, 165-178.

Subharat S, Shu D, Neil Wedlock D, Price-Carter M, de Lisle GW, Luo D, Collins DM, Buddle BM (2012). Immune responses associated with progression and control of infection in calves experimentally challenged with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **149**, 225-236.

Sweeney RW, Whitlock RH, Rosenberger AE (1992). *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 166-171.

Thoen CO, Moore LA (1989). Control of Johne's disease in four commercial dairy herds in Iowa. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **1**, 223-226.

Thoresen OF, Falk K, Evensen Ø (1994). Comparison of immunohistochemistry, acid-fast staining and cultivation for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *J. Vet. Diagnostic Invest.*, **199**, 195-199.

Thrusfield M (2005). *Veterinary Epidemiology*. 3rd Edition, Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Tiwari A, VanLeeuwen JA, Dohoo IR, Keefe GP, Haddad JP, Scott HM, Whiting T (2009). Risk factors associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* seropositivity in Canadian dairy cows and herds. *Prev. Vet. Med.*, **88**, 32-41.

Tizard IR (2009). *Veterinary Immunology*. 8th Edition, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, p: 11-16.

Turenne CY, Alexander DC (2010). *Mycobacterium avium complex*. In: Behr MA, Collins DM. (Eds), *Paratuberculosis: organism, disease, control*. Oxfordshire Wallingford, UK: CAB International, p:60-72.

Tütüncü M, Kiliçoğlu Y, Güzel M, Pekmezci D, Gülhan T (2018). Seropositivity of *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle with chronic diarrhea in the middle Black Sea region. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil Derg.*, **13**, 1-5.

Vary PH, Andersen PR, Green E, Hermon-Taylor J, McFadden JJ (1990). Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 933-937.

Vazquez P, Garrido JM, Juste RA (2013). Specific antibody and interferon-gamma responses associated with immunopathological forms of bovine paratuberculosis in slaughtered friesland cattle. *PLoS One*, **8**, e64568.

Verdugo C (2013). Epidemiology of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection on sheep, beef cattle and deer farms in New Zealand. Thesis of PhD, Institute of Veterinary, Animal and Biomedical Sciences Massey University, Palmerston North, New Zealand.

Verna AE, Garcia-Pariente C, Muñoz M, Moreno O, García-Marin JF, Romano MI, Paolicchi F, Pérez V (2007). Variation in the immuno-pathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Zoonoses Public Health*, **54**, 243-252.

Vural B, Atala N (1988). Serological study on bovine paratuberculosis in central Anatolia using the microcomplement fixation and tube complement fixation tests. *Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg.*, **6**, 87-97.

Wadhwa A, Kumar N, Velasco-Villa A, Eda S (2013). Overview of Johne's disease immunology. *Vet. World*, **6**, 901-904.

Waters WR, Miller JM, Palmer MV, Stabel JR, Jones DE, Koistinen KA, Steadham EM, Hamilton J, Davis WC, Bannantine JP (2003). Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves. *Infect. Immun.*, **71**, 5130-5138.

Waters WR, Stabel JR, Sacco RE, Harp JA, Pesch BA, Wannemuehler MJ (1999). Antigen-specific B-cell unresponsiveness induced by chronic *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of cattle *Infect. Immun.*, **67**, 1593-1598.

Weber MF, Verhoeff J, van Schaik G, van Maanen C (2009). Evaluation of Ziehl-Neelsen stained faecal smear and ELISA as tools for surveillance of clinical paratuberculosis in cattle in the Netherlands. *Prev. Vet. Med.*, **92**, 256-266.

Weiss DJ, Souza CD (2008). Modulation of mononuclear phagocyte function by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.*, **45**, 829-841.

Weiss DJ, Evanson OA, Deng M, Abrahamsen MS (2004). Gene expression and antimicrobial activity of bovine macrophages in response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.*, **41**, 326-337.

Weiss DJ, Evanson OA, de Souza C, Abrahamsen MS (2005). A critical role of interleukin-10 in the response of bovine macrophages to infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.*, **66**, 721-726.

Wells SJ, Wagner BA (2000). Herd-level risk factors for infection with *Mycobacterium paratuberculosis* in US dairies and association between familiarity of the herd manager with the disease or prior diagnosis of the disease in that herd and use of preventive measures. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **216**, 1450-1457.

Whipple DL, Callihan DR, Jarnagin JL (1991). Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **3**, 368-373.

White A, Holst P (2006). Fat scoring sheep and lambs. Primefact 302, NSW Department of Primary Industries, Orange, NSW.

White CI, Birtles RJ, Wigley P, Jones PH (2010). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (*Map*) in free-living amoebae isolated from fields not used for grazing. *Vet Rec.*, **166**, 40-41.

Whitlock RH, Buergelt C (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, **12** 345-356.

Whitlock RH, Sweeney RW, Fyock TL, Smith J (2005). *MAP* super-shedders: Another factor in the control of Johne's disease. 8th International Colloquium on Paratuberculosis, 14-17 August, Copenhagen/ Denmark, p: 164.

