



**SIĞIRLARDA PARATÜBERKÜLOZ HASTALIĞININ
SEROLOJİK TEŞHİSİNDE LABORATUVAR YAPIMI
ELISA KİTİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Tuba ASLAN

**Yüksek Lisans Tezi
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Hakan KALENDER**

HAZİRAN-2019

**T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIĞIRLARDA PARATÜBERKÜLOZ HASTALIĞININ SEROLOJİK
TEŞHİSİNDE LABORATUVAR YAPIMI ELISA KİTİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuba ASLAN

161132106

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 27 Mayıs 2019
Tezin Savunulduğu Tarih: 18 Haziran 2019**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hakan KALENDER
Diğer Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Neval Berrin ARSERİM
Dr. Öğr. Üyesi Erdal ÖBEK**

HAZİRAN-2019

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, her konuda yardımcı olan ve yönlendiren, yanında çalışmaktan onur duyduğum, saygıdeğer danışmanım Sayın Prof. Dr. Hakan KALENDER' e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her evresinde yanımda olan, tüm kalbiyle bana inanan, her koşulda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen babam Murat ASLAN'a ve annem Saadet ASLAN'a ve çalışmam boyunca en zor anlarda bile daima yanımda olan değerli arkadaşlarım Gözde BAYDOĞAN'a ve Ebru CÖMERT'e desteklerinden ve varlıklarından dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Bu tezi MF.18.12 proje numarası ile destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP)'ne çok teşekkür ederim.

Çalışmam süresince bana yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Veteriner Hekim Dr. Nurgül BİRBEN'e ve Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tuba ASLAN
ELAZIĞ-2019

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	VI
SUMMARY.....	VII
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VIII
TABLolar LİSTESİ.....	IX
SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ.....	X
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Paratüberküloz Hastalığı.....	3
1.1.1. Tarihçe ve Etiyoloji.....	3
1.1.2. Epidemiyoloji.....	3
1.1.3. Patogenezi.....	5
1.1.4. Klinik Belirtiler.....	5
1.1.5. Nekropsi Bulguları.....	7
1.1.6. Teşhis.....	7
1.1.6.1. Bakteriyoskopi.....	7
1.1.6.2. Kültür.....	8
1.1.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	9
1.1.6.4. Serolojik Testler.....	10

1.1.6.5. Hücresel Temelli Immünite Testleri.....	13
1.1.7. Koruma ve Kontrol.....	14
1.1.8. Paratüberküloz'un Dünyadaki Durumu.....	14
1.1.9. Paratüberküloz'un Türkiye'deki Durumu.....	15
1.1.10. Araştırmanın Amacı.....	16
2. MATERİYAL ve METOT	17
2.1. Materyal.....	17
2.1.1. <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> suşu	17
2.1.2. Besiyeri.....	17
2.1.3. Hayvan Kan Serum Örnekleri	17
2.1.4. Kontrol Serumlar.....	20
2.1.5. Kullanılan kimyasallar ve solüsyonlar	20
2.1.5.1. Phosphate Buffered Saline (PBS)	20
2.1.5.2. %3 lük Bovine Serum Albümin (BSA)	20
2.1.5.3. Karbonat-Bikarbonat Çözeltisi	21
2.1.5.4. Phosphate Buffered Saline Tween (PBST)	21
2.1.5.5. %3'lük Yağsız Süt Tozu	22
2.1.5.6. Konjugat	22
2.1.5.7. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Substratı	22
2.1.5.8. Sülfirik Asit (H ₂ SO ₄)	22
2.2. Metot.....	22
2.2.1. Antijenin Hazırlanması	22
2.2.2. Antijen ve Serum Sulandırılmalarının Optimize Edilmesi	24

2.2.3. Pozitif ve Negatif Kontrol Serumlarının Nokta Titrasyon Değerlerinin Belirlenmesi.....	25
2.2.4. Konjugatın titrasyonu	27
2.2.5. Hayvan Kan Serumı Örneklerinin ELISA ile İncelenmesi	28
2.2.6. Laboratuvar Yapımı ELISA ve Ticari ELISA Kitinin Karşılaştırılması.....	29
2.2.7. İstatistiksel Analiz	29
3. BULGULAR.....	30
3.1. Kültür ve Bakteriyoskopi Sonuçları	30
3.2. ELISA Sonuçları.....	31
3.3. Laboratuvar Yapımı ve Ticari ELISA (IDEXX) ELISA ile İşlenen Serum Örneklerinin Sonuçları.....	38
4. TARTIŞMA	39
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	43
6.KAYNAKLAR.....	44
ÖZGEÇMİŞ.....	58

ÖZET

Paratüberküloz, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*'in sebep olduğu, kronik gastroenteritis, ishal, zayıflama ve süt veriminde azalma ile seyreden ve bazen ölümlle sonuçlanabilen bakteriyel bir enfeksiyondur. Hastalık sığırlarda uzun süre klinik belirti göstermeden subklinik olarak seyredebilir. Subklinik enfekte hayvanlar dışkı, süt ve kolostrumlarıyla etkeni saçarak hastalığın sağlam hayvanlara bulaşmasına neden olurlar. Paratüberküloz tüm dünyada görülen ve süt sığırı işletmelerinde önemli ekonomik kayıplara yol açan zoonotik karakterde bir hastalıktır.

Bu araştırmanın amacı, laboratuvar yapımı Enzyme-Linked Immonosorbent Assay (ELISA) kiti ile Elazığ ilinde 2 yaşın üzerindeki sütçü sığırlarda paratüberkülozun yaygınlığını araştırmaktır. Bu amaçla görünürde sağlıklı 150 sütçü sığırdan kan serumu örnekleri toplandı. Mycobactin J ve ANV (amphotericin, nalidixic acid ve vancomycin) içeren Herrold's Egg Yolk Agar besiyerinde üretilen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* suşundan (DSMZ 44133) antijen hazırlandı. Optimizasyon çalışmaları sonunda; antijenin 0.125 µg/kuyucuk şeklinde hazırlanan dilüsyonunun, serumun 1/60 ve konjugatın 1/20000 dilüsyonunun ELISA testinde kullanılabileceği belirlendi. ELISA testinde her serum çift olarak test edildi. Serum örneklerinin optik dansitelerinin aritmatik ortalamaları alınarak herbir serumun S/P oranı hesaplandı. İncelenen toplam 150 serumun 15'i (%10) pozitif, 4'ü (%2.66) düşük pozitif, 3'ü (%2) şüpheli ve 128'i (% 85. 33) negatif olarak saptandı. Bir ticari ELISA kiti ile karşılaştırma sonucunda, hazırlanan kitin sensitivitesi % 95 ve spesifitesi % 96 olarak hesaplandı. Hayvanların yaşına göre pozitiflik oranları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) bulunmasına karşın, hayvan ırkına göre pozitiflik oranları arasındaki farklılık önemli bulunmadı ($p>0.05$).

Bu çalışmanın sonuçları, Elazığ ilinde paratüberkülozun önemli bir sorun olduğunu ve koruma ve kontrol programlarının titizlikle uygulanması gerektiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Paratüberküloz, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Sığır, ELISA, Teşhis

SUMMARY

Evaluation of a homemade ELISA kit for serological diagnosis of cattle paratuberculosis

Paratuberculosis is a bacterial infection caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. It is characterized by chronic gastroenteritis, diarrhea, weight loss, reduced milk production and occasionally death. A long subclinical stage can be occurred in infected cattle. Subclinically infected animals transmit the infection to healthy animals by shedding the agent in their faeces, milk and colostrum. Paratuberculosis is a zoonotic disease which is seen all over the world and causes significant economic losses in dairy cattle farms.

The aim of this study is to investigate the prevalence of paratuberculosis in dairy cattle over 2 years of age in the Elazığ province by using a homemade Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit. For this purpose, blood serum samples were collected from 150 dairy cattle without showing any clinical signs. Antigen was prepared from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strain (DSMZ 44133) grown on Herrold's Egg Yolk Agar medium with Mycobactin J and ANV (amphotericin, nalidixic acid and vancomycin). After optimization, the dilution of 0.125 µg/well of the antigen, 1/60 of the serum and 1/20000 of the conjugate were determined to be used in the ELISA. Each of serum samples was tested in duplicate. The arithmetic average optical density (OD) value of each serum sample was transformed to sample-to-positive (S/P) ratio. Of the total 150 serum samples, 15 (10%) were positive, 4 (2.66%) were low positive, 3 (2%) were suspicious and 128 (85.33%) were negative. In comparison with a commercial ELISA kit, the sensitivity and specificity of optimized ELISA kit were 95% and 96%, respectively. Although the difference between the positivity rates according to the age of the animals was statistically significant ($p < 0.05$), the difference between the positivity rates according to animal breed was not significant ($p > 0.05$).

The results of this study indicate that paratuberculosis is an important problem in Elazığ province and that protection and control programs should be applied carefully.

Keywords: Paratuberculosis, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Cattle, ELISA, Diagnosis

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Farklı çeşitlerde ELISA sistemleri	12
Şekil 2.1. Kullanılan liyofilize <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> suşu	17
Şekil 2.2. Kullanılan kontrol serumlar.....	20
Şekil 2.3. PBS tablet	20
Şekil 2.4. BSA.....	21
Şekil 2.5. Karbonat-bikarbonat.....	21
Şekil 2.6. Hazırlanmış PBST çözeltisi.....	21
Şekil 2.7. TMB Substratı.....	22
Şekil 2.8. Bakterinin Herrold's Egg Yolk Agar besiyerine ekimi.....	23
Şekil 2.9. Antijen elde etme işlemi.....	23
Şekil 2.10. Protein miktarının Nanodrop cihazında saptanması.....	24
Şekil 2.11. Antijen titrasyonu.....	25
Şekil 2.12. Antijen sabit tutularak pozitif ve negatif kontrol serumların titrasyonu	26
Şekil 2.13. Konjugat titrasyonu sonucu mikropleytteki renk değişimi.....	27
Şekil 3.1. Herrold's Egg Yolk Agar besiyerinde görülen üreme.....	30
Şekil 3.2. Ziehl-Neelsen boyama işlemi.....	30
Şekil 3.3. Ziehl-Neelsen boyama sonucu elde edilen mikroskop görüntüsü.....	31
Şekil 3.4. Kan serumu örneklerinin ELISA sonuçları	31

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Toplanan kan serumlarının hayvanların yaşı ve ırka göre dağılımı.....	18
Tablo 2.2. Serum titrasyonu sonucu ölçülen optik dansiteler.....	26
Tablo 2.3. Konjugat titrasyonu sonucu ölçülen optik dansiteler.....	28
Tablo 3.1. Şekil 3.4’de belirtilen örneklerin optik dansite sonuçları.....	32
Tablo 3.2. Serumların optik dansiteleri ve hesaplanan S/P değerleri.....	33
Tablo 3.3. Serumların S/P oranına göre dağılımı.....	38
Tablo 3.4. Laboratuvar yapımı ve ticari ELISA kitinin karşılaştırılması.....	38

SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

SEMBOLLER

>: Büyük

<: Küçük

≥: Büyük eşit

%: Yüzde

°C: Santigrat derece

ml: Mililitre

g: Gram

rpm: Dakikadaki devir sayısı

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

pH: Power of Hydrogen

M: Molar

nm: Nanometre

CO₂: Karbondioksit

NaOH: Sodyum Hidroksit

H₂SO₄: Sülfirik Asit

KISALTMALAR

ABTS: 2,2'-azinodi-etilbenzotiazolinsülfonik asit

AGID: Agar jel immünodifüzyon

BSA: Bovine serum albumin

CF: Komplement fikzasyon

ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

FTS: Fizyolojik Tuzlu Su

GALT: Gut-associated lymphoid tissue

IMS: İmmunomanyetik separasyon

MAP: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

OD: Optik dansite

OPD: Ortofenilendiamin

PBS: Phosphate buffered saline

PPD-A: *M. avium*'un saf protein derivatı

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RAPD: Random amplified polymorphic DNA

RFLP: Fragment-length polymorphism

SNPs: Single nucleotide polymorphism

S/P: Sample/positive

TMB: Tetrametil-benzidin

VNTRs: Variable number tandem repeats

ZN: Ziehl-Neelsen

1.GİRİŞ

Paratüberküloz (Johne's hastalığı), genellikle evcil ruminantlarda görülen, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) isimli bir bakterinin neden olduğu, kronik gastroenteritis, ishal ve zayıflama ile karakterize enfeksiyöz bir hastalıktır (Liu vd., 2017; Fawzy vd., 2018). Özellikle genç sığırlar en duyarlı hayvanlardır. Enfekte hayvanlar ağırlıklı olarak dışkılarıyla etkeni saçarlar (Gilardoni vd., 2012). Hayvanlar genellikle kontamine yem, su ve kolostrumun tüketilmesiyle enfekte olurlar (Sweeney vd., 2006). Paratüberküloz etkeninin aynı zamanda insanlarda görülen Crohn's hastalığının etiolojisinde olası rolünün olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle paratüberküloz halk sağlığı açısından da önem arz etmektedir. Kontamine süt insanlar için bulaşma kaynağıdır. Pastörizasyon işlemi genellikle bakteriyi yok etmez (Over vd., 2011; Civelek, 2017).

Klinik bulgular çoğunlukla 3-6 yaş arası sığırlarda görülür. Enfekte genç sığırlarda klinik bulgular görülmez. Subklinik enfekte yetişkin hayvanlar etkeni taşımalarına rağmen hastalığın belirtilerini göstermezler. Nekropside gastrointestinal sistem ve bölgesel lenf yumrularında lezyonlar görülebilir. İnce bağırsağın özellikle ileum kısmı kalınlaşmış ve kıvrılmış (beyin benzeri) görünümündedir (Arda vd., 1997; Baumgartner ve Khol, 2006).

Paratüberkülozun hastalığı klinik bulgular, nekropsi ve laboratuvar muayeneleriyle teşhis edilebilir. Klinik ve nekropsi bulgularıyla teşhisin yapılamadığı durumlarda laboratuvar testleri yapılmak zorundadır. Hastalığın teşhisi; bağırsak mukozası ve gaitadan hazırlanan preparatların Ziehl-Neelsen yöntemiyle boyanarak mikroskopik olarak incelenmesi, fekal kültür, DNA problemlerinin kullanımı ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile etkenin tespiti yanında, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Komplement Fiksasyon (CF), İnterferon Gama ve Jel Presipitasyon Testleri kullanılarak gerçekleştirilir. Geçmişte kullanılan Johnin Testi bugün için sadece araştırma çalışmalarında uygulanmaktadır (Baumgartner ve Khol, 2006; Gilardoni vd., 2012; OIE, 2013).

Fekal kültür paratüberkülozun teşhisinde altın standart olarak kabul edilir. Ancak bu yöntem zordur ve uzun süre alır ve hastalığın erken dönemlerinde bazen etken tespit

edilemeyebilir (Ayele vd., 2001; OIE, 2013). Etkene karşı oluşan antikorları ortaya koymak için en yaygın kullanılan serolojik testlerden biri ELISA testidir (Nielsen ve Toft, 2008). ELISA hem kan serumu hem de süt örnekleri için kullanılabilir (Khol vd., 2005). Hayvan sürülerinde hastalığı tespit etmek için çeşitli ticari ELISA kitleri üretilmektedir (OIE, 2013). ELISA testinin kolay olması, tekrarlanabilmesi, sonuçların objektif yorumlanabilmesi birçok örneğin işlenebilmesi ve diğer testlere göre ucuz olması gibi avantajları vardır (Gilardoni vd., 2012).

Paratüberküloz hastalığının tedavisi olmadığı için koruma ve kontrol çok önemlidir. Etkeni taşıyan hayvanlar mümkün olan en kısa zamanda sürüden çıkartılmalıdır. Kontrol programı kapsamında 1.5 yaşından büyük tüm hayvanlar 6 ayda bir ELISA ve bakteriyel kültür veya PZR ile test edilmelidir (Baumgartner ve Khol, 2006).

1.1 Paratüberküloz Hastalığı

1.1.1. Tarihçe ve Etiyoloji

Paratüberküloz hastalığı ilk kez 1895 yılında Almanya'nın Oldenburg bölgesinde tespit edilmiştir (Johne ve Frothingham, 1895). Hastalık ilk tespit edildiği zaman etken tüberküloz basilinden ayırt edilemediği için tüberkülozun atipik formu olarak tanımlanmıştır. Bundan yaklaşık on yıl sonra Bang 1906 yılında bu hastalığın tüberküloz olmadığını tespit etmiş ve hastalığa pseudotüberküloz enteritis adını vermiştir (Bang, 1906). Daha sonraları hastalık paratüberküloz veya Johne hastalığı olarak isimlendirilmiştir (Baumgartner ve Khol, 2006). Türkiye'de paratüberküloz ilk kez 1928 yılında sığırlarda (Sezginer, 1928), 1968 yılında koyunlarda (Hakioğlu, 1968) ve 1973 yılında keçilerde saptanmıştır (Alibaşoğlu vd., 1973).

