

T.C.  
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ BÖLÜMÜ



SÜT İŞLETMELERİNDE *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* (MAP)  
VARLIĞININ REAL TIME PCR YÖNTEMİYLE TESBİTİ VE HALK  
SAĞLIĞI RİSKİ YÖNÜNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Yunus KURT

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR

EYLÜL 2012

İSTANBUL

T.C.  
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ BÖLÜMÜ

SÜT İŞLETMELERİNDE *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP)  
VARLIĞININ REAL TIME PCR YÖNTEMİYLE TESBİTİ VE HALK  
SAĞLIĞI RİSKİ YÖNÜNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Yunus KURT

Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR

EYLÜL 2012

İSTANBUL

## TEZ ONAYI

İstanbul Aydın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün **Y1013.040004** numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Yunus KURT**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**SÜT İŞLETMELERİNDE *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) VARLIĞININ REAL TIME PCR YÖNTEMİYLE TESBİTİ VE HALK SAĞLIĞI RİSKİ YÖNÜNDE DEĞERLENDİRİLMESİ**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

### Jüri Üyeleri:

**Tez Danışmanı**

**Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR**  
İstanbul Aydın Üniversitesi

**Prof. Dr. Kamil BOSTAN**  
İstanbul Aydın Üniversitesi

**Prof. Dr. Güner ÖZAY**  
İstanbul Aydın Üniversitesi


**Teslim tarihi** : 28.08.2012

**Savunma tarihi** : 11.09.2012

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

**Yunus KURT**



## ÖNSÖZ

Ülkemizde Halk Sağlığı bakımından önemli olan “**SÜT İŞLETMELERİNDE *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) VARLIĞININ REAL TIME PCR YÖNTEMİYLE TESBİTİ VE HALK SAĞLIĞI RİSKİ YÖNÜNDE DEĞERLENDİRİLMESİ**” konulu tezimi belirleyen ve çalışmam için maddi ve manevi destek veren tez danışmanım Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR’ a, bu çalışmanın gerçekleşmesinde proje desteği veren Hürriyet Gazetecilik A.Ş’ ye ve bu desteği organize eden Doğan Holding A.Ş İş Sağlığı ve Güvenliği Grup Başkanı Sayın Dr. Gündüz Tezmen’ e, Real-Time PCR MAP analiz metoduna destek veren Almanya Justus-Liebig Giessen Üniversitesi Süt Teknolojisi ve Hijyeni Enstitüsü Öğretim Üyesi Dr. Ömer AKINEDEN’ e, numunelerin toplanması süresince her kolaylığı gösteren Dr. Vet. Hek. Olcay KARAMAN’a, laboratuvar uygulamalarımda koordinasyon ve teknik destek veren İsmail Hakkı TEKİNER’e ve İnci GÖKÇE’ye, yüksek lisans eğitimim süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme tüm kalbimle teşekkür ederim.

**Yunus KURT**

Eylül 2012

# SÜT İŞLETMELERİNDE *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) VARLIĞININ REAL TIME PCR YÖNTEMİYLE TESBİTİ VE HALK SAĞLIĞI RİSKİ YÖNÜNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