Whitlock RH, Wells SJ, Sweeney RW, van Tiem J (2000). ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): Sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.*, **77**, 387-398.

Whittington R (2010). *Cultivation of Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: Behr MA, Collins DM. (Eds), Paratuberculosis: organism, disease, control. Oxfordshire Wallingford, UK: CAB International, p: 244-266.

Whittington RJ (2009). Factors affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system. *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 614-622.

Whittington RJ, Windsor PA (2009). In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. *Vet. J.*, **179**, 60-69.

Whittington RJ, Marsh IB, Whitlock RH (2001). Typing of IS1311 polymorphisms confirms that bison (*Bison bison*) with paratuberculosis in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domesticated livestock. *Mol. Cell. Probes.*, **15**, 139-145.

Whittington RJ, Begg DJ, de Silva K, Purdie AC, Dhand NK, Plain KM (2017). Case definition terminology for paratuberculosis (Johne's disease). *BMC Vet. Res.*, **13**, 328.

Whittington RJ, Marsh I, Allister SMC, Turner MJ, Marshall DJ (1999a). Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 1077-1083.

Whittington, RJ, Marsh IB, Saunders V, Grant IR, Juste R, Sevilla IA, Manning EJ, Whitlock RH (2011). Culture phenotypes of genomically and geographically diverse *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from different hosts. *J. Clin. Microbiol.*, **49**, 1822-1830.

Whittington RJ, Marshall DJ, Nicholls PJ, Marsh AB, Reddacliff LA (2004). Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 2989-3004.

Whittington RJ, Reddacliff L, Marsh I, Saunders V (1999b). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded intestinal tissue by IS900 polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.*, **77**, 392-397.

Whittington RJ, Reddacliff LA, Marsh I, McAllister S, Saunders V (2000). Temporal patterns and quantification of excretion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep with Johne's disease. *Aust. Vet. J.*, **78**, 34-37.

Windsor PA (2015). Paratuberculosis in sheep and goats. *Vet. Microbiol.*, **181**, 161-169.

Windsor PA, Whittington RJ (2010). Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet. J.*, **184**, 37-44.

Woo SR, Czuprynski CJ (2008). Tactics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for intracellular survival in mononuclear phagocytes. *J. Vet. Sci.*, **9**, 1-8.

Wynne JW, Bull TJ, Seemann T, Bulach DM, Wagner J, Kirkwood CD, Michalski WP (2011). Exploring the zoonotic potential of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* through comparative genomics. *PLoS One*, **6**, e22171.

Yardımcı H (2006). *Mycobacterium infeksiyonları*. In: Aydın N, Paracıkoğlu J. (Eds), Veteriner Mikrobiyoloji, Ankara: İlke-Emek Yayınları, s: 87-107.

Yeğen A (2004). Aktif akciğer tüberkülozu ve sekel akciğer tüberkülozu ayırımında neopterinin yeri. Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.

Yildirim D, Civelek T (2013). Prevalence of subclinical paratuberculosis in dairy cattle in Usak region. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **19**, 121-126.

Youssef DGS, Sallam FA, Darwish SF, Amin AS (2014). Evaluation of conventional and real-time PCR assays for molecular diagnosis of Johne's disease in dairy cattle *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, **3** 969-981.

Yue R, Liu C, Barrow P, Liu F, Cui Y, Yang L, Zhao D, Zhou X (2016). The isolation and molecular characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Shandong province, China. *Gut Pathog.*, **8**, 9. Doi:10.1186/s13099-016-0092-6.

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

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ezgi ŞABABOĞLU
Doğum Yeri ve Yılı : Kırşehir, 1989
Medeni Hali : Bekâr
Yabancı Dili : İngilizce
Uyruğu : T.C.
Telefon No : 0506 323 98 25
Elektronik Posta : ezgisababoglu@mehmetakif.edu.tr
İletişim Adresi : Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstiklal Kampüsü,
Burdur.



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lise: Bağlar Lisesi, İstanbul, 2006

Lisans: Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2012

Doktora: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2015-Devam Ediyor

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl (Mesleki Deneyim):

1. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Van, 2012- 2014
2. Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Burdur, 2014-Devam Ediyor

Yayınları (SCI ve diğer makaleler):

A) Ulusal Hakemli Dergilerdeki Makaleler

1. Öztürk D, Pehlivanoğlu F, Türütoğlu H, Şirin YS, Şababoğlu E (2016). Otitis eksternalı köpeklerden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *Eurasian J Vet Sci.*, **32 (2)**, 84-88.
2. Şababoğlu E, Türütoğlu H (2016). Hayvanlarda defansinler ve özellikleri. *MAE Vet Fak Derg.*, **1 (1)**, 29-39.
3. Şababoğlu E, Şahan Yapıcıer Ö, Çınar H, Türütoğlu H (2016). Bir kedide *Actinomyces naeslundii* olgusu. *MAE Vet Fak Derg.*, **1 (2)**, 21-25.
4. Şababoğlu E, Türütoğlu H (2017). Ruminantlarda *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* enfeksiyonunun immunolojik özellikleri. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg.*, **28 (2)**, 109-114.
5. Şababoğlu E, Türütoğlu H (2017). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*'in makrofajlar içinde hayatta kalma stratejileri. *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.*, **5 (2)**, 144-154.