Paratüberkülozun etkeni asit-faz nitelikte, Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, aerobik, kapsülsüz ve çomak şeklinde bir bakteri olan *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)'dir (Radostits vd., 2007). *Mycobacterium* cinsi içerisinde 100'den fazla tür vardır ancak bunların birkaç tanesi insan (*M. leprae*, *M. tuberculosis* ve *M. ulcerans* türleri) ve hayvanlar (*M. bovis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ve *M. avium* subsp. *avium* türleri) için patojeniktir. Son yıllarda yapılan sınıflandırmaya göre *Mycobacterium avium* kompleksi içerisinde, *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) ve *M. avium* subsp. *silvaticum* alt türleri yer almaktadır. MAP, besiyerlerinde çok yavaş gelişerek 8-24 haftada gözle görünür koloni oluşturur. Bu özelliği ile hızlı gelişen diğer türlerden ayırt edilebilir (Chacon vd., 2004). MAP'ın lipidce zengin hücre duvarı vardır (Manning 2001). MAP'ın identifikasyonu için besiyerlerinde mikobaktine ihtiyaç duyulur (Selbitz, 2002; OIE, 2013). MAP sığır dışkısında ve toprakta bir yıldan daha fazla, nehir sularında yaklaşık 160 gün ve havuz sularında 9 ay, -14 °C'de en az bir yıl canlı kalabilir (Baumgartner ve Khol, 2006). Pastörizasyon işlemi etkeni tam olarak yok etmek için yeterli değildir (Over vd., 2011).

1.1.2. Epidemiyoloji

Paratüberküloz birçok birçok ülkede görülen bir hastalıktır. Daha çok sığır, koyun ve keçilerin bir hastalığı olarak kabul edilmesine rağmen tüm ruminantlar duyarlıdır. Geyik ve muflon (Machackova vd., 2004), manda (Sivakumar vd., 2005) ve devegillerde de

hastalık görülür (Selbitz, 2002). Yaban domuzu (Alvarez vd., 2005), fare, rat ve tilki (Florou vd., 2005), tavşan (Judge vd., 2005), ayı, farklı böcekler ve solucanlar (Kopečna vd., 2005) gibi ruminant olmayan diğer türlerde de hastalığın görüldüğü bildirilmiştir. Enfeksiyonun yayılmasının en önemli yolu fekal-oral bulaşmadır. Enfekte sığırlar dışkı, süt ve kolostrum ile çok sayıda etkeni yayarlar. Hastalığın inkubasyon periyodu 1-10 yıl arasında değişir (Fecteau ve Whitlock, 2010). Enfekte hayvanların kolostrumu/sütü, kontamine olmuş yem ve sular hastalığın bulaşma kaynaklarıdır (Sweeney vd., 2006). Klinik belirti göstermeyen enfekte hayvanlar dışkılarıyla etkeni uzun süre yayabilir. Etken aynı zamanda asemptomatik ineklerin sütleri ve kolostrumunda bulunabilir (Smith ve Bradford, 2001; Whitlock vd., 2005). Buzağların doğumdan sonra anne ile aynı yerde kalması ve anne sütü ile beslenmesi enfeksiyonun geçişine yol açar (Çetinkaya vd., 1997). Sığırların etkeni 1.5 yaşından önce yaymadığı düşünülmeye karşın, yapılan çalışmalar enfekte genç buzağların da bakteriyi yaydığı ve bu yolla aynı çevredeki diğer buzağları enfekte ettiği bildirilmiştir (Bolton vd., 2005; Weber vd., 2005). Yeni doğmuş buzağlar genellikle enfekte hayvanların dışkıları ile atılan etkeni ağız yoluyla alarak enfekte olurlar. Hijyen koşullarının kötü ve ahırların kalabalık olması hastalığın yayılmasında etkili faktörlerdir (Quinn vd., 2005).

Son yıllarda paratüberküloz ile insanlarda görülen Crohn hastalığı arasında bir ilişkinin olduğu ileri sürülmektedir (Quinn vd., 2005; Niesen ve Toft, 2008). MAP'ın insanlara bulaşarak paratüberküloza benzer klinik belirtiler gösteren bir hastalığın etiolojisinde rol oynayabileceği fikri ilk defa 1913 yılında iddia edilmiştir (Hermon-Taylor ve El-Zaatari, 2004). Bu iddia aslında insanlarda bağırsağın kronik iltihabına yol açan Crohn hastalığı ile paratüberkülozun, klinik ve patolojik bulgularının benzemesi ve Crohn hastası olan insanlardan MAP'ın izole edilmesinden kaynaklanmaktadır (Harris and Barletta, 2001; Davis vd., 2012). MAP'ın Crohn hastalığı vakalarının tümünden olmasa da bazılarında sorumlu olduğu hususunda bilimsel veriler olmasına rağmen bu durum muallaktır ve tartışmalara yol açmaktadır (Patel and Shah, 2011). Crohn hastalığının etiolojisi tamamen bilinmemekle birlikte genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimlerinin hastalığa sebep olduğu tahmin edilmektedir (Ailsa and Siew, 2015). Konakçı bağışıklık sisteminin yeterli çalışmaması da hastalıkta etkin rol oynar (Grant vd., 2001). Hastalığın etiolojisinde MAP'ın dışında değişik türde mikroorganizmaların da yer aldığı bildirilmiştir (Ailsa and Siew, 2015).

1.1.3. Patogenez

Mikroorganizma sindirim yolu ile alındıktan sonra bağırsak ile ilişkili lenfoid dokuya (gut-associated lymphoid tissue, GALT) yerleşir ve burada makrofajlar tarafından fagosite edilir (Lamont, 2012). Deneysel olarak enfekte edilen buzağı, keçi ve farelerde etkenin enterositler aracılığıyla alındığı da bildirilmiştir (Bermudez vd., 2010). Etkenin bağırsak mukozasına bağlanmasında membran proteinleri ile fibronektine bağımlı bir mekanizma önemli bir rol oynar. Bakterinin üzerinde bulunan fibronektin bağlayan proteinler, bakteriye fibronektinin bağlanmasını kolaylaştırır. Fibronektin intestinal epitelyal hücrelerde bulunan $\beta 1$ integrinler ile bakteri arasında köprü vazifesi görür (Secott vd., 2002; Secott vd., 2004). Etkenin ilk hedefi bağırsaktaki M hücreleridir (Lamont, 2012). Klinik bulgular görülen sığırların buzağılarının yaklaşık % 25'i intrauterin olarak enfekte olur (Whitlock, 1996). Etken esas olarak ileuma yerleşir. Makrofajlar M hücrelerinden salınan bakteriyi fagosite eder ve lokal lenfatiklere göç ederek enfeksiyonun bölgesel lenf yumrularına yayılmasına yol açar (Klee, 2004). Hastalık ilerledikçe ince bağırsak mukozasından submukozaya geçen bakteriler mukozanın kalınlaşmasına neden olur. Bağırsaklarda gıda ve su emiliminin bozulması sonucu kronik ishal görülür (Arda vd., 1997; Quinn vd., 2005)

1.1.4. Klinik Belirtiler

Paratüberkülozun inkubasyon süresi oldukça uzun olduğundan (yıllarca) klinik belirtilerin görülmesi zaman almaktadır. Enfekte sığırlarda belirtiler genellikle 2 yaşından önce görülmez. Klinik olarak hastalıklı sığırlarda en önemli belirtiler; şiddetli ishal, kaşeksi, tüylerde kabarıklık, derinin kuru bir hal alması ve süt veriminin düşmesidir. Subklinik olarak enfekte sığırlarda klinik belirtiler görülmez. Keçi ve koyunlarda, ishal genellikle görülmez. Bu hayvanlarda prognoz kötüdür ve hastalık ölümle sonuçlanır (Arda vd., 1997; Baumgartner ve Khol 2005). İştahta bir azalma olmamasına rağmen ilerleyen bir kilo kaybı gözlenir. Diğer hayvan türlerinde, ishal belirtisi olmadan aşırı bir zayıflık şekillenebilir (Arda, 1997; Quinn vd., 2005; Yardımcı, 2006). Birçok hayvan, enfekte oldukları halde, hayatları boyunca klinik belirtiler göstermeyebilir. Bakım ve beslenme sorunları, stres, gebelik, yüksek süt verimi, uzun süreli kortikosteroid alımı gibi sebepler hastalığın klinik forma dönüşmesine neden olur (Andrews, 1992).

Hastalık klinik bulguların şiddetine göre; sessiz enfeksiyon dönemi, subklinik hastalık dönemi, klinik form dönemi ve ilerlemiş klinik form dönemi olmak üzere dört evrede incelenebilir.

Evre 1 (Sessiz enfeksiyon dönemi): Mikroorganizmanın bağırsaktaki fagositik hücreler tarafından alınması, bağırsak mukozası içerisine ve daha sonra bitişikteki lenf yumrularına taşınmasıyla hastalık başlar. Hastalık başlar başlamaz etken jejunal ve ilial mukoza içerisinde çoğalır ve bölgesel lenf nodüllerine yayılır. Bu dönem genellikle 2 yıl sürer bazen 10 yıla kadar devam eder (Fecteau ve Whitlock, 2010). Hayvanlar bu dönemde dışkılarıyla etkeni saçabilir. Bazen mikroorganizma kültür ve PCR ile tespit edilebilir. Bakterinin spesifik proteinlerine özgü hem hücresel hem de humoral bağışık yanıt şekillenir (Waters vd., 2003).

Evre II (Subklinik hastalık dönemi): Bu dönemde hayvanların bağırsaklarındaki etken miktarı artmıştır. Bu hayvanlarda ishal ve zayıflama görülmez. MAP antijenine karşı sitotoksik T lenfositleri tarafından immun yanıt oluşturulur. T lenfositleri tarafından gama interferon üretimi artar ve aynı zamanda antikor üretiminde de artış görülür (Basey ve Collins, 1997). Çoğu hayvanlar dışkılarıyla etkeni çevreye yayarak çiftlikteki diğer hayvanları enfekte ederler. Bazı hayvanların dışkı örneklerinde etken tespit edilebilir. Bu dönem hastanın immun cevap oluşturmaya veya vücuttaki MAP yoğunluğuna göre birkaç yıl devam edebilir (Andrews, 1992; Fecteau ve Whitlock, 2010).

Evre III (Klinik form dönemi): Bu dönemde zayıflama ve ishal belirgindir. Aralıklı ishal birkaç hafta sürer. Solunum ve kalp frekansları ve vücut ısısı normaldir. İştahsızlık, kaşeksi ve süt veriminde düşüş görülür. Hemen hemen tüm hayvanların fekal kültür testleri pozitif sonuç verir. Ticari ELISA ve agar jel immunodiffüzyon testleri ile antikorlar saptanabilir. Bağırsak mukozasındaki etken konsantrasyonu çok yüksektir ve bağırsak mukozası kalınlaşmıştır (Fecteau ve Whitlock, 2010).

Evre IV (İlerlemiş klinik form dönemi): Hayvanlar zayıf ve iştahsızdır. Genellikle kronik aşırı ishal ortaya çıkar. Çene altı ödemi bu evrede görülen karakteristik bulgudur. Subklinik dönemden bu döneme geçiş, birkaç hafta içinde hızlıca olabilir. Hayvanların sağlık durumu hızlı bir şekilde bozulur. Hayvanlar kesilmediği takdirde, kaşeksi ve dehidrasyona bağlı olarak ölümler görülür (Blood vd., 2000; Fecteau ve Whitlock, 2010).

1.1.5. Nekropsi Bulguları

Hasta sığırlarda lezyonlar yaygın granülatöz değişiklikler ve nonnekrotik fibrozis ile karakterizedir. Gastrointestinal sistem ve bölgesel lenf yumrularında lezyonlar ortaya çıkar. Bağırsağın özellikle ileum mukozasının kalınlaşması ve beyin benzeri kıvrımlı bir hal alması hastalık için tipik bulgudur (Baumgartner ve Khol, 2010). Mezenterik lenf yumruları genellikle genişlemiş ve ödemlidir. Kazeöz ve kalsifiye lezyonlar keçilerde sıklıkla fakat koyunlarda nadiren görülür. Bağırsak dışında lezyonlar nadir olmakla birlikte, ileri vakalarda vücut boşluklarında seröz eksudat, vücut yağlarında atrofi, aortta atherosklerozis, miyoatrofi, renal enfarktüs, karaciğerde tahribat ve anemi şekillenebilir (Quinn vd 2005; Gilardoni vd., 2012; OIE, 2013).

1.1.6. Teşhis

Klinik paratüberküloz vakalarının teşhisi genellikle; semptomlar, anamnez ve necropsi bulgularıyla yapılır. Semptom görülmeyen vakalarda ise tanı amaçlı laboratuvar testlerden yararlanılmaktadır. Özellikle genç ve subklinik enfekte hayvanlarda sensitivite ve spesifitesi yüksek bir test yoktur (Baumgartner ve Khol, 2006). Teşhiste bakteriyel kültür ile etkenin identifikasyonu altın standart test yöntemidir. Ancak hastalığın erken evrelerinde etken çıkarılmadığından kültür yöntemi enfekte hayvanları tespit etmez (Gilardoni vd., 2012). Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), Komplement fikzasyon(CF), Agar jel immunodifüzyon(AGID), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve hücresel (intradermal deri testi ve interferon gama testi) immun yanıtı belirleyen testler, anatomohistopatolojik incelemeler ve in situ hibridizasyon yöntemleri diğer alternatif teşhis yöntemleri arasında yer almaktadır. Bakteriyoskopi, bakteriyolojik kültür ve bakteri DNA'sının tespiti gibi direkt teşhis yöntemleriyle etken identifikasyonu yapılabilir. Humoral ve hücresel bağışıklık yanıtını ortaya koyan testler indirekt teşhiste kullanılır (Gilardoni vd., 2012; OIE, 2013; Selim ve Gaede, 2015).

1.1.6.1. Bakteriyoskopi

Mikobakterilerin etrafında balmumu tabakası olduğundan normal boyama yöntemleriyle boyanmazlar. Etkenin identifikasyonu için kullanılan bakteriyoskopik metot

Ziehl-Neelsen boyamadır. Bu boyama, fuksin ile boyama işleminden sonra asit-alkol ile dekolarizasyona karşı mikobakterilerin dirençli olması ve boyayı bırakmaması esasına dayanır. Ziehl-Neelsen boyama basit, hızlı ve ucuz bir yöntemdir. Ancak bu yöntemin dışkı, kolostrum ve süt örneklerinde düşük sensitivite ve spesifiteye sahip olması ve diğer mikobakteri türleri arasında ayrımının yapılamaması gibi dezavantajları vardır. Dışkı ve veya intestinal mukozadan hazırlanan ve Ziehl-Neelsen yöntemiyle boyanan preparatlarda küçük (0.5-1.5 µm) ve küçük topluluklar halinde asit-fast basillerin görülmesi ile tanı konabilir (Gilardoni vd 2012; OIE 2013). Tanı için birkaç farklı preparatın incelenmesi gerekir (Muskends vd., 2003). Ziehl-Neelsen boyamada, mikobakteriler kırmızı, zemin ise mavi renkte görülür (Arda vd., 1997). Özellikle lezyonlu ileosekal valf veya intestinal lenf yumrularından hazırlanan preparatlarda, lezyonda mevcut olan makrofajlar içerisinde 10-20 parlak renkli basil kümelerinin görülmesi paratüberküloz teşhisi için oldukça önemlidir (Paolichi ve Roman, 2007).

1.1.6.2. Kültür

Bakteriyolojik kültür ile etkenin identifikasyonu referans teşhis yöntemi (altın standart) olarak kabul edilir. Dışkı, kolostrum süt veya bağırsak mukozası kalıntısı örnek olarak kullanılabilir. Fekal kültür 3-5 örnek havuzlanarak yapıldığında çok fazla sensitivite kaybı olmaz (Kalis vd., 2000; Gilardoni vd., 2012). Kültür, teknik olarak zor ve zaman alıcı bir işlem olmasına karşın, yanlış pozitif sonuç vermeyen (% 100 spesifite) tek yöntemdir. Fekal kültürün canlı hayvanlarda hastalığın teşhisi için yaygın olarak kullanılan bir test olduğu, hastalığın ilerlemiş evrelerinde hasta hayvanların çoğunu tespit edebildiği ve erken evrelerde ise sadece birkaç hayvanı saptayabildiği bildirilmiştir (Nielsen ve Toft, 2008). Sütlerin bakteriyolojik kültürü yapılarak hastalık tanısı konabilir (Paolichi vd., 2003). Genellikle sütün bakteriyolojik kültürü santrifüj, zenginleştirme ve immunomanyetik separasyon (IMS) vb. bir ön işlem uygulandıktan sonra yapılmaktadır (Donaghy vd., 2008). Sütün içerisinde var olan mikroorganizma sayısı dışkıya nazaran daha az olduğundan etkenlerin ayrışmasını sağlayabilmek için öncelikli olarak santrifüj işleminin yapılması gerekir Süt santrifüj işleminden sonra üç kısma (su, pelet, krema) ayrılır. Özellikle MAP etkenlerinin pelet ve krema bölümlerinde bulunduğu ve inokülasyon için bu kısımlardan örneklerin alınması gerektiği bildirilmiştir (Bradner, 2013).

Besiyeri ortamları ve örnek işleme protokollerine göre değişen birkaç kültür yöntemi vardır. MAP'ın kültürü daima mikobaktin J eklenen özel besiyerleri kullanılarak yapılır. Katı ortamlarda etkenin kültürü için Herrold'un mikobaktinli yumurta sarılı besiyeri, Löwenstein Jensen veya Middlebrook 7H10, 7H11 gibi besiyerlerinden faydalanılmaktadır. Katı ortamlara ilave olarak Middlebrook 7H9, 7H12 ve BACTEC 12B gibi sıvı ortamlar da kullanılabilir (Donaghy vd., 2008; Gilardoni vd., 2012). Dışkı ve bağırsak dokusundaki diğer bakteri ve mantarlar MAP'ın üremesini engeller. Bu nedenle etkenin başarılı bir şekilde izole edilebilmesi diğer mikroorganizmaların etkili bir şekilde inaktivasyonuna bağlıdır. Dekontaminasyon için 2 temel yöntem vardır. Bunlardan birisi üreme için Löwenstein Jensen ve dekontaminasyon için okzalik asit ve NaOH'in kullanıldığı yöntem, diğeri ise üreme için Herrold'un mikobaktinli yumurta sarılı besiyeri, ve dekontaminasyon için hexadecylpyrimidinium chloride'nin kullanıldığı yöntemdir. Sığır albümini, oleik asit ve katalaz eklenmiş sıvı besiyerlerinde (Middlebrook 7H9, 7H12) zenginleştirmeden sonra katı besiyerleri kullanıldığında MAP'ın üremesi hızlanmaktadır. Koyun suşları Herrold'un mikobaktinli yumurta sarılı besiyerine göre, Middlebrook 7H10 besiyeri ortamında daha iyi ürer. Koyun ve sığır suşlarının gelişmesi için sıvı ortamların katı ortamlardan daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (OIE, 2013).