6. Şahan Yapıcıer Ö, **Şababoğlu E**, Öztürk D, Pehlivanoglu F, Kaya M, Türütoğlu H (2017). Kedi ve köpeklerden dermatofitlerin izolasyonu. *MAE Vet Fak Derg.*, **2**, 125-130.

7. **Şababoğlu E**, Şahan Yapıcıer Ö, Öztürk D, Pehlivanoglu F, Kaya M, Türütoğlu H (2018). Buzağı artritlerinden izole edilen bakteriyel etkenler: retrospektif bir çalışma. *MAE Vet Fak Derg.*, **3** (1), 36-42.

8. Şahan Yapıcıer Ö, **Şababoğlu E**, Öztürk D, Pehlivanoglu F, Kaya M, Türütoğlu H (2018). Otitis eksternalı köpeklerden izole edilen fungal etkenler. *MAE Vet Fak Derg.*, **3** (2), 121-124.

B) Uluslararası Kongre Bildirileri

1. Kocamüftüoğlu M, Bozkurt G, Serpin N, **Şababoğlu E** (2015). Canine streptococcal mastitis with skin lesion-case report. Proceedings of the 6th International Scientific Meeting Days of Veterinary Medicine, 61, 24-26 September, Struga, Macedonia.

2. Ozturk D, Pehlivanoglu F, **Sababoglu E**, Turutoglu H, Avki S, Sirin YS (2015). Mycoplasmal arthritis of calves in Burdur Province. Progress in Human and Animal Mycoplasmaology, 41, 3-5 June, Pendik, İstanbul.

3. **Sababoglu E**, Ozturk D, Turutoglu H (2016). Identification of *Streptococcus canis* isolates from dogs. 3rd International Vetistanbul Group Congress, 287, 17-20 May, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.

4. Ozturk D, Turutoglu H, **Sababoglu E**, Kaya M, Pehlivanoglu F (2016). The seroprevalence of paratuberculosis in a saanen goat farm in the Isparta province (Turkey). 3rd International Vetistanbul Group Congress, 294, 17-20 May, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.

5. Şahan Yapıcıer Ö, **Şababoğlu E**, Öztürk D, Pehlivanoglu F, Kaya M, Türütoğlu H (2017). Kedi ve köpeklerden izole edilen dermatofitlerin retrospektif değerlendirilmesi. 1.Uluslararası Türkiye Veteriner İç Hastalıkları Kongresi, 266-267, 10-13 Ekim, Antalya.

6. Avki S, Şahan Yapıcıer Ö, Yiğitarıslan K, **Şababoğlu E**, Çınar H, Türütoğlu H (2018). Buzağı kayıplarında gizli fail: Mikoplazmal septik artrit. II. International Veterinary Surgery Congress of Turkey, 68-69, 20-23 Eylül, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti.

7. **Sababoglu E**, Turutoglu H (2018). The relationship between antibody ELISA results and age and body condition in sheep paratuberculosis. 2nd International Congress of Veterinary Microbiology, 250, 16-19 October, Lara, Antalya.

8. **Sababoglu E**, Turutoglu H (2018). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by polymerase chain reaction in sheep fecal samples. 2nd International Congress of Veterinary Microbiology, 56, 16-19 October, Lara, Antalya.

9. Şahan Yapıcıer Ö, **Şababoğlu E**, Öztürk D, Türütoğlu H, Pehlivanoğlu F, Kaya M (2018). Antimicrobial resistance of hemolytic streptococci isolated from bovine mastitis. 2nd International Congress of Veterinary Microbiology, 256, 16-19 October, Lara, Antalya.

C) Ulusal Kongre Bildirileri

1. Öztürk D, Pehlivanoğlu F, Türütoğlu H, Şirin YS, **Şababoğlu E** (2014). Otitis eksternalı köpeklerden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotiklere duyarlılıkları. XI. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, 264-265, 24-26 Ekim, Kemer, Antalya.

2. **Şabaoğlu E**, Öztürk D, Şahan Yapıcıer Ö, Türütoğlu H (2016). Köpek ve kedilerin çeşitli klinik örneklerinden izole edilen *Streptococcus canis*'in identifikasyonu. XII. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, 153-154, 30 Ağustos-2 Eylül, Nevşehir.

3. Pehlivanoğlu F, **Şababoğlu E**, Öztürk D, Türütoğlu H (2016). Bir köpeğin idrar yolu enfeksiyonundan izole edilen *Klebsiella pneumoniae*'nin genişlemiş spektrumlu beta laktamaz genlerinin karakterizasyonu. XII. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, 19-20, 30 Ağustos-2 Eylül, Nevşehir.

Üyesi Olduğu Meslek Kuruluşlar

1. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Derneği