Sıvı ortamlarda bakteri üremesini tespit etmek için otomatik sistemler geliştirilmiştir. Radiometrik BACTEC 460 sisteminde işaretleyici olarak kullanılan karbon (C^{14}), bakteri solunumuna bağlı olarak karbondioksit (CO_2) konsantrasyonundaki değişiklikleri tespit eder. Diğer otomatik sistemler fluorometrik, barometrik ve kalorimetrik yöntemlerdir (Stich vd., 2004).

Katı ortamlarda koloniler inkubasyondan sonra 5 hafta-6 ay arasında görülebilir. Koloniler başlangıçta çok küçük (0.25-1 mm çapında) olup, yuvarlak, yüzeyleri düzgün ve parlak görünümündedir. İnkubasyon süresi uzadıkça koloni büyüklüğü 2 mm çapa ulaşabilir. MAP'ın identifikasyonu için şüpheli kolonilerden mikobaktinli ve mikobaktinsiz aynı besi ortamına ekim yapılmalıdır. Ayrıca izolatların identifikasyonunu konfirme etmek için PZR testi kullanılabilir (OIE, 2013).

1.1.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR testinde bakterinin genomunda 15-20 kopya halinde bulunan ve 1451 baz çifti uzunluğuna sahip IS900 insersiyon sekansı saptanarak etken identifiye edilebilir (Collins

vd., 1989; Li vd., 2005). f57 insersiyon elementinin tespitine yönelik yapılan PZR ile de etken identifikasyonu mümkündür (Slana vd., 2008; OIE 2013).

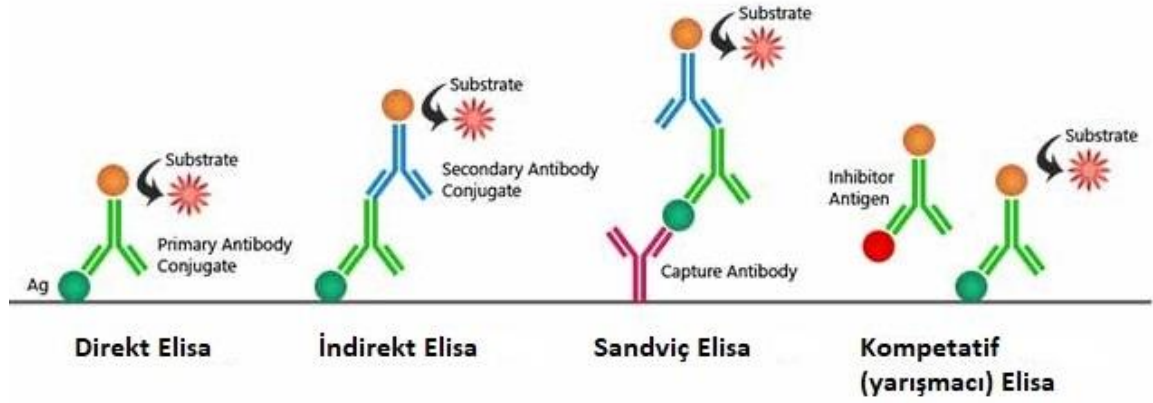
PZR, hem klinik örneklerde etkeni saptamak, hem de kültür sonrası elde edilen izolatları tanımlamak için kullanılır. Saf kültürden identifikasyon için kullanıldığında spesifik olmasına karşın klinik örneklerle çalışıldığında inhibitör faktörler problemlere yol açmaktadır. PZR testinde kontaminasyon nedeniyle yanlış pozitif sonuç ve inhibitör faktörler nedeniyle de yanlış negatif sonuçlar alınabilir (Çetinkaya vd., 2000). PZR, süt, dışkı, kan ve doku örneklerinde bulunan MAP'ı direkt tespit etmek için kullanılır. PZR testinin avantajı, spesifitesinin yüksek olması (yaklaşık % 90) ve 24 saatten daha kısa sürede sonuç alınabilmesidir. Dezavantajı ise sensitivitesinin düşük olması (yaklaşık % 53) ve canlı ve ölü bakterilerin ayırt edilememesidir (Kalis vd., 1999). IS900'e benzer elementlerin diğer bakterilerde de bulunduğunu bildirmesine karşın, çoğaltılan segmentin metilasyon-restriksiyon veya sekanslamayla ayırt edilebileceği bildirilmiştir (Mundo, 2005). IS900, IS901, IS1245 ve dnaJ genleri amplifiye edilerek uygulanan multipleks PZR testi ile MAP'ın diğer mikobakteri türlerinden ayırt edildiği rapor edilmiştir (Moravkova, 2008). IS1311 sekansının restriksiyon enzim analizi ile *M. avium* subsp. *avium* ve MAP'ın ayırt edilebileceği ve koyun, sığır ve bison suşlarının tiplendirilebileceği bildirilmiştir (Sevilla vd., 2005). Son yıllarda kan, süt, dışkı, doku ve çevre örneklerinde etkeni tespit etmek için gerçek-zamanlı PZR teknikleri geliştirilmiştir (OIE, 2013). MAP'ın moleküler tiplendirilmesinde random amplified polymorphic DNA (RAPD), variable number tandem repeats (VNTRs), IS900-restriction fragment-length polymorphism (RFLP) ve single nucleotide polymorphism (SNPs) yöntemleri uygulanmaktadır (Sonawane vd., 2016).

1.1.6.4. Serolojik Testler

Paratüberkülozun indirekt teşhisinde çeşitli serolojik testlerden yararlanılmaktadır. Serolojik testler maliyet olarak kültür yöntemlerine göre daha ucuz ve daha hızlıdır. (Stricklands vd., 2005). Hastalığın ileri evrelerinde sığırlarda yüksek oranda antikor bulunur. Bu antikorlar enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), komplement fiksasyonu (CF) ve agar jel immunodifüzyon (AGID) testleri ile tespit edilebilir. ELISA ve AGID hızlı, pahalı olmayan, yapılması kolay ve fazla ekipman gerektirmeyen testlerdir. Bunun aksine CF'nin yapılması zordur ve sadece referans laboratuvarlarda uygulanabilir.

ELISA, CF ve AGID testlerinden daha duyarlı bir testtir. İleri klinik evre ve fekal yayılımın fazla olduğu dönemde ELISA'nın sensitivitesi yüksektir (Nilsen, 2008; Gilardoni vd., 2012).

ELISA testinde antijen antikor birleşmesi, bir enzimin substratıyla etkileşime geçerek renkli bir görüntü ortaya çıkarmasıyla belirlenir. Kompleks bir teknik olmayan ELISA'da katı faz, yıkama işlemleri, enzim ve substrat seçimi ve reaksiyonun durdurulma zamanı önemli değişkenlerdir. Katı faz olarak genellikle mikrotitrasyon pleyti halinde bulunan plastikler kullanılmaktadır. Polistren mikrotitrasyon kuyucuklarından başka, plastik boncuklar ve nitrosellüloz membran da solid madde olarak seçilebilir (Abbas vd., 1997; Hendry and Herman, 1980). ELISA için kullanılan enzimler; peroksidaz, alkalen fosfataz, beta-galaktozidaz gibi substratları renkli ürünlere dönüştürme kabiliyetindeki enzimlerdir. Spektrofotometrede substrata göre değişen dalga boyları kullanılarak, oluşan renkli ürünlerin ölçümü (Optik Dansite: OD) yapılır. Beta-galaktozidaz enzimi kullanılmışsa florimetrede ölçüm yapılır. Substratlar genel olarak alkalen fosfataz için nitrofenil fosfat, peroksidaz için ise ortofenilendiamin (OPD), 2,2'-azinodi-etilbenzotiazolinsülfonik asit (ABTS) ve tetrametil benzidin (TMB) dir (Koneman vd., 1992; Coligan vd., 1994; Babacan, 1996; Crowther, 2009). Hastalıkların teşhisinde kullanılan direkt, indirekt, sandviç ve kompetatif ELISA gibi birçok yöntem vardır (Şekil 1.1). İndirekt ELISA ile serum örneklerinde antikorlar aranır. Bunun için ELISA pleytleri antijenle kaplanır. Bu işlem için plaklar 37 °C'de 2 saat veya +4 °C'de bir gece muhafaza edilir (Jitsukawa vd., 1989). Daha sonra ELISA pleytinin kuyucuklarına antikor aranacak serum eklenir. Yıkama işlemlerinden sonra enzim ile işaretli ikinci bir antikor konjugatı (Primer antikora karşı farklı bir canlı türünden elde edilen) eklenir. Daha sonra substrat ilave edilerek örnekte antikor olup olmadığı belirlenir (Crowther, 2009).



Şekil 1.1 . Farklı çeşitlerde ELISA sistemleri (URL-1, 2019)

ELISA, paratüberkülozun serolojik teşhisinde en fazla kullanılan bir testtir. MAP'ın protoplazmik ekstraktından hazırlanan çözünür antijen ve hücre duvarından ekstrakte edilen glikolipit ekstraktlar ELISA testinde antijen olarak kullanılır (Nielsen ve Toft, 2008; Gilardoni vd., 2012). Hem kan serumu, hem de süt örnekleri ELISA ile incelenebilir (Khol vd., 2005). ELISA'nın sürü taramaları ve paratüberküloz kontrol programları için en ucuz ve en uygun metot olduğu bildirilmiştir (Baumgartner ve Kohl, 2006). Paratüberküloz teşhisi için son yıllarda ticari ELISA kitleri geliştirilmiştir. Kullanılan kite göre sensitivite ve spesifite oranları değişir (OIE, 2013). Hayvanın yaşı ve dışkı ile saçılan etken miktarının artması ELISA'nın sensitivitesini etkiler. Ticari ELISA kitlerinin sensitivitesinin fekal saçılımın düşük olduğu hayvanlar için % 9-32 arasında ve fekal saçılımın normal olduğu hayvanlar için % 47-63 arasında olduğu bildirilmiştir (Whitlock vd., 2000). Bazı ticari kitler süt örnekleri için geliştirilmiştir. Sığır ve keçi sütleri kullanılarak yapılan ELISA testi ile serum ELISA testinin spesifitesinin benzer olduğu rapor edilmiştir (Hendrick vd., 2005; OIE, 2013).

Komplement fiksasyon (CF) testi, hayvanlarda paratüberküloz seroprevalansını tespit etmek amacıyla geçmişte yaygın olarak kullanılmıştır. Klinik olarak şüpheli hayvanlar üzerinde iyi sonuçlar alınır. Fakat yeterli spesifiteye sahip değildir. Bununla birlikte günümüzde sığır ithalatı yapan çeşitli ülkeler CF testinin yapılmasını talep etmektedir (OIE, 2013). CF testinde diğer bakterilerle kros reaksiyonların elde edildiği bildirilmiştir (Patel and Shah, 2011).

Agar jel immünodifüzyon (AGID) testi, antikor ve antijenlerin tam katı olmayan jelde açılmış deliklerin arasındaki kısımda kümelenmesi temeline dayanan bir yöntemdir. AGID klinik olarak şüpheli sığır, koyun ve keçilerde hastalığın konfirmasyonu için faydalı bir testtir. Maliyeti düşük olup uygulanması kolaydır. Test sonuçları 24-48 içerisinde alınır (OIE, 2013). İleri klinik evrede sensitivitesinin yüksek olduğu (% 90-95) fakat subklinik evrede sensitivitesinin düşük olduğu %18.9-30 bildirilmiştir (Ayele vd., 2001).

1.1.6.5. Hücresel Temelli Immünite Testleri

MAP'ın vücuda girişinden sonra özellikle T hücreleri tarafından immün yanıt oluşturulur. Bu yanıtı ortaya koyan teşhis testleri; in vivo olarak yapılan intradermal test ve in vitro olarak yapılan interferon gama testidir. Diğer mikobakteriler ile kros reaksiyonlara bağlı olarak her iki testin de ayırım gücü düşüktür (Gilardoni vd., 2012). Hayvan MAP ile temas ettikten sonra oluşan gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu intradermal test ile ortaya konabilir. Test hayvanın boyun derisi içine 0.1 ml PPD-A (*M. avium*'un saf protein derivatı) veya PPD-J (Johnin) enjekte edilerek yapılır. İnokulasyon yapıldıktan 72 saat sonra deri kalınlığı ölçülür ve 2 mm'den daha fazla deri kalınlığı artışı pozitif olarak değerlendirilir (OIE, 2013). Yapılan bir çalışmada deri testinin spesifitesi; eşik değer ≥ 2 mm alındığında % 88.8, eşik değer ≥ 3 mm alındığında % 91.3 ve eşik değer ≥ 4 mm alındığında % 93.5 olarak tespit edilmiştir (Kalis vd., 2003). Deri testinin avantajı, yapılmasının kolay olmasıdır. Hücresel immünite, etkenin saçılması ve humoral immün yanıttan önce geliştiği için, serolojik testler ve bakteriyel kültürden daha önce deri testi ile subklinik evredeki enfekte hayvanları tespit etmek mümkündür. Deri testinin dezavantajı, kros reaksiyonlar nedeniyle sensitivite ve spesifitesinin düşük olmasıdır (Gilardoni vd., 2012).

İnterferon gama testi, spesifik antijen ile 18-36 saat inkubasyon süresi içerisinde duyarlı hale getirilen T lenfositleri tarafından üretilen gama interferon miktarının belirlenmesi esasına dayanır. Bu testle paratüberkülozunun teşhisi için ticari kitler geliştirilmiştir. Hastalığın erken evrelerinde önemli miktarda interferon gama salgılandığından subklinik evredeki hasta hayvanları tespit etmek için kullanılabilir. Kros reaksiyonların görülmesi, maliyetinin yüksek ve sensitivitesinin düşük olması dezavantajdır (Stabel, 1996). Sığırlarda interferon gama testinin spesifitesinin % 67-94

arasında, sensitivitesinin ise % 13-85 arasında olduğu bildirilmiştir (Kalis vd., 2003; Nielsen ve Toft, 2008).

1.1.7. Koruma ve Kontrol

Hastalığın teşhis ve tedavisi zor olduğundan, koruma ve kontrol oldukça önemlidir. Sürü veya çiftlik bazlı subklinik enfekte hayvanlar, 6 ayda bir uygulanan dışkı kültürü ve PZR gibi moleküler teknikler ile etkenin tespiti yapıp veya serolojik/alerjik testler ile belirlenerek sürüden ayıklanmalıdır. Pozitif çiftliklerde ilave hijyenik önlemler alınmalı ve hastalığın sürü içerisinde yayılması önlenmelidir. Hijyenik önlemlerin amacı yeni doğanları, buzağıları ve satın alınarak çitliğe yeni getirilen hayvanları enfeksiyona karşı korumaktır. Enfekte hayvanlardan doğan yavrular anne sütü ile beslenmeden hemen annelerinden ayrılmalıdır. Bu hayvanlar antijen ve antikor negatif hayvanlardan elde edilen kolostrum ile beslenmelidir. Kontamine gübreler kullanılmamalıdır. Suların, yemlerin, yemlik ve sulukların dışkı ile bulaşması engellenmelidir. Kontrol tedbirlerinin bir parçası olarak aşılama birkaç ülkede uygulanmaktadır. Aşı yapılarak sığırlarda klinik vaka sayısı azaltılabilir. Bir sürüye aşılama yapılarak hastalık elimine edilemez. Aşılı hayvanlar genellikle tüberküline duyarlı olacağından deri testinin yanlış yorumlanmasına neden olabilir (Arda, 1997; Ayele vd., 2001; Haris and Barletta, 2001; Quinn vd., 2005; Baumgartner ve Khol, 2006; Yardımcı, 2006; OIE 2013).

1.1.8. Paratüberkülozun Dünyadaki Durumu

Sığır paratüberkülozunun birçok ülkede görüldüğü bildirilmiştir. Kanada'da mezbahada kesilen 984 sütçü sığırın mesenterial lenf nodülleri ile ileumları toplanarak histolojik ve bakteriyolojik olarak incelenmiş ve hastalığın prevalansı % 16.1 olarak saptanmıştır (McKenna vd., 2004). İspanya'da yürütülen bir çalışmada 200 inek tank süt örneğinin PZR ile analizi sonucunda, örneklerin yaklaşık % 10'unda MAP tespit edilmiştir (Sevilla vd., 2002). Çek Cumhuriyeti'nde 131 inekten alınan süt, dışkı ve çeşitli doku örnekleri MAP yönünden incelenmiş ve hayvanların % 37.4'ünden etken izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Hasanova vd., 2009). İran'da, 110 koyun, 95 deve, 144 sığır kanı ile 83 boğa sperması nested PZR ile analiz edilmiş ve 16 koyun (% 14.54), 7 deve (% 7.36) 11 sığır (% 7.63) kanı ile 7 boğa spermasında (% 9.64) MAP DNA'sı saptanmıştır (Khamesipour vd., 2014). Hindistan'da yapılan bir çalışmada ise 350 inek serumunun

53'ünde (% 15.14) ve 300 inek sütünün ise 55'inde (% 18.33) indirekt ELISA ile pozitiflik saptanmıştır (Gupta vd., 2012). Avustralya'da paratüberkülozun prevalansını tespit etmek amacıyla yapılan bir çalışmada, 1123 sığır kan serumunun 26'sında (%2.31) ticari ELISA kiti ile pozitiflik tespit edilmiştir (Gurung vd., 2018). Çin'de, sütçü ineklere ait 3157 kan serumu örneğinin 152'sinin (%4.8) ticari ELISA kiti ile pozitif bulunduğu bildirilmiştir (Liu vd., 2017). Mısır'da, kronik ishallerli sığırlardan alınan 138 dışkı örneğinin 15'i kültür ve PZR ile pozitif bulunmuş, 2 yaşın üzerindeki normal ve ishallerli hayvanlardan toplanan 700 serum örneğinin 97'sinin (13.8) ticari ELISA kiti ile pozitif sonuç verdiği saptanmıştır (Selim vd., 2019). Avrupa ülkelerinde sığırlar arasında prevalansın, bazı ülkelerde en az % 3-5 olmak üzere genellikle yaklaşık % 20, sürü prevalansının ise % 50'inin üzerinde olduğunu bildirilmiştir (Nielsen ve Toft, 2008). İngiltere'de yapılan bir çalışmada, 114 sığır çiftliğinden toplanan 15736 kan serumunu ELISA ile incelendiğinde % 7.1 oranında seroprevalans saptanmıştır (Woodbine vd., 2009). İspanya'da 61069 sığırdan alınan kan serumları ticari bir ELISA kiti ile incelenmiş ve sütçü, etçi ve karışık ırk sürülerde sırasıyla sürü prevalansı % 10.69, % 0 ve % 2.71; bireysel prevalans ise % 4.03, % 2.07 ve % 3.84 olarak tespit edilmiştir (Diéguez vd., 2007). Hollanda'da 378 çiftlikten en az 3 yaşında olan 15822 inekten alınan kan serumu örnekleri ticari bir ELISA kiti ile incelenmiş, sürülerin 207'sinde (% 55) en az bir veya daha fazla hayvan serolojik olarak pozitif bulunmuştur (Muskens vd., 2000). İrlanda'da, 639 sürüdeki bir yaş üstü 20322 inek/boğadan alınan kan serumları ELISA ile incelenmiş, sürü prevalansı % 21.4 olarak belirlenmiştir (Good vd., 2009). Avusturya'da mezbahalarda kesilen 756 sığırdan toplanan kan örnekleri ELISA ile incelenmiş ve % 19 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir (Dreier vd., 2006).

1.1.9. Paratüberkülozun Türkiye'deki Durumu

Paratüberkülozun, Türkiye'de ilk kez 1928 yılında sığırlarda (Sezginer, 1928), 1968 yılında koyunlarda (Hakioğlu, 1968) ve 1973 yılında keçilerde (Alibaşoğlu vd., 1973) tespit edildiği bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda serojik ve moleküler testler kullanılarak hastalığın yaygınlığı araştırılmıştır. ELISA testi ile Türkiye genelinde sığırlarda paratüberkülozun prevalansı % 4.6 olarak bildirilmiştir (Atala ve Akçay, 2001). Yıldırım ve Civelek (2013), Uşak ilinde 200 süt sığırından alınan dışkı örneklerinin % 20'sinde, süt örneklerinin ise % 17.5'inde PZR ile pozitiflik tespit etmişlerdir. Makav ve

Gökçe (2013), Kars ilinde sığırlarda bireysel prevalansı % 3.5 ve sürü prevalansını % 41.6 olarak tespit etmişlerdir. Çelik (2015), Burdur ilinde, 150 sığırdan topladıkları kan serumlarını ticari ELISA kiti ile incelemişler ve % 8 oranında seropozitiflik saptamıştır. Gümüşsoy vd. (2015) Kayseri ilinde yaptıkları bir çalışmada, kronik ishalli 2 yaşın üzerindeki 147 sütçü sığırdan kan ve süt örnekleri toplamışlar ticari ELISA kiti ile sığırlarda % 12 oranında seropozitiflik tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar süt örneklerinin % 13.61'inde MAP DNA'sı saptamışlardır. Elazığ ilinde, 1997-1998 yılları arasında sığırlardan toplanan 500 süt örneğinin kültür ile % 3.4'ünden etken üretilmiş, PZR ile ise örneklerin % 5'inde etkene spesifik DNA saptandığı bildirilmiştir (Çetinkaya vd., 2000). Kırklareli yöresi süt sığırlarında ticari ELISA kiti ile subklinik paratüberkülozun seroprevalansı % 1.5 pozitif ve % 1.5 şüpheli olarak tespit edilmiştir (Karakaş ve Civelek, 2018). Manisa yöresi süt sığırlarında ticari ELISA kiti ile subklinik paratüberküloz seroprevalansının % 21.72 olduğu ortaya konmuştur (Berberoğlu ve Civelek, 2016). Afyon ve civarındaki çiftliklerde 4-8 yaş arasındaki 305 sütçü sığırdan alınan serum örneklerinin % 31.8'i ticari ELISA kiti ile pozitif bulunmuştur (Borum vd., 2014). Tütüncü vd. (2018), orta karadeniz bölgesinde kronik ishalli 2 yaşın üzerindeki 859 sütçü sığırın 86'sının (%10) ticari ELISA kiti ile pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Özpinar vd. (2015), Trakya bölgesinde rastgele belirledikleri 30 işletmedeki 2 yaş ve üstü süt sığırlarından aldıkları 270 dışkı örneği ile bu işletmelerin ve bulundukları köylerin süt toplama tanklarından aldıkları 45 çiğ süt örneğini real-time PZR ve nested-PZR ile incelemişler, örneklerin hiçbirinde MAP DNA'sı tespit etmemişlerdir.

1.1.10. Araştırmanın Amacı

Ülkemizde şimdiye kadar yapılan serolojik çalışmaların tümünde ticari ELISA kitleri kullanılmıştır. Tarım ve Orman Bakanlığına bağlı laboratuvarlarda rutin teşhiste, ELISA kitleri kullanılarak hastalığın ithal hayvanlarda olup olmadığı test edilmektedir. Bu kitlerin tümü yurt dışından sağlanmakta, Türkiye bu kitler için önemli miktarda dolar veya avro ödemektedir.

Bu araştırmanın amacı, laboratuvarımızda paratüberküloz hastalığının teşhisi için ELISA kiti hazırlamak ve bu kit ile Elazığ ilinde 2 yaşın üzerindeki sütçü sığırlarda hastalığının yaygınlığını araştırmaktır. Ayrıca ticari ELISA kiti ile karşılaştırarak hazırlanan kitin sensitivite ve spesifitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* suşu

ELISA pleytinin kaplanması için kullanılan antijenin hazırlanması için gerekli olan bakteri suşu (DSMZ 44133) ticari olarak temin edildi (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kullanılan liyofilize *M. avium* subsp. *paratuberculosis* suşu (DSMZ 44133)

2.1.2. Besiyeri

Bakterinin üretilmesi için Mycobactin J ve ANV (amphotericin, nalidixic acid ve vancomycin) içeren ticari BD BBL™ Herrold's Egg Yolk Agar besiyeri kullanıldı.

2.1.3. Hayvan Kan Serum Örnekleri

Elazığ'da Eylül 2018-Aralık 2018 tarihleri arasında bir mezbahada kesilen görünürde sağlıklı 2 yaş ve üzerindeki 150 sütçü sığırdan kan örnekleri alındı ve serumları çıkartıldı (Tablo 2.1). Serum örnekleri test edilinceye kadar -20 °C'de saklandı.

Tablo 2.1. Toplanan kan serumlarının hayvanlarının yaşı ve ırkına göre dağılımı.

Örnek No	Hayvan ırkı	Hayvan yaşı	Örnek No	Hayvan ırkı	Hayvan yaşı	Örnek No	Hayvan ırkı	Hayvan yaşı
1	Montofon	2	31	Simental	2	61	Simental	2
2	Montofon	2	32	Simental	2	62	Holştayn	6
3	Montofon	4	33	Karışık	2	63	Simental	2
4	Simental	2	34	Holştayn	4	64	Montofon	2
5	Simental	3	35	Simental	5	65	Holştayn	4
6	Holştayn	5	36	Simental	3	66	Karışık	5
7	Montofon	2	37	Simental	2	67	Holştayn	2
8	Simental	3	38	Simental	2	68	Holştayn	5
9	Montofon	3	39	Karışık	2	68	Holştayn	4
10	Montofon	2	40	Simental	3	70	Holştayn	3
11	Montofon	2	41	Karışık	3	71	Simental	2
12	Montofon	5	42	Karışık	2	72	Simental	3
13	Montofon	2	43	Holştayn	4	73	Simenatal	3
14	Montofon	4	44	Simental	2	74	Montofon	3
15	Montofon	2	45	Simental	4	75	Karışık	5
16	Karışık	6	46	Montofon	4	76	Simental	3
17	Simental	4	47	Karışık	2	77	Simental	4
18	Simental	2	48	Montofon	3	78	Simental	3
19	Karışık	2	49	Karışık	3	79	Montofon	3
20	Montofon	2	50	Montofon	4	80	Montofon	2
21	Montofon	2	51	Montofon	2	81	Montofon	2
22	Karışık	3	52	Simental	6	82	Montofon	4
23	Simental	2	53	Simental	5	83	Simental	2
24	Simental	2	54	Simental	6	84	Simental	3
25	Montofon	2	55	Montofon	2	85	Hoştayn	5
26	Simental	4	56	Karışık	3	86	Montofon	2
27	Montofon	3	57	Simental	4	87	Simental	3
28	Montofon	2	58	Simental	2	88	Montofon	3
29	Karışık	3	59	Simental	6	89	Montofon	2
30	Montofon	4	60	Simental	2	90	Montofon	2

Tablo 2.1'in devamı

Örnek No	Hayvan ırkı	Hayvan yaşı	Örnek No	Hayvan ırkı	Hayvan yaşı	Örnek No	Hayvan ırkı	Hayvan yaşı
91	Montofon	5	121	Karışık	2			
92	Montofon	3	122	Holştayn	4			
93	Montofon	4	123	Simental	3			
94	Montofon	3	124	Simental	4			
95	Karışık	6	125	Montofon	3			
96	Simental	4	126	Karışık	3			
97	Simental	2	127	Montofon	3			
98	Karışık	2	128	Karışık	2			
99	Montofon	3	129	Montofon	4			
100	Montofon	3	130	Montofon	3			
101	Karışık	3	131	Simental	3			
102	Simental	2	132	Simental	2			
103	Simental	2	133	Simental	6			
104	Montofon	5	134	Montofon	5			
105	Simental	4	135	Karışık	3			
106	Montofon	3	136	Simental	3			
107	Montofon	2	137	Simental	4			
108	Karışık	3	138	Simental	3			
109	Montofon	4	139	Montofon	3			
110	Simental	2	140	Montofon	3			
111	Simental	2	141	Montofon	3			
112	Karışık	2	142	Simental	2			
113	Holştayn	4	143	Simental	2			
114	Simental	3	144	Holştayn	2			
115	Simental	3	145	Montofon	4			
116	Simental	2	146	Simental	5			
117	Simental	2	147	Montofon	2			
118	Karışık	4	148	Montofon	3			
119	Simental	3	149	Montofon	3			
120	Karışık	4	150	Holştayn	2			

2.1.4. Kontrol Serumlar

Pozitif ve negatif kontrol serumlar Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden temin edildi (Şekil 2.2).

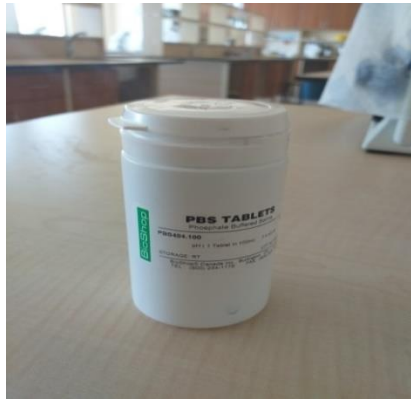


Şekil 2.2. Kullanılan kontrol serumlar

2.1.5. Kullanılan kimyasallar ve solüsyonlar

2.1.5.1. Phosphate Buffered Saline (PBS)

PBS tableti (Bioshop) kutusu içerisinde yer alan her bir tablet 100 ml saf su içerisinde çözdürülüp kullanma solüsyonu hazırlandı (Şekil 2.3). Diğer solüsyonların ve yıkama solüsyonunun hazırlanmasında kullanıldı.



Şekil 2.3. PBS tablet

2.1.5.2. %'3 lük Bovine Serum Albümin (BSA)

PBS içerisinde % 3'lük BSA (Sigma) solüsyonu hazırlandı (Şekil 2.4). Hazırlanan bu solüsyon bloklama işleminde kullanıldı.



Şekil 2.4. BSA

2.1.5.3. Karbonat-Bikarbonat Çözeltisi

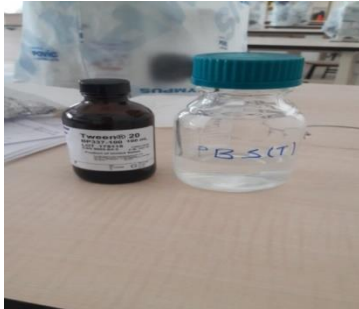
Carbonate-bicarbonate buffer (Sigma) tablet kutusu içerisinde yer alan bir tablet 100 ml distile su içerisinde çözdürülerek kullanma solüsyonu hazırlandı (Şekil 2.5). Antijen kaplama işlemi yapılırken antijenin sulandırılmasında kullanıldı.



Şekil 2.5. Karbonat-bikarbonat

2.1.5.4. Phosphate Buffered Saline Tween (PBST)

% 0.05 oranında Tween 20 içeren PBS solüsyonu hazırlandı (Şekil 2.6). Bu solüsyon yıkama işlemlerinde kullanıldı.



Şekil 2.6. Hazırlanmış PBST çözeltisi

2.1.5.5. %3'lük Yağsız Süt Tozu

3 gram yağsız süt tozu (sigma) 100 ml PBS içinde çözdürüldü ve bloklama işleminde kullanıldı.

2.1.5.6. Konjugat

Peroksidaz ile işaretli rabbit anti-bovine IgG konjugatı (Whole Molecule, Sigma) kullanıldı. PBS ile 1/20.000 oranında sulandırıldı.

2.1.5.7. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Substratı

Enzim substratı olarak TMB (Merck) kullanıldı (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. TMB Substratı

2.1.5.8. Sülfirik Asit (H₂SO₄)

% 95-98'lik H₂SO₄'den (ISOLAB) enzim aktivitesini durdurmak için 0.5 M H₂SO₄ solüsyonu hazırlandı.

2.2. Metot

2.2.1. Antijenin Hazırlanması

Antijen, Singh vd. (2007a) tarafından bildirilen yöntemle göre hazırlandı. Kısaca *M. avium* subsp. *paratuberculosis* suşundan mycobactin J ve ANV supplementli Herrold's Egg Yolk Agar besiyerinde ekim yapıldı (Şekil 2.8). Besiyeri 37 °C'de aerobik koşullarda 2-3

ay inkubasyona bırakıldı. Üreme olan besiyerinden preparat hazırlandı ve Ziehl-Neelsen boyama yapılarak mikroskopta incelendi.



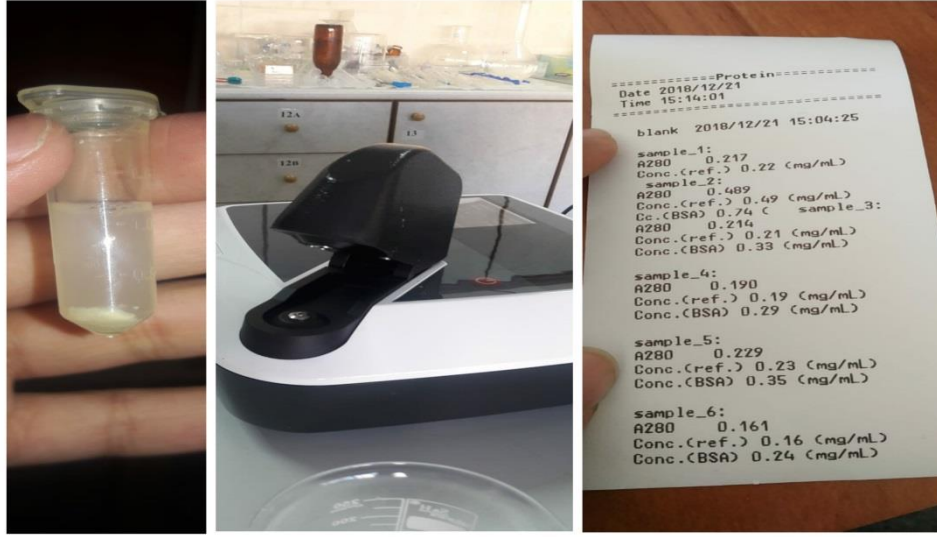
Şekil 2.8. Bakterinin Herrold's Egg Yolk Agar besiyerine ekimi

Besiyerindeki kolonilerden steril FTS (Fizyolojik Tuzlu Su) ile süspansiyon hazırlandı ve benmaride 72 °C'de 2 saat tutularak inaktivasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra 10.000 g'de 20 dakika santrifüj işlemi uygulanarak pelet elde edildi. Pelet 0.01 M PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7.2) ile 3 kez yıkandı. Pelet 1 ml'de 0.2 g ıslak hücre ağırlığı olacak şekilde steril FTS içerisinde süspanse edildi. Daha sonra 100 W ve 30 saniye süreli 20 siklus ve her siklus arasında 30 saniye bekleme süresi uygulanarak ultrasonik homojenizatörde (Bandelin) sonikasyon işlemi gerçekleştirildi (Şekil 2.9). Sonikasyon ürünü 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant 1 ml miktarında ependorf tüplere taksim edildi ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.



Şekil 2.9. Antijen elde etme işlemi

Süpernatantın 1 ml'sindeki protein miktarı NanoDrop (MaestroGen, Las Vegas, NV, USA) cihazı ile ölçüldü (Dunn 1992). Protein miktarı yaklaşık 0.2 mg/ml olarak saptandı (Şekil 2. 10). Antijen olarak kullanabilmek için protein konsantrasyonunun 50 µl hacimde 1-10 µg/ml olması gerektiği gözönüne alınarak antijenin sulandırılabilceği belirlendi.

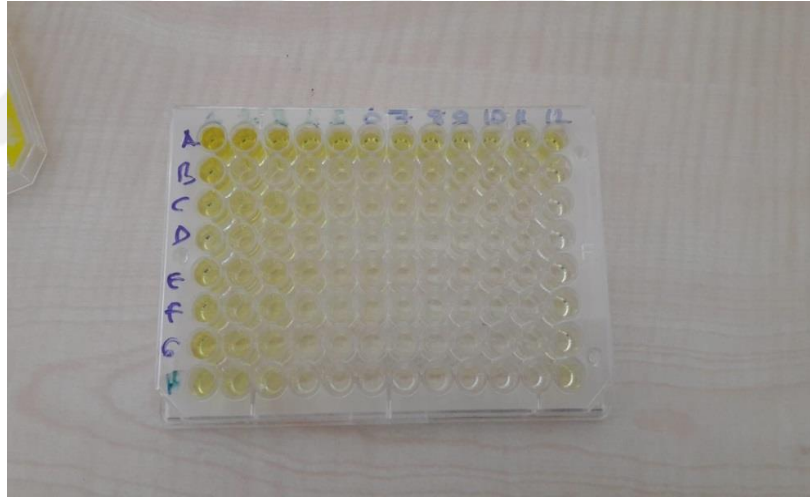


Şekil 2.10. Protein miktarının Nanodrop cihazında saptanması

2.2.2 Antijen ve Serum Sulandırılmalarının Optimize Edilmesi

Antijen checker-board yöntemiyle titre edildi (Singh vd., 2007b; Crowther, 2009). Antijen ELISA pleytinin (greiner bio-one, f-bottom) 1. sütunundan itibaren 2 katlı olarak sulandırıldı. Bunun için antijen karbonat-bikarbonat çözeltisi (pH:9,6) içerisinde 1/20 oranında sulandırıldı. Pleytin tüm kuyucuklarına 100 µl karbonat-bikarbonat çözeltisi kondu. Pleytinin ilk sütundaki kuyucuklara (A-H) 100'er µl sulandırılan antijenden eklendi. Çok kanallı mikropipet ile ilk sütundan 100 µl antijen alınıp 11. sütuna kadar katlı olarak (1/20, 1/40.....1/20480) sulandırıldı. 12.sütun boş bırakıldı. Pleytler antijenin kaplanması için +4 °C'de bir gece bekletildi. Daha sonra PBST ile 4 kez yıkandı. Antijen yapışmayan yüzeylerin bloklanması için %'3 lük BSA ve %'3 lük yağsız süt tozu olmak üzere 2 farklı farklı madde denendi. Bloklama solüsyonundan pleytin tüm gözlerine 200'er µl eklendi ve 37 °C'de 1 saat inkube edildi. Daha sonra PBST ile 4 kez yıkama işlemi yapıldı. Pleytin tüm kuyucuklarına 100'er µl % 1 BSA içeren PBST eklendi. Pozitif serumun % 1 BSA içeren PBST içerisinde 1/20 dilusyonu hazırlandı ve pleytin A

sırasındaki tüm kuyucuklarına (1-12) 100'er µl kondu. Serum A sırasından G sırasına kadar 2 katlı (1/20, 1/40.....1280) olarak sulandırıldı. H sırası boş bırakıldı. Pleytler 37 °C'de 2 saat inkube edildi. PBST ile 4 kez yıkama işleminden sonra 1:20000 oranında dilüe edilen peroksidaz ile işaretli rabbit anti-bovine IgG konjugatından (Whole Molecule, Sigma) tüm kuyucuklara 100'er µl eklendi. Pleytler 37 °C'de 1 saat inkube edildikten sonra 4 kez PBST ile yıkandı. Daha sonra TMB substratından tüm kuyucuklara 200 µl eklendi ve oda ısısında karanlık bir ortamda 20 dakika inkube edildi. Bu süre sonunda reaksiyonu durdurmak için 0.5 M H₂SO₄'den tüm kuyucuklara 100'er µl ilave edildi ve ELISA okuyucuda 450 nm'de absorbans okundu (Şekil 2.11). Antijen 1/20 oranında sulandırıldığında ELISA pleytinin ilk kuyucuklarında 1 µg antijen bulunmaktadır. Her sulandırma basamağında elde edilen O.D değerleri değerlendirildiğinde, en uygun antijen konsantrasyonu 0.125 µg/kuyucuk olarak belirlendi. BSA içermeyen bloklama çözeltisi ile daha düşük background değerleri elde edildiği için bolklama çözeltisi olarak %' 3'lük süt tozunun kullanılmasına karar verildi.

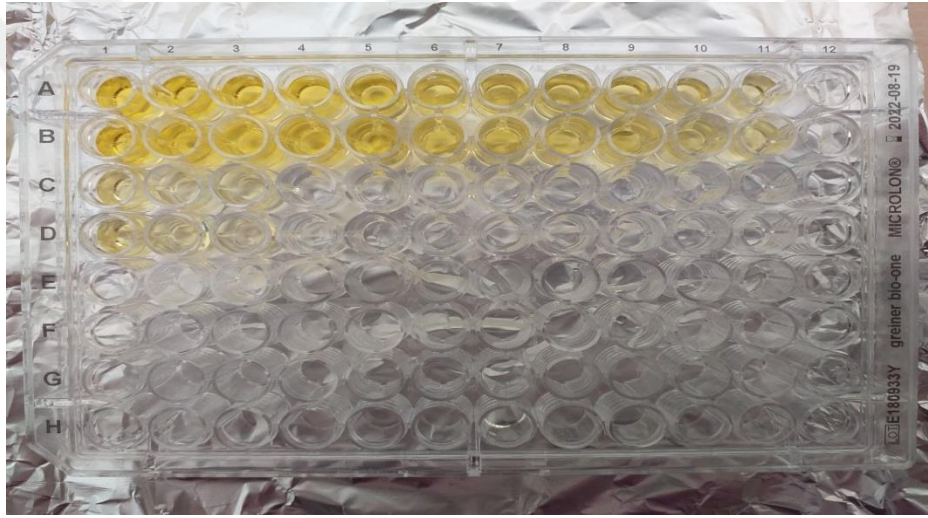


Şekil 2.11. Antijen titrasyonu

2.2.3. Pozitif ve Negatif Kontrol Serumların Nokta Titrasyon Değerlerinin Belirlenmesi

ELISA pleytinin ilk iki sırası (A1-A12, B1-B12) pozitif serum titrasyonu için, üç ve dördüncü sırası (C1-C12, D1-D12) negatif serum titrasyonu için kullanıldı. Bu sıralardaki kuyucuklar antijen (Her kuyucuk için 0.125 µg) ile kaplandı ve % 3 'lük süt tozu ile bloklama işlemi ve ardından yıkama işlemleri yapıldı. Pozitif ve negatif kontrol serumların %1 BSA içeren PBST ile 1/20, 1/30, 1/40, 1/60, 1/80, 1/120, 1/160, 1/240, 1/320, 1/480

1/640 olarak dilüsyonları hazırlandı. Pozitif serum için A12, B12 ve negatif serum için C12, D12 kuyucukları boş bırakıldı. Bu dilüsyonlardan 100'er µl olacak şekilde yukarıda belirtilen kuyucuklara aktarıldı. 37 °C'de 2 saat inkubasyondan sonra yıkama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra 1/20000 oranında dilue edilen konjugattan kuyucuklara 100 µl eklendi. Pleytler 37 °C'de 1 saat inkube edildikten sonra 4 kez PBST ile yıkandı. Daha sonra TMB substratından kuyucuklara 200 µl eklendi oda ısısında karanlık bir ortamda 20 dakika inkube edildi. Bu süre sonunda reaksiyonu durdurmak için 0.5 M H₂SO₄'den tüm kuyucuklara 100'er µl ilave edildi ve ELISA okuyucuda 450 nm'de absorbans okundu (Tablo 2.2). Pozitif ve negatif serumların titrasyonu sonucunda 1/60 oranında sulandırmanın uygun olduğu belirlendi (Şekil 2.12).



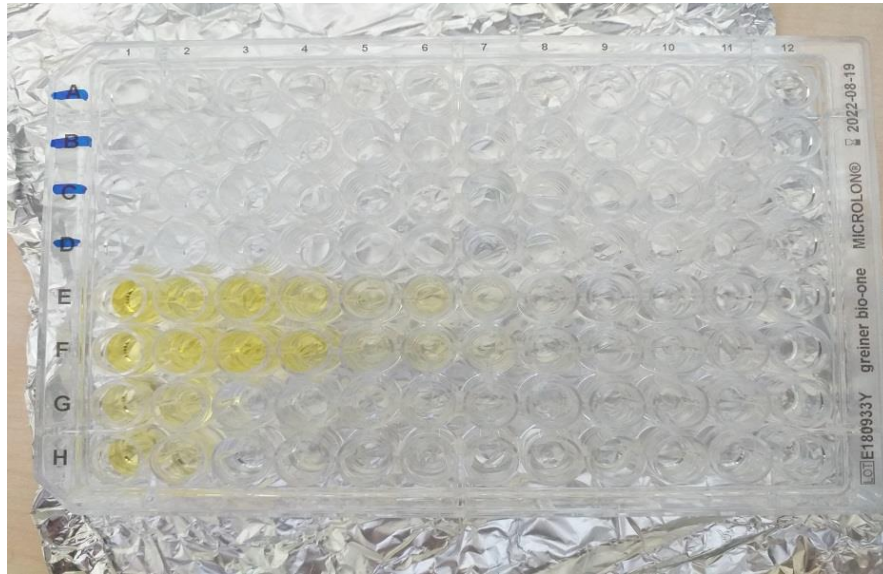
Şekil 2.12. Antijen sabit tutularak pozitif ve negatif kontrol serumların titrasyonu (A ve B sırası pozitif serumlar, C ve D sırası negatif serumlar)

Tablo 2.2. Serum titrasyonu sonucu ölçülen optik dansiteler

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sulandırma oranları	1/20	1/30	1/40	1/60	1/80	1/120	1/160	1/240	1/320	1/480	1/640	
A	1,613	1,596	1,511	1,497	1,111	0,960	0,858	0,776	0,662	0,410	0,342	
B	1,601	1,573	1,505	1,469	1,103	0,958	0,851	0,769	0,703	0,537	0,388	
C	0,390	0,207	0,240	0,097	0,052	0,045	0,050	0,048	0,038	0,043	0,043	
D	0,446	0,296	0,196	0,094	0,045	0,044	0,047	0,048	0,039	0,041	0,043	

2.2.4. Konjugatın titrasyonu

ELISA pleytinin E, F, G ve H sıralarındaki kuyucuklar 0.125 µg antijen ile kaplandı. Daha sonra kuyucuklara 200 µl % 3'lük yağsız süt tozu ilave edilerek bloklama işlemi yapıldıktan sonra yıkama işlemleri gerçekleştirildi. E ve F sırasındaki kuyucuklara 1/60 oranında sulandırılan pozitif serum, G ve H sırasındaki kuyucuklara 1/60 oranında sulandırılan negatif serumdan 100'er µl eklendi. 12. sütundaki kuyucuklar boş bırakıldı. Pleytler 37 °C'de 2 saat inkubasyona bırakıldı ve daha önce belirtilen şekilde yıkama işlemleri uygulandı. Konjugat ependorf tüplerde 1/5000, 10000.....1/10240000 olacak şekilde 2 katlı olarak sulandırıldı. Kuyucuklara küçük sulandırmadan büyüğe doğru 100'er µl konjugat eklendi. Pleytler 37 °C'de 1 saat inkube edildikten sonra 4 kez PBST ile yıkandı. TMB substratından kuyucuklara 200 µl eklendi ve oda ısısında karanlık bir ortamda 20 dakika inkube edildi. Bu süre sonunda reaksiyonu durdurmak için 0.5 M H₂SO₄'den tüm kuyucuklara 100'er µl ilave edildi ve ELISA okuyucuda 450 nm'de absorbans okundu. En uygun konjugat dilusyonunun 1/20000 olduğu belirlendi (Şekil 2.13, Tablo 2.3).



Şekil 2.13. Konjugat titrasyonu sonucu mikropleyttteki renk değişimi

Tablo 2.3. Konjugat titrasyonu sonucu ölçülen optik dansiteler

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sulan- dırma Oranı ($\times 10^3$)	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/ 1280	1/ 2560	1/ 5120	1/ 10240
E	1,612	1,571	1,471	1,198	0,862	0,521	0,341	0,256	0,112	0,065	0,057	0,050
F	1,601	1,548	1,463	1,121	0,725	0,501	0,301	0,242	0,123	0,068	0,058	0,049
G	0,390	0,207	0,067	0,053	0,052	0,045	0,050	0,048	0,038	0,043	0,043	0,041
H	0,446	0,296	0,059	0,052	0,045	0,044	0,047	0,048	0,039	0,041	0,043	0,040

2.2.5. Hayvan Kan Serumı Örneklerinin ELISA ile İncelenmesi

ELISA testi Singh vd. (2008) tarafından bildirilen yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak uygulandı. Bir ELISA pleytine yetecek antijen miktarını hazırlamak için 62.5 μ l antijen 10 ml karbonat-bikarbonat buffer (pH 9.6) içerisinde sulandırıldı. ELISA pleytinin tüm kuyucuklarına 100 μ l sulandırılmış antijen (Her kuyucuğa 0.125 μ g antijen) kondu ve +4 $^{\circ}$ C’de bir gece bekletildi. Daha sonra pleytler PBST (PBS+ % 0.005 Tween-20) ile 4 kez yıkandı. Kuyucukların kaplanmamış alanlarını bloklamak için her kuyucuğa PBS içerisinde hazırlanmış % 3’lük süt tozundan 200 μ l kondu ve 37 $^{\circ}$ C’de 1 saat bekletildi. İnkubasyondan sonra pleytler PBST ile 4 kez yıkandı. Kros reaksiyon veren antikörleri gidermek amacıyla *Mycobacterium phlei* içeren sulandırma sıvısı ile başka bir pleytte serumlar 1/60 oranında sulandırıldı. ELISA pleytinin A1 ve B1 kuyucuklarına pozitif serum, C1 ve D1 kuyucuklarına negatif serum ve her bir serum örneği için iki kuyucuk olmak üzere diğer kuyucuklara hayvan kan serumu sulandırma örneklerinden 100’er μ l eklendi. Pleytler 37 $^{\circ}$ C’de 2 saat bekletildi ve PBST ile 4 kez yıkandı. Peroksidaz ile işaretli rabbit anti-bovine IgG konjugatı (Whole Molecule, Sigma) PBS ile 1/20.000 oranında sulandırıldı ve tüm kuyucuklara 200 μ l konularak 37 $^{\circ}$ C’de 2 saat bekletildi. Tekrar pleytler PBST ile 4 kez yıkandı. Daha sonra tüm kuyucuklara 100 μ l miktarında TMB substratı eklendi ve 20 dakika karanlık bir alanda bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için kuyucuklara 100 μ l 0.5 M H₂SO₄ kondu ve absorbans değerleri ELISA okuyucuda (Biotek) 450 nm’de okundu. Pozitif ve negatif kontrollerin optik dansite (OD) değerleri kullanılarak aşağıdaki formüle göre OD değerleri S/P (Sample to Positive) oranına

dönüştürüldü. S/P oranı 0.00-0.09 olan örnekler negatif, 0.10-0.24 olan örnekler şüpheli, 0.25-0.39 olanlar düşük pozitif, 0.40-0.99 olanlar pozitif ve 1.0-10.00 olanlar güçlü pozitif olarak değerlendirildi (Collins, 2002; Singh vd., 2008).

$$S/P \text{ oranı} = \frac{\text{Örnek OD} - \text{negatif kontrol OD}}{\text{pozitif kontrol OD} - \text{negatif kontrol OD}}$$

2.2.6. Laboratuvar Yapımı ELISA ve Ticari ELISA Kitinin Karşılaştırılması

Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsünde ticari ELISA kiti (IDEXX) sonuçlarına göre 50 negatif ve 20 pozitif bulunan serum ayrıca hazırladığımız kit ile incelendi. Ticari ELISA kitine göre hazırlanan kitin sensitivite ve spesifitesi hesaplandı.

2.2.7. İstatistiksel Analiz

Hayvan yaşı ve ırkına göre pozitiflik oranları arasındaki ilişki IBM SPSS Statistics 22 programında Ki Kare testi ile hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1. Kültür ve Bakteriyoskopi Sonuçları

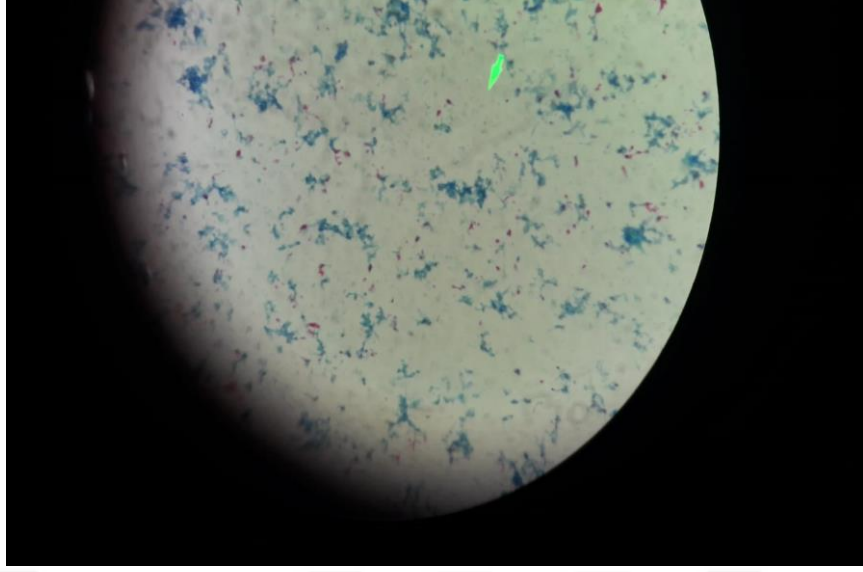
M. avium subsp. *paratuberculosis* suşundan Herrold's Egg Yolk Agar besiyerine yapılan ekimden yaklaşık 2 ay sonra gözle görülebilir koloniler şekillendi (Şekil 3.1). Besiyerinden hazırlanan preparatların Ziehl-Neelsen yöntemiyle (Şekil 3.2) boyanarak incelenmesi sonucunda kırmızı renkte küçük basiller görüldü (Şekil 3.3).



Şekil 3.1. Herrold's Egg Yolk Agar besiyerinde görülen reme (A reme ncesi, B reme sonrası)



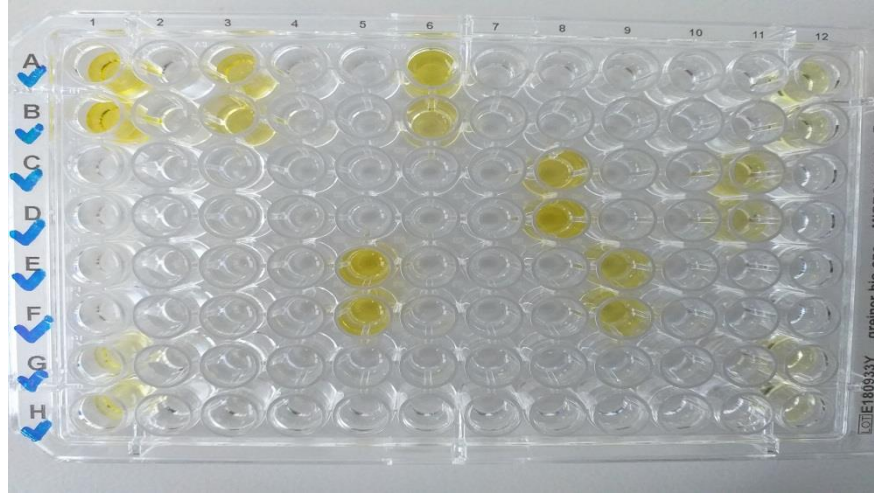
Şekil 3.2. Ziehl-Neelsen boyama işlemi



Şekil 3.3. Ziehl-Neelsen boyama sonucu elde edilen mikroskop görüntüsü

3.2. ELISA Sonuçları

Test edilen serum örneklerinin optik dansitelerinin aritmetik ortalamaları alınarak her bir serumun S/P oranı hesaplandı. Bu hesaplamaya göre incelenen 150 serumun 15'i (%10) pozitif, 4'ü (%2.66) düşük pozitif, 3'ü (%2) şüpheli ve 128'i (% 85. 33) negatif bulundu (Şekil 3.4, Tablo 3.1, Tablo 3.2, Tablo 3.3 ve Tablo 3.4).



Şekil 3.4. Kan serumu örneklerinin ELISA sonuçları (A1-B1 kuyucukları pozitif kontrol, C1-D1 kuyucukları negatif kontrol ve diğer kuyucuklar örnekler için kullanıldı)

Tablo 3.1. Şekil 3.4’de belirtilen örneklerin optik dansite sonuçları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,503	0,112	1,014	0,090	0,166	1,298	0,095	0,186	0,110	0,160	0,174	0,564
B	1,511	0,114	1,1030	0,094	0,164	1,304	0,075	0,180	0,112	0,172	0,180	0,584
C	0,101	0,118	0,124	0,088	0,185	0,180	0,186	1,366	0,166	0,156	1,002	0,090
D	0,102	0,116	0,120	0,086	0,195	0,160	0,176	1,386	0,176	0,166	0,996	0,086
E	0,244	0,122	0,120	0,126	1,187	0,106	0,161	0,112	1,402	0,171	0,102	0,094
F	0,213	0,126	0,110	0,120	1,206	0,090	0,165	0,118	1,426	0,177	0,094	0,096
G	0,465	0,128	0,108	0,181	0,090	0,163	0,176	0,183	0,118	0,163	0,161	0,390
H	0,441	0,114	0,104	0,187	0,080	0,173	0,170	0,189	0,126	0,169	0,171	0,486



Tablo 3.2. Serumların optik dansiteleri ve hesaplanan S/P değerleri

Örnek no	O.D (1)	O.D (2)	O.D'lerin Aritmetik Ortalaması	Hesaplanan S/P oranı
1	0,112	0,114	0,113	0
2	0,355	0,341	0,348	0,02
3	0,564	0,584	0,574	0,2
4	0,118	0,116	0,117	0
5	0,122	0,126	0,124	0
6	0,128	0,114	0,121	0
7	0,124	0,120	0,122	0
8	0,120	0,11	0,115	0
9	0,108	0,104	0,106	0
10	1,187	1,206	1,197	0,7
11	0,094	0,090	0,092	0
12	0,088	0,086	0,085	0
13	0,126	0,0120	0,126	0
14	0,181	0,187	0,184	0
15	0,166	0,164	0,165	0
16	0,185	0,195	0,190	0
17	0,090	0,080	0,085	0
18	0,180	0,160	0,170	0
19	0,106	0,090	0,098	0
20	1,298	1,304	1,300	0,8
21	0,163	0,193	0,168	0
22	0,095	0,075	0,085	0
23	0,186	0,176	0,181	0
24	0,161	0,165	0,163	0
25	0,176	0,170	0,173	0
26	0,186	0,180	0,183	0
27	0,112	0,118	0,115	0
28	0,183	0,189	0,186	0
29	0,110	0,112	0,110	0
30	1,014	1,103	1,058	0,62
31	0,166	0,176	0,171	0
32	1,402	1,426	1,414	0,92
33	0,390	0,486	0,438	0,1
34	1,366	1,386	1,376	0,88

Tablo 3.2'nin devamı

Örnek no	O.D (1)	O.D (2)	O.D'lerin Aritmetik Ortalaması	Hesaplanan S/P oranı
35	0,118	0,126	0,122	0
36	0,160	0,172	0,166	0
37	0,156	0,166	0,161	0
38	0,171	0,177	0,174	0
39	0,163	0,169	0,166	0
40	0,174	0,180	0,177	0
41	0,102	0,094	0,098	0
42	0,131	0,171	0,166	0
43	0,090	0,086	0,088	0
44	0,094	0,096	0,095	0
45	0,074	0,082	0,078	0
46	0,112	0,115	0,113	0
47	0,142	0,149	0,1455	0
48	0,824	0,856	0,840	0,43
49	0,121	0,131	0,126	0
50	0,132	0,149	0,1405	0
51	0,668	0,810	0,689	0,31
52	0,128	0,147	0,137	0
53	0,110	0,115	0,1125	0
54	0,116	0,131	0,1235	0
55	0,108	0,115	0,1155	0
56	0,132	0,125	0,128	0
57	0,338	0,351	0,1755	0
58	0,112	0,144	0,128	0
59	0,104	0,120	0,112	0
60	0,122	0,136	0,129	0
61	0,138	0,141	0,1395	0
62	1,002	0,996	0,999	0,56
63	0,134	0,142	0,138	0
64	0,110	0,131	0,1205	0
65	0,138	0,143	0,1405	0
66	0,126	0,131	0,1285	0
67	0,116	0,132	0,124	0
68	1,264	1,289	1,276	0,80

Tablo 3.2'nin devamı

Örnek no	O.D (1)	O.D (2)	O.D'lerin Aritmetik Ortalaması	Hesaplanan S/P oranı
69	0,474	0,481	0,477	0,13
70	0,152	0,131	0,1415	0
71	0,106	0,111	0,1085	0
72	0,080	0,092	0,086	0
73	0,814	0,851	0,832	0,43
74	0,170	0,181	0,1755	0
75	0,614	0,621	0,6175	0,25
76	0,120	0,135	0,1275	0
77	0,828	0,881	0,8545	0,45
78	0,128	0,136	0,132	0
79	0,816	0,851	0,8335	0,43
80	0,145	0,152	0,1485	0
81	0,142	0,151	0,1465	0
82	0,152	0,154	0,153	0
69	0,474	0,481	0,477	0,13
70	0,152	0,131	0,1415	0
71	0,106	0,111	0,1085	0
72	0,080	0,092	0,086	0
73	0,814	0,851	0,832	0,43
74	0,170	0,181	0,1755	0
75	0,614	0,621	0,6175	0,25
76	0,120	0,135	0,1275	0
77	0,828	0,881	0,8545	0,45
78	0,128	0,136	0,132	0
79	0,816	0,851	0,8335	0,43
80	0,145	0,152	0,1485	0
81	0,142	0,151	0,1465	0
82	0,152	0,154	0,153	0
83	0,185	0,174	0,1795	0
84	0,752	0,798	0,775	0,37
85	0,110	0,118	0,114	0
86	0,118	0,128	0,123	0
87	0,130	0,148	0,139	0
88	0,122	0,138	0,130	0

Tablo 3.2'nin devamı

Örnek no	O.D (1)	O.D (2)	O.D'lerin Aritmetik Ortalaması	Hesaplanan S/P oranı
89	0,112	0,130	0,121	0
90	0,120	0,135	0,1275	0
91	0,158	0,175	0,1665	0
92	0,112	0,121	0,1165	0
93	0,113	0,125	0,119	0
94	0,920	0,987	0,9535	0,53
95	0,126	0,115	0,1205	0
96	0,380	0,408	0,394	0,05
97	0,110	0,121	0,1155	0
98	0,112	0,123	0,1175	0
99	1,268	1,259	1,2635	0,8
100	0,130	0,142	0,136	0
101	0,118	0,120	0,119	0
102	0,120	0,126	0,123	0
103	0,136	0,128	0,131	0
104	0,137	0,142	0,1395	0
105	1,068	0,989	1,028	0,59
106	0,118	0,123	0,1205	0
107	0,120	0,128	0,124	0
108	0,112	0,123	0,1175	0
109	0,129	0,131	0,130	0
110	0,134	0,142	0,138	0
111	0,149	0,156	0,152	0
112	0,151	0,132	0,1415	0
113	0,141	0,154	0,1475	0
114	0,152	0,149	0,1505	0
115	0,163	0,159	0,161	0
116	0,110	0,118	0,114	0
117	0,190	0,201	0,1955	0
118	0,121	0,132	0,1265	0
119	0,110	0,113	0,1115	0
120	0,121	0,131	0,126	0
121	0,954	1,001	0,977	0,55
122	0,131	0,133	0,132	0

Tablo 3.2'nin devamı

Örnek no	O.D (1)	O.D (2)	O.D'lerin Aritmetik Ortalaması	Hesaplanan S/P oranı
123	0,141	0,155	0,148	0
124	0,126	0,128	0,127	0
125	0,754	0,803	0,778	0,38
126	0,115	0,121	0,118	0
127	0,118	0,123	0,1205	0
128	0,126	0,129	0,1275	0
129	0,134	0,152	0,143	0
130	0,116	0,127	0,1215	0
131	0,128	0,132	0,130	0
132	0,184	0,194	0,189	0
133	0,168	0,176	0,172	0
134	0,105	0,114	0,1095	0
135	0,107	0,114	0,110	0
136	0,108	0,120	0,114	0
137	0,121	0,129	0,125	0
138	0,131	0,143	0,137	0
139	0,135	0,142	0,1385	0
140	0,142	0,152	0,147	0
141	0,128	0,132	0,130	0
142	0,184	0,194	0,189	0
143	0,168	0,176	0,172	0
144	0,105	0,114	0,1095	0
145	0,107	0,114	0,110	0
146	0,108	0,120	0,114	0
147	0,121	0,129	0,125	0
148	0,131	0,143	0,137	0
149	0,135	0,142	0,1385	0
150	0,142	0,152	0,147	0

Tablo 3.3. Serumların S/P oranına göre dağılımı

S/P dağılımı	Örnek Sayısı
Negatif (0,00-0,09)	128 (%85.33)
Şüpheli (0,10-0,24)	3 (%2)
Düşük pozitif (0,25-0,39)	4 (%2.66)
Pozitif (0.40-0.99)	15 (%10)

3.3. Laboratuvar Yapımı ve Ticari ELISA(IDEXX) ELISA ile İşlenen Serum Örneklerinin Sonuçları

Ticari kit ile pozitif bulunan 20 serumun 19'u laboratuvar yapımı ELISA kiti ile pozitif, ticari kit ile negatif bulunan 50 serumun 48'i laboratuvar yapımı ELISA kiti ile negatif bulundu. Laboratuvar yapımı ELISA kitinin sensitivitesi % 95 ve spesifitesi % 96 olarak hesaplandı (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Laboratuvar yapımı ve ticari ELISA kitinin karşılaştırılması

	Laboratuvar Yapımı Kit	Ticari Kit
Pozitif sayısı	19	20
Negatif sayısı	48	50

Hayvanların yaşına göre pozitiflik oranları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. Fakat hayvan ırkına göre pozitiflik oranları arasındaki farklılık önemli bulunmamıştır ($p>0.05$).

4. TARTIŞMA

Sığır paratüberkülozu tüm dünyada görülen, ishal, kaşeksi ve bazen ölümlere yol açabilen bir hastalıktır. Hastalığın teşhisi çoğunlukla kültür, PZR ve serolojik testler kullanılarak yapılır. Teşhiste kullanılan testlerin sensitivite ve spesifiteleri hastalığın evresine göre değişebilir (Gilardoni vd., 2012). Her testin avantajı ve dezavantajları vardır. Fekal kültür altın standart test olarak kabul edilmektedir. Kültür yönteminin yanlış pozitif sonuç vermeyen (% 100 spesifite) tek test olduğu bildirilmiştir (Nielsen ve Toft, 2008). Fakat kültür, özel besiyerleri gerektiren, iş gücü fazla olan, uzun zaman alan ve pahalı bir yöntemdir. Ayrıca hastalığın başlangıç dönemlerinde kültür ile bazen teşhisin yapılamayabileceği bildirilmiştir (Ayele vd., 2001; OIE, 2013). Fekal kültür hastalığın ilerlemiş evrelerinde hasta hayvanların çoğunu tespit edebilmektedir (Nielsen ve Toft, 2008). PZR'nin saf kültürden etken izolasyonu için kullanıldığı zaman spesifik olduğu, ancak klinik örnekler ile çalışıldığında inhibitör maddelerin problemlere yol açtığı, kontaminasyona bağlı olarak yanlış pozitif sonuç ve inhibitör maddeler nedeniyle de yanlış negatif sonuçların alınabileceği bildirilmiştir (Çetinkaya vd., 2000). PZR testinin spesifitesinin yüksek olduğu (yaklaşık % 90) ve kısa sürede sonuç verdiği, fakat sensitivitesinin düşük olduğu (yaklaşık % 53) ve canlı ve ölü bakterileri ayırt edemediği rapor edilmiştir (Kalis vd., 1999).

Serolojik teşhis, etkene spesifik antikorların ELISA, AGID ve CF gibi testler ile tespit edilmesi esasına dayanmaktadır. Paratüberküloz hastalığının serolojik teşhisinde en yaygın kullanılan test ELISA'dır. (Nielsen ve Toft, 2008; Gilardoni vd., 2012). Günümüzde çeşitli firmalar tarafından ticari ELISA kitleri üretilmektedir (OIE, 2013). Birçok ülkede yapılan epidemiyolojik çalışmalarda ELISA testi kullanılarak paratüberkülozun yaygınlığı araştırılmıştır. Avrupa ülkelerinde sığırlarda prevalansın, bazı ülkelerde en az % 3-5 olmak üzere genellikle yaklaşık % 20, sürü prevalansının ise % 50'nin üzerinde olduğunu rapor edilmiştir (Nielsen ve Toft, 2008). Hindistan'da ELISA ile deri testi karşılaştırılmış ve klinik olarak sağlıklı 191 hayvanın 57'si (%29.8) deri testi ile ve 72'si (%37.7) ELISA ile pozitif bulunmuştur (Bhutediya vd., 2017). ELISA ile yapılan çalışmalarda seroprevalansın, Avustralya'da % 2.31 (Gurung vd., 2018), Çin'de % 4.8 (Liu vd., 2017), İngiltere'de % 7.1 (Woodbine vd., 2009), İspanya'da % 4.03 (Diéguez vd.,

2007), İrlanda'da % 21.4 (Good vd., 2009). Avusturya'da % 19 (Dreier vd., 2006) olduğu bildirilmiştir. ELISA testi ile yapılan bir çalışmada, Türkiye genelinde sığırlarda paratüberkülozun prevalansı % 4.6 olarak açıklanmıştır (Atala ve Akçay, 2001). Kars ilinde sığırlarda bireysel prevalansın % 3.5 ve sürü prevalansının % 41.6 olduğu bildirilmiştir (Makav ve Gökçe, 2013). Ticari ELISA kitleri ile yapılan diğer çalışmalarda seroprevalansın, Burdur'da % 8 (Çelik, 2015), Afyon ve civarında % 31.8 (Borum vd., 2014), Kırklareli yöresinde % 1.5 (Karakaş ve Civelek, 2018) ve Manisa'da % 21.72 (Berberoğlu ve Civelek, 2016) olduğu rapor edilmiştir. Kayseri ilinde yapılan bir çalışmada ticari ELISA kiti ile kronik ishalli 2 yaşın üstündeki 147 sütçü sığırdan alınan kan serumu örneklerinin % 12'si pozitif bulunmuştur (Gümüşsoy vd., 2015). Orta karadeniz bölgesinde yapılan bir çalışmada ise ticari ELISA kiti ile kronik ishalli 2 yaşın üzerindeki 859 sütçü sığırın % 10'u pozitif olarak tespit edilmiştir (Tütüncü vd., 2018). Yapılan bu çalışmada, laboratuvar yapımı ELISA kiti ile görünürde sağlıklı 150 hayvandan alınan kan serumu örneklerinin 15'i (%10) pozitif, 4'ü (%2.66) düşük pozitif, 3'ü (%2) şüpheli ve 128'i (% 85. 33) negatif olarak tespit edilmiştir. Tespit edilen pozitiflik oranı yukarıda belirtilen çalışmaların bazılarında yüksek (Atala ve Akçay, 2001; Diéguez vd., 2007; Woodbine vd., 2009; Liu vd., 2017; Gurung vd., 2018; Karakaş ve Civelek, 2018), bazılarında düşük (Dreier vd., 2006; Good vd., 2009; Borum vd., 2014; Berberoğlu ve Civelek, 2016; Bhutediya vd., 2017) ve bazılarına yakın (Gümüşsoy vd., 2015; Çelik, 2015; Tütüncü vd., 2018) bulunmuştur. Seroprevalans oranlarındaki farklılıklar coğrafik durum, iklim, besleme ve yetiştirme koşulları, aşılama durumu ve çiftliklerdeki hayvan sayılarının farklı olmasından kaynaklanabilir. Bununla birlikte prevalans sonuçlarının örnekleme yöntemine, üzerinde çalışılan popülasyona ve kullanılan teşhis metoduna göre değişebileceği bildirilmiştir (Nielsen ve Toft 2009). Sürü büyüklüğü artışına bağlı olarak seropozitiflik oranının da arttığı rapor edilmiştir (Woodbine vd., 2009; Dieguez vd., 2009; Öztürk vd., 2010). Woodbine vd. (2009), 100 veya daha fazla sığırın bulunduğu sürülerde prevalansın daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ozturk vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada hastalığın seroprevalansı, 20 başın altında sığır bulunan sürülerde % 20, 21-40 sığır bulunan sürülerde % 50, 41-60 sığır bulunan sürülerde % 7.4, 61-80 sığır bulunan sürülerde % 66.7 ve 81 veya üstü sayıda sığır bulunan sürülerde ise % 100 olarak saptanmıştır. Hastalığın prevalansı yetiştirme tipine göre de değişebilmektedir. Dieguez vd. (2007) İspanya'da yaptıkları bir çalışmada, sürü prevalansının sütçü sürülerde % 10.69, etçi sürülerde % 0, karışık sürülerde ise % 2.71 olduğunu bildirmişlerdir. Good vd. (2009)

tarafından İrlanda’da yapılan bir çalışmada, sütçü sığır sürülerinde prevalans % 31.5 ve etçi sürülerde % 17.9 olarak tespit edilmiştir.

Whitlock vd. (2000), ticari ELISA kitlerinin sensitivitesinin fekal saçılımın düşük olduğu hayvanlar için % 9-32 arasında ve fekal saçılımın normal olduğu hayvanlar için % 47-63 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Antikorları tespit etmede ELISA’nın duyarlılığı hastalığın sessiz evresinde % 7, subklinik evrede % 15 ve klinik evrede % 95-98 arasındadır (Ayele vd., 2001; Nielsen ve Toft, 2008; Gilardoni vd., 2012). Shin vd. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, ELISA’nın sensitivitesi % 74 ve spesifitesi % 99 olarak bulunmuştur. Rouhollah vd. (2016). ELISA’nın sensitivitesini % 86 ve spesifitesini % 99 olarak tespit etmişlerdir. Etkene spesifik antikorlar gelişmediği için ELISA’nın 2 yaşından küçük enfekte hayvanları saptayamadığı bildirilmiştir (Coelho vd, 2007). Dışkı ile etken saçılmadan önce vücutta oluşan antikorların ELISA ile tespit edildiği ve bu nedenle hastalığın erken teşhisinde ELISA’nın faydalı olduğu bildirilmiştir (Nielsen 2008). Bizim çalışmamızda hazırlanan ELISA kiti, ticari ELISA kitiyle karşılaştırıldığında sensitivite % 95 ve spesifite % 96 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda hayvanların ırkına göre pozitiflik oranları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamasına ($p>0.05$) karşın, yaşa göre pozitiflik oranları arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Yaşlı hayvanlarda pozitiflik oranının fazla olması üretilen antikor miktarının yaşa bağlı olarak artmasından kaynaklanabilir. Sığırların yaşı arttıkça ELISA ile hasta hayvanları tespit etme olasılığı da artmaktadır (Nielsen ve Toft, 2006). Makav ve Gökçe (2013), Kars ilinde paratüberkülozun prevalans oranını simental veya melezlerinde %3.20, montafon veya melezlerinde %3.68, yerli ırk veya melezlerinde %3.70 olarak tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar yaşa bağlı olarak prevalansın arttığını, yaşları ≥ 2 -<5, ≥ 5 -<7 ve ≥ 7 olarak gruplandırılan sığırlarda paratüberkülozun seroprevalansını sırasıyla %1.7, %3.8 ve %5.1 olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Çelik (2015) tarafından Burdur ilinde yapılan bir çalışmada, hayvanların yaşı arttıkça hastalığa daha fazla rastlandığı, en fazla pozitiflik oranının 5 yaş üstü hayvanlarda tespit edildiği ortaya konmuştur. Aynı araştırmacı sığırlarda hastalığın ırka göre dağılımını holştayn, simental ve karışık ırklarda sırasıyla % 8.3, % 0 ve % 0 olarak tespit etmiştir. Bizim çalışmamızda elde edilen bulgular yukarıda belirtilen çalışmaların (Makav ve Gökçe 2013; Çelik 2015) sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

ELISA testi standardizasyon çalışmalarında nonspesifik reaksiyonları ortadan kaldırmak için antijen, serum ve konjugatın titrelerinin belirlenmesi gerekir (Crowther, 2009). Singh vd. (2007b), keçi yavrularında paratüberkülozun seroprevalansını ELISA ile

tespit etmek amacıyla yaptıkları çalışmada, keçi orijinli MAP (S5) bison tip suşunu kullanarak antijen hazırlamışlar ve optimum antijen konsantrasyonunu her kuyucuk için 0.1 µg, ticari MAP sığır antijenini kullandıklarında ise her kuyucuk için 4 µg olarak tespit etmişlerdir. Singh vd. (2008) bufalo ve sığırlarda ELISA ile paratüberkülozun seroprevalansını araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada, antijenin miktarını her kuyucuk için 0.1 µg, serumun optimum konsantrasyonunu 1/50 ve konjugatın optimum konsantrasyonunu ise 1/8000 olarak tespit etmişlerdir. ELISA’da antijen olarak kullanabilmek için protein konsantrasyonunun 50 µl hacimde 1-10 µg/ml olması gerektiği bildirilmiştir (Crowther, 2009). Bizim çalışmamızda MAP’ın DSMZ 44133 suşu ile antijen hazırlama işleminden sonra protein miktarı yaklaşık 0.2 mg/ml olarak tespit edilmiştir. Tespit edilen protein miktarı Crowther (2009) tarafından bildirilen optimum orandan fazla olduğu için antijen dilue edilmiştir. Standardizasyon denemeleri sonucunda antijenin 0.125 µg/kuyucuk şeklinde hazırlanan dilüsyonunun, serumun 1/60 ve konjugatın 1/20000 dilüsyonunun ELISA testinde kullanılabileceği belirlenmiştir. Tespit edilen optimum antijen konsantrasyonu Singh vd. (2008) tarafından bildirilen orana yakın bulunmuştur.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, Elazığ ilinde herhangi bir klinik belirti göstermeyen sığırlarda paratüberkülozun önemli bir sorun olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışmanın sonuçları ülkemizde hastalığa karşı etkili kontrol stratejilerinin oluşturulmasına katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde;

- ❖ Ülkemizde paratüberkülozun yaygınlığını belirlemek için daha geniş kapsamlı epidemiyolojik çalışmalar yapılmalıdır.
- ❖ Seropozitif bulunan sürüler kültür ve PZR ile doğrulanmalıdır.
- ❖ Paratüberküloz hastalığı farklı evrelerde seyretmekte ve her evrede teşhis metotlarının sensitivite ve spesifitesi değişebilmektedir. Bu nedenle daha doğru sonuçlar elde edebilmek için teşhiste birden fazla metot birlikte kullanılmalıdır.
- ❖ Hastalığın kontrol altına alınması için hayvan sahipleri ve veteriner hekimler bilgilendirilmelidir
- ❖ Ekonomik kayıpları önlemek için kontrol ve eradikasyon programları titizlikle uygulanmalıdır.
- ❖ Dışa bağımlılığı azaltmak veya ortadan kaldırmak için yerli ELISA kitleri üretilmelidir.

6. KAYNAKLAR

Abbas, K.A., Lichtman AH. and Pober J.S., 1997. Quantitation of antigen. In: Cellular and Molecular Immunology, 3rd edition, Philadelphia: WB Saunders Company.

Ailsa, L.H. and Siew, C.N., 2015. Crohn's disease. *Medicine*, **43**, 282-290.

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

Alvarez, J., Dejuan, L. and Aranoz, A., 2005. A survey on paratuberculosis wildlife in Spain. In 8th international. Colloquium on paratuberculosis. Copenhagen, Denmark.

Andrews, A.H., 1992. Bovine Medicine: Blackwell Scientific Publication London.

Arda, M., Minbay, A., Leloğlu N., Aydın, N., Kahraman, M., Akay, Ö., Ilgaz, A., İzgür, M. ve Diker, K.S., 1997. Özel Mikrobiyoloji, Medisan Yayınevi, Ankara.

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

Ayele, W.Y., Machackova, M. and Pavlik I., 2001. The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Vet. Med-Czech.*, **46**, 205-224.

Babacan, F. 1996. İnfeksiyon Hastalıklarının immunoserolojisi. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M ed. İnfeksiyon Hastalıkları. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, **26**, 98- 99.

Bang, B., 1906. Chronische pseudotuberculöse darmentzündung beim Rind. *Berl.Münch Tierärztl Wochenschr*, **22**, 759-63.

Bassey, E.O., and Collins, M.T., 1997. Study of T lymphocyte subsets of healthy and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infected cattle. *Infect.Immun.*, **65**, 4869-4872.

Baumgartner, W. and Khol, J.L., 2006. Paratuberculosis (johne disease) in ruminants ongoing story. *Slow.Vet. Res.*, **43**, 5-10.

Berberoğlu, M. ve Civelek, T., 2016. Manisa yöresi süt sığırlarında subklinik paratüberkülozun seroprevalansı. *Kocatepe Vet. J.*, **9**, 194-199.

Bermudez, L.E., Petrofsky, M., Sommer, S. and Barletta, R.G., 2010. Peyer's patch-deficient mice demonstrate that *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* translocates across the mucosal barrier via both M cells and enterocytes but has inefficient dissemination. *Infect. Immun.*, **78**, 3570-3577.

Bhutediya, J.M., Dandapat, P., Chakrabarty, A., Das, R., Nanda, P.K. Bandyopadhyay, S. and Biswas, T.K., 2017. Prevalence of paratuberculosis in organized and unorganized dairy cattle herds in West Bengal, *India. Vet. World.*, **10**, 574-579.

Blood, D.C., Radostits, O.M. and Gay, C.C., 2000. Johnes Disease (Paratuberculosis) In: *Veterinary Medicine* 9th ed. Pp., Saunders, London.

Bolton, M.W., Grooms, D.L. and Kaneene, JB., 2005. Faecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in calves: implication for disease control and management. In: 8th International Colloquium on Paratuberculosis. **128**, Copenhagen, Denmark.

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

Bradner, L.K., 2013. Optimization of methods for culturing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine milk and colostrum and application to samples collected

from naturally infected dairy cows. Iowa State University, Graduate Theses and Dissertations, USA
Buenos Aires.

Chacon, O., Bermudez, L.E. and Barletta RG., 2004. Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annu. Rev. Microbiol.*, **58**: 329-363.

Civelek, T., 2017. Süt sığırlarında paratüberküloz. *Kocatepe Vet.J.*, **10**, 29-32.

Coelho, A.C, Pinto, M.L, Silva, S, Coelho, A.M, Rodrigues, J. and Juste, R.A., 2007. Seroprevalence of ovine paratuberculosis infection in the Northeast of Portugal. *Small Rum. Res.*, **71**, 298-303.

Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W., 1994. Antibody Detection and Preparation. In: Current Protocols in Immunology. Vol 1., New York: John Wiley & Sons.

Collins, D.M., Gabric, D.M. and de Lisle, G.W., 1989. Identification of a repetitive sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **60**, 175-178.

Collins, M.T. 2002. Interpretation of commercial bovine paratuberculosis enzyme-linked immunosorbent assay by using likelihood ratios. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **9**, 1367-1371.

Crowther, J.R., 2009. The ELISA Guidebook. Second Edition, Humana Press, Springer & Business Media, New York.

Çelik, A., 2015. Burdur ilinde sığır, koyun ve keçilerde paratüberküloz seroprevalansı. Yüksek Lisans Tezi, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Burdur.

Çetinkaya, B., Erdoğan, H.M., Morgah, K.L, 1997. Risk factors for bovine paratuberculosis. The multiple analysis of risk factors for bovine paratuberculosis. *Turk J.Vet.Anim.Sci.*, **21**,303-306.

Çetinkaya, B., Muz, A., Ertas, H.B., Öngör, H., Sezen, İ.Y. ve Gülcü, H.B., 2000. Süt ineklerinde paratüberküloz prevalansının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanması. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, **24**, 371-379.

Davis, W.C. and Madsen-Bouterse, S.A., 2012. Crohn's disease and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: The need for a study is long overdue. *Vet.Immunol. Immunopathol.*, **145**, 1-6.

Diéguez, F.J., Arnaiz, I., Sanjuan, M.J., Vilar, M.J., Lopez, M. and Yus E., 2007. Prevalence of serum antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in cattle in Galicia (northwest Spain). *Prev. Vet. Med.*, **82**, 321-326.

Diéguez, F.J., Gonzales, A.M., Menendez, S., Vilar, M.J., Sanjuan, M.L.,Yus, E. and Arnaiz, I., 2009. Evaluation of four commercial serum ELISA for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cows. *Vet. J.*, **180**: 231-235.

Donaghy, J.A., Rowe, M.T., Rademaker, J.L.W., Hammer, P., Herman, L., De Jonghe, V., Blanchard,B., Duhem, K. and Vindel, E., 2008. An inter-laboratory ring trial for the detection and isolation of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* from raw milk artificially contaminated with naturally infected faeces. *Food Microbiol.*, **25**, 128-135.

Dreier, S., Khol, J. L., Stein, B., Fuchs, K., Gütlér, S. and Baumgartner W. 2006. Serological, bacteriological and molecularbiological survey of paratuberculosis (Johne's Disease) in Austrian Cattle. *J. Vet. Med.*, **53**, 477-481.

Dunn, M.J., 1992. Protein determination of total protein concentration. In Protein prufication methods (ed. Harris ELV, Angal S), IRL Press, Oxford.

Fawzy, A., Zschöck, M. Ewers, C. and Eisenberg T., 2018. Genotyping methods and molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). *Int J. Vet. Sci. Med.*, **6**, 258-264.

Fecteau, M.E. and Whitlock R.H., 2010. Paratuberculosis in cattle. M.A. Behr, D.M. Collins (Eds.), Paratuberculosis: Organism, Disease, Control (1st), CABI, Wallingford, UK.

Florou, M., Leontides, L. and Billinis, C. 2005. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from non -ruminant wildlife in Greece. In: 8th International Colloquium on Paratuberculosis. **134**, Copenhagen, Denmark.

Gilardoni, L.R., Paolicchi, F.A. and Mundo SL., 2012. Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests. *Rev.Argent.Microbiol.*, **44**, 201-215.

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

Grant, I.R., Rowe, M.T., Dundee, L. and Hitchings E., 2001. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: its incidence, heat resistance and detection in milk and dairy products. *Int. J. Dairy Technol.*, **54**, 2-13

Gupta, A., Rani, S.M., Agrawal, P., and Gupta, P.K., 2012. Sero-prevalence of paratuberculosis (Johne's Disease) in cattle population of south-western Bangalore using ELISA kit. *Open Vet. J.*, **2**, 196-200.

Gurung, R.B., Begg, D.J. and Whittington, R.J., 2018. A national serosurvey to determine the prevalence of paratuberculosis in cattle in Bhutan following detection of clinical cases. *Vet. Med. Sci.*, **4**, 288-295.

Gümüşsoy, K.S., İça, T., Abay, S., Aydın, F. and Hızlısoy, H., 2015. Serological and molecular diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, **39**, 147-153.

Hakioğlu, F., 1968. Bir koyunda tespit edilen paratüberküloz vakası. *Pen. Vet. Kont. Arş. Ens. Derg.*, **1**, 144-145.

Harris, N.B., and Barletta, R.G., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin. Microbiol. Rev.*, **14**, 489-512.

Hasonova, L., Trcka, I., Babak, V., Rozsypalova, Z., Pribylova, R. and Pavlik I., 2009. Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissues of naturally infected cattle as affected by age. *Vet.Med-Czech.*, **54**, 257-269.

Hendrick, S., Duffield, T., Leslie, K., Lissemore, K., Archambault, M. and Kelton, D., 2005. The prevalence of milk and serum antibodies to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds in Ontario. *Can. Vet .J.*, **46**, 1126–1129

Hendry, RM. and Hermann, J.E., 1980. Immobilization of antibodies on nylon for use in enzyme-linked immunoassay. *J. Immunol. Methods*, **35**, 285-296.

Hermon-Taylor, J. and El-Zaatari, FAK., 2004. The *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* problem and its relation to the causation of Crohn disease. In “World Health Organization, Pathogenic Mycobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management”, Ed., Pedley S, Bartram J, Rees G, Dufour A, *Cotruvo J.1st. ed.*, **74**, IWA Publishing, London.

Jitsukawa, T., Nakajima, S., Sugawara, I. and Watanabe H., 1989. Increased coating efficiency of antigens and preservation of original antigenic structure after coating in ELISA. *J. Immunol. Methods*, **4**, 251-257.

Johne, H.A. and Frothingham L., 1895. Ein eigenthumlicher fall von tuberculose beim rind Deutsche Zeitschrift fur Tiermedizin und Vergleichend Pathologie, **21**, 438-454.

Judge, J., Kyriazakis, I., Greig, A., Allcroft, D.J. and Hutchings, M.R., 2005. Clustering of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Rabbits and the Environment: How hot is a hot spot. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 6033-6038.

Kalis, C.H.J., Hesselink, J.W. and Barkema, H.W., 1999. Comparison of culture of individual and strategically pooled bovine faecal samples for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: Manning EJB, Collins MT, eds. Proceedings of the 6th International Colloquium on Paratuberculosis.. Madison, Wisconsin.

Kalis, C.H.J., Hesselink, J.W., Barkema, H.W. and Collins MT., 2000. Culture of strategically pooled bovine fecal samples as a method to screen herds of paratuberculosis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **12**, 547-551.

Kalis, C.H., Collins, M.T., Hesselink, J.W. and 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.*, **9**, 73-86.

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

Khamesipour, F., Doosti, A. and Sebdani, M.M. 2014. Survey for the presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the bull frozen semen samples and blood samples of cattle, sheep and camel by nested- PCR. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **20**, 681-686.

Khol, J.L, Damoser, J. and Baumgartner, W. 2005. Hygienemaßnahmen zur Bekämpfung der Ausbreitung von Paratuberkulose in Rinderbetrieben. *Klauentierpraxis*, **13**, 137-238.

Klee, W., 2004. Paratuberkulose (Johnesche Krankheit). In: Dirksen HD, Stöber M, eds Innere Medizin und Chirurgie des Rindes. **4**, 586-91. Blackwell, Berlin.

Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C. and Winn, W.C., 1992. Current rapid techniques and emerging technologies in diagnosis. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 4th edition, Philadelphia: JB Lippincott Company, **26**, 1086-87.

Kopecna M, Lamka J. and Trcka I., 2005. Atypical hosts and vectors of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: 8th International Colloquium on Paratuberculosis. **138**, Copenhagen, Denmark.

Lamont, EA., 2012. Survival strategies of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a variety of microenvironments. PhD Thesis, The University of Minnesota, Minnesota, United States.

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

Liu, X., Li, J., Yang, X., Wang, D., Wang, J. and Wu, J., 2017. The seroprevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle in Xinjiang, Northwest China *Vet. J.*, **70**, 1-5.

Machackova, M., Svastova, P., Lamka, J., Parmova, I., Liska, V., Smolik, J., Fischer, O.A. and Pavlik, I. 2004. Paratuberculosis in farmed and free-living wild ruminants in the Czech Republic (1999-2001). *Vet. Microbiol.*, **101**, 225-234.

Makav, M. ve Gökçe E., 2013. Kars yöresi sığırlarında subklinik paratuberkülozun seroprevalansı. *Kafkas Univ.. Vet. Fak. Derg.*, **19**, 913-916.

Manning, E.J.B., 2001. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: A review of current knowledge. *J. Zoo and Wildlife Med.*, **32**, 293–304.

McKenna, S.L.B., Keefe, G.P., Barkema, H.W., McClure, J., VanLeeuwen, J.A., Hanna P. and Sockett DC., 2004. Cow-level prevalence of paratuberculosis in culled dairy cows in Atlantic Canada and Maine. *J. Dairy. Sci.*, **87**, 3770-3777

Moravkova, M., Hlozek, P., Beran, V., Pavlik, I., Preziuso, S. and Cuteri V., 2008. Strategy for the detection and differentiation of *Mycobacterium avium* species in isolates and heavily infected tissues. *Res.Vet .Sci.*, **85**, 257-264.

Mundo, S.L., 2005. Respuesta inmune en bovinos frente a *Mycobacterium paratuberculosis*. PhD Dissertation. Facultad de Farmacia y Bioquímica - Universidad de

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

Muskens, J., Mars, M.H., Elbers, A.R., Van maanen, K. and Bakker, A.D., 2003. The results of using faecal culture as confirmation test of paratuberculosis seropositive dairy cattle. *J. Vet .Med. B.*, **50**, 231-41.

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

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

Nielsen, S.S., 2008. Transitions in diagnostic tests used for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections in cattle. *Vet .Microbiol.*, **132**, 274-82.

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

OIE., 2013. Paratuberculosis (Johne's Disease) Chapter 2.1.11. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, p: 276-291..

Over, K., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Ricke, S.C., 2011. Current perspectives on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Johne's disease, and Crohn's disease: a review. *Crit. Rev. Microbiol.*, **37**, 141-156.

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

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

Paolichii, F.A., Zumarrage, M.J., Gioffre, A., Zamorano, P., Morsella, C., Verna, A., Cataldi, A., Alito, A. and Romano, M., 2003. Application of different methods fort he diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentine. *J. Vet. Med. B.*, **50**, 20-26.

Paolicchi, F.A. and Romano, M.I., 2007. Paratuberculosis. In: Stanchi NO, editor. *Microbiología Veterinaria*, 2nd edition. Buenos Aires, Intermédica.

Patel, A. and Shah N., 2011. *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis*-Incidences in milk and milk products, their isolation, enumeration, characterization, and role in human health. *J. Microbiol. Immunol Infect.*, **44**, 473-479

Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. and Leonard FC., 2005. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. and Constable PD., 2007. Paratuberculosis (Johne's disease). In: Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD, editors. *Veterinary Medicine. A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Goats, Pigs and Horses*. 10th ed. Philadelphia, PA, USA: Saunders Elsevier.

Rouhollah, K., Ali, M., Nader, M., Keyvan, T., Shamseddin, G., Farzaneh, F. and Shojaat, D.P. 2016. Development and optimization a high sensitive and specific ELISA system for rapid detection of paratuberculosis in cattle. *Int. J. Advan. Biotechnol.*, **7**, 1-9.

Secott, T.E., Lin, T.L. and Wu CC. 2002. Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cells by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun.*, **70**, 2670-2675.

Secott, T.E., Lin, T.L. and Wu CC., 2004. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. *Infect. Immun.*, **72**, 3724-3732.

Selbitz, H.J., 2002. Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Rolle M, Mayr A, eds. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag, 562-5633.

Selim, A.M. and Gaede, W., 2015. Comparative evaluation of PCR assay for direct detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Ruminant. 1

Asian J. Anim. Vet. Adv., **10**, 761-771.

Selim, A.F., Ali AF. and Ramadan, E., 2019. Prevalence and molecular epidemiology of Johne's disease in Egyptian cattle. *Acta. Tropica*, **195**, 1-5.

Sevilla, I., Aduriz, G., Garrido, J.M., Geijo, M.V. and Juste RA., 2002. A preliminary survey on the prevalence of paratuberculosis in dairy cattle in Spain by bulk milk PCR. Proceedings of the Seventh International Colloquium on Paratuberculosis, Bilbao, Spain.

Sevilla, I., Singh, S.V., Garrido, J.M., Aduriz, G., Rodríguez, S., Geijo, M.V., Whittington, R.J., Saunders, V., Whitlock, R.H. and Juste RA., 2005. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains from different hosts and regions. *Rev. Sci. Tech.*, **24**, 1061-1066.

Sezginer, R.I., 1928. Sığırların Paratüberkülozu. Ehli Hayvanlarda İntani Hastalıklar, **11**, 252-259.

Shin, S.J., Cho, D. and Collins, M.T. 2008. Diagnosis of bovine paratuberculosis by a novel enzyme-linked immunosorbent assay based on early secreted antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin. Vaccin. Immunol.*, **15**, 1277-1281.

Singh, S.V., Singh, A.V., Singh, P.K., Sohal, J.S. and Singh, N.P. 2007a. Evaluation of an indigenous ELISA for diagnosis of Johne's disease and its comparison with commercial kits. *Indian J. Microbiol.*, **47**, 251-258.

Singh SV, Singh AV, Singh PK, Gupta VK, Kumar S. and Vohra J., 2007b. Sero-prevalence of paratuberculosis in young kids using 'Bison type', *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigen in plate ELISA. *Small Rum. Res.*, **70**, 89–92.

Singh, S.V., Singh, A.V., Singh, R., Sharma, S., Shukla, N., Misra, S., Singh, P.K., Sohal, J.S., Kumar, H., Patil, P.K., Misra, P. and Sandhu, K.S., 2008. Sero-prevalence of bovine Johne's disease in buffaloes and cattle population of North India using indigenous ELISA kit based on native *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* 'Bison type' genotype of goat origin. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **31**, 433.

Sivakumar, P., Tripathi, B.N. and Singh N., 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalis bubalis*) by PCR and bacterial culture. *Vet. Microbiol.*, **108**, 263-70.

Slana, I., Paolicchi F., Janstova, B., Navratilova P. and Pavlik I., 2008. Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Vet Med-Czech.*, **53**, 283-306.

Smith, S. and Bradford, P., 2001. Johnes Disease In: Large Animal Internal Medicine 3rd Edition London.

Sonawane, G.G., Narnaware, S.D. and Bhupendra N., 2016. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in ruminants in different parts of India *Tripathi Int. J. Mycobact.*, **5**, 59-65.

Stabel, J.R., 1996. Production of gamma-interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis. *J.Vet.Diagn. Invest.*, **8**, 345-350

Stich, R.W., Byrm, B., Love, B., Theus, N., Baber, L. and Shulaw W.P., 2004. Evaluation of an automated system for non-radiometric detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in bovine feces. *J. Microbio Methods*, **56**, 267-75.

Stricklands, J., Scott, H.M. and Mc Jordan, E.R., 2005. Effects of seasonal climatic conditions on the diagnosis of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, **88**, 2432-2440.

Sweeney, R.W, Uzonna, J., Whitlock RH, Habecker PL, Chilton P. and Scott P., 2006. Tissue predilection sites and effect of dose on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. *Res.Vet. Sci.*, **80**, 253-259.

Tütüncü, M., Kılıçoğlu, Y., Güzel, M., Pekmezci, D. ve Gülhan, T. 2018. Orta karadeniz bölgesinde kronik ishalli sığırlarda *Mycobacterium paratuberculosis*'in seropozitifliği. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, **13**, 1-5.

URL1 <https://doktorumnedio.com/immunoloji/elisa-testi-nedir/> (15.05.2019)

Waters, W.R., Miller, J.M., Palmer, M.V, Stabel, J.R., Jones, D.E., Koistinen, K.A., Steadham, E.M., Hamilton, M.J., Davis, W.C. and Bannantine, J.P., 2003. Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves. *Infect. Immun.*, **71**, 5130-5138.

Weber, M.F., Kogut, K., and Bree, J., 2005. Evidence for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* shedding in young stock. In: 8th International Colloquium on *Paratuberculosis*. **126**, Copenhagen, Denmark.

Whitlock, R. 1996. Johne's disease. In: Smith BP, ed. Large animal internal medicine. 2nd ed. St. Louis: Mosby.

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

Whitlock, R.H., Sweeney, R.W. and Fyock T.L., 2005. MAP Super shedders: another factor in the control of Johne's disease. In: 8th International Colloquium on Paratuberculosis. **42**, Copenhagen, Denmark.

Woodbine, K.A., Schukken, Y.H., Green, L.E., Ramirez-Villaescusa, A., Mason, S., Moore, S.J., Bilbao, C., Swann, N. and Medley, G.F., 2009. Seroprevalence and epidemiological characteristics of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* on 114 cattle farms in south west England. *Prev. Vet .Med.*, **89**, 102-109.

Yardımcı, H., 2006. Mycobacterium infeksiyonları. Editörler: Aydın N, Paracıklıoğlu J. Veteriner Mikrobiyoloji, İlke-Emek Yayınları, Ankara.

Yıldırım, D. ve Civelek, T., 2013. Prevalence of subclinical paratuberculosis in dairy cattle in Uşak Region. *Kafkas Univ. Vet .Fak. Derg.*, **19**, 121-126.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Ad- Soyad: TUBA ASLAN

Doğum Tarihi: 17.06.1993 (ELAZIĞ)

Adres Bilgileri: Ulukent Mah. Kandilli Sok. Berrak Apt. No:49 Elazığ/Merkez

Cep: 0555 172 00 23

Ehliyet: B Tipi

E-posta: aslantuba3@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

(2016-.....) Fırat Üniversitesi Yüksek Lisans, Biyomühendislik bölümü (Mikrobiyoloji, İmmünoloji)

2016-2012 Fırat Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü (Lisans Ort:84.7 Bölüm İkindiliği)

2011-2008 Korgeneral Hulusi Sayın Lisesi (ELAZIĞ)

STAJLAR

2014 (4 haftalık Yaz Pratiği) Mersin Üniversitesi Eczacılık fakültesi **Biyoteknoloji ve Farmasotik Anabilim Dalı** (Farmasotik Biyoteknolojide kullanılan Temel moleküler biyolojik yöntemlerin öğrenilmesi: DNA polimerizasyonu ve Karakterizasyonu, agaroz jel elektroforez uygulamaları, kağıt kromatografisi, antibiyogram testi, Temel PCR gen poliformizmi, Bazı ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasındaki Temel işlemler)

2015 (4 haftalık Yaz Pratiği) Elazığ Şeker Fabrikası (Pancar şekeri Üretim Teknolojisi, Fabrika İşletim Düzeni, Kullanılan Makinalar ve Çalışma Prensipleri, Ham Maddeden son ürüne izlenen süreçler,)

2015 (2 Haftalık Yaz Pratiği) Elazığ MedicalPark Hastahanesi (Biyokimya, Hemotoloji, Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında Çalışma Boyunca Kullanılan Cihaz Bilgisi ve Uygulamaları)

DENEYİMLER

2018 (15 kasım -.....) Akademi Yabancı Dil Kursu (İngilizce öğretmenliği)

2018 (1 mart – 30 ağustos)
Öğretmenliği)

Özel Doğukent Kurs Merkezi (İngilizce

2016 (1 Haziran – 18 Eylül) **Elazığ MedicalPark Hastahanesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Merkezi** (Fizik Tedavi sürecinde Hastalara Uygulanan cihazlar çalışma Prensipleri ve Uygulamaları)

2016 (19 Eylül – 1 Mayıs) **Elazığ MedicalPark Hastahanesi Laboratuvar** (Biyokimya, Mikrobiyoloji, Transfüzyon laboratuvar birimlerinde uygulanan işlemler, hastalık taramaları ve teşhis yoluna gidilirken izlenen basamaklar ve sonuçları, bulunan cihazların Çalışma prensibi, bakımları ve uygulamaları)

KATILIMLAR (BİLDİRİLİ , BİLDİRİSİZ)

1. Aykut Topdemir , **Tuba Aslan** , Gözde Baydoğan :“ Küçük Ölçekli Kurutma Tüneli”(Sözlü Anlatım ve Poster Sunumu); 4. Ulusal Biyomühendislik Kongresi (2016) / ELAZIĞ
2. Aykut Topdemir , **Tuba Aslan** , Gözde Baydoğan : “ Küçük Ölçekli Kurutma Tüneli”(Sözlü Anlatım ve Poster Sunumu); Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Bitirme Projeleri Yarışması (26 Mayıs 2016) / ELAZIĞ
3. **English Port Dil Eğitimi** (5 Aylık İngilizce Dil eğitimi)/2015
4. **Harvard Dil Okullar** (6 aylık İngilizce Dil Eğitimi) /2017

NİTELİKLER

Yabancı Dil İyi Seviyede İngilizce

Bilgisayar Bilgileri CHEMCAD, AUTOCAD, MS Ofis Programları (Word,Excel,Powerpoint.)

REFERANSLAR

- **Selahattin ASLAN** (Öğretim Görevlisi / Alparslan Üniversitesi)
s.aslan@alparslan.edu.tr
- **Hakan KALENDER** (Öğretim Üyesi / Fırat Üniversitesi)
hkalender@firat.edu.tr