## ÖZET

*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) ruminantlarda özellikle süt sığırlarında görülen Paratüberküloz'a (Johne Hastalığı) neden olan patojen bir mikroorganizmadır. Klinik ya da subklinik MAP pozitif süt sığırları bu patojen etkeni periyodik olarak dışkı, süt ve spermaları üzerinden atarlar. 20. yüzyılın başından itibaren insanlarda görülen Crohn hastalığı nedeninin MAP olabileceği konusunda görüşler bildirilmiştir. Son yıllarda halk sağlığı açısından önemi artan bu mikroorganizma üzerinde çalışmalar artmış ve bu etkenin enfekte hayvanlardan direkt kontamine olan süt ve süt ürünleri yoluyla insanlara bulaşması üzerinde yoğunlaşmıştır. MAP'ın özellikle çiğ sütün pastörizasyonu için yapılan ısı işlemlere karşı dayanıklı olduğu saptanmıştır. Değişik ülkelerde ısı işleminden geçmiş sütlerde MAP insidansının %1-3 oranında olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, Türkiye'de ilk defa Edirne Keşan bölgesinde yerleşik 15 köyde 30 süt sığırcılığı işletmesinde 2 yaşını doldurmuş ineklerden direkt rektumdan toplam 270 dışkı örneği, her işletmenin süt toplama tankından toplam 30 adet ve her köyün süt toplama tankından 15 adet çiğ süt örnekleri toplanmıştır. Moleküler teknik olan real Time PCR yöntemiyle DNA izolasyonu yapılan örnekler MAP varlığı bakımından incelenmiştir. İncelenen dışkı ve süt örneklerinin hiç birinde MAP genomu tespit edilememiştir. Sonuç olarak; kullanılan yöntemin hassasiyetinin  $10^2$  KOB/gram dışkı ve  $10^2$  KOB/10 ml süt olduğu göz önüne alınarak, incelenen işletmelerin MAP'dan arı olduğu ya da yöntemin tespit düzeyinin çok altında MAP varlığı olabileceği sonucuna varılmıştır. Türkiye'de ilk defa yapılan MAP prevalansı çalışmamızda halk sağlığı açısından önemli verilere ulaşılmıştır. MAP'a rastlanmaması sadece araştırma yapılan Keşan bölgesi için geçerli olup, bu çalışmanın Türkiye'nin tüm bölgelerinde tekrarlanması ve ülkemiz için bir MAP haritası çizilmesi gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Gıda Güvenliği, *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, MAP, Johne Hastalığı, Crohn Hastalığı, Süt, Real-Time PCR.

**DETECTION of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) by REAL TIME PCR in DAIRY HERDS and EVALUATION of RISK ASSESSMENT for PUBLIC HEALTH**

**ABSTRACT**

*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) is the causative agent of paratuberculosis (called Johne's Disease), a chronic contagious enteritis of ruminants, especially of dairy cattle. Dairy cattle infected clinically and subclinically with MAP shed the pathogen periodically in their faeces, milk and semen. Since the beginning of the last century, it was controversially discussed whether MAP is concerned in the pathogenesis of humans Crohn's disease. In spite of direct contact to MAP infected animals, humans may be exposed to MAP by consumption of contaminated milk products. From the public health point of view, an increasing number of studies have been focused on milk and dairy products which are considered to be a major source of exposure for humans. MAP can not be completely inactivated by commercial pasteurization techniques. The incidence of culturable MAP in pasteurized milk worldwide is estimated between about 1–3%. The objective of this study was to detect MAP by Real Time PCR in dairy herds in the region of Keşan in Edirne. 270 fecal samples directly from rectum of asymptomatic cows over then 2 yr old from 30 dairy herds in 15 districts and in addition 30 bulk milk samples and 15 districts tank milk samples were enclosed in the study. All fecal and milk samples were negative for MAP genom by Real Time PCR assay. The results of this study showed that MAP could not be detected in investigated dairy herds or it may be presence in very low number or under detection limit ( $10^2$  CFU/g faeces and  $10^2$  CFU/10 ml milk) in regarding on the sensivity of Real Time PCR assay. To our knowledge, this work is the first small prevalence study of MAP in dairy farms in a region of Turkey. In this study, the absence of MAP in faeces and milk samples has an impact on public health in particularly in the Kesan region, however this study supports a large study in different districts of Turkey for screening dairy herds for prevalence and diagnosis of MAP.

**Keywords:** Food Safety, *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, MAP, Johne Disease, Crohn Disease, Milk, Real-Time PCR.

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	ii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
KISALTMALAR .....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
TABLO LİSTESİ.....	xi
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ÖZETİ.....</b>	<b>4</b>
2.1 Mikobakteriler.....	4
2.2 <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> .....	4
2.2.1 Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri .....	5
2.2.2 Doğada Bulunuşu ve Yaşama Süresi.....	9
2.3. Paratüberküloz (Johne Hastalığı) .....	10
2.3.1 Klinik, Patoloji ve Epidemiyolojisi .....	10
2.3.2 Ekonomik Açıdan Paratüberküloz.....	12
2.3.3 Türkiye’de Paratüberküloz .....	13
2.3.4 Paratüberküloz ve Crohn Hastalığı.....	14
2.4 Gıda Gruplarında MAP İle İlgili Yapılan Çalışmalar .....	15
2.4.1 Süt.....	17
<b>3. MATERYAL ve METOT .....</b>	<b>24</b>
3.1 İstatistiksel Hesaplama.....	24
3.1.1 İşletmelerin Seçimi .....	24
3.1.2 Hayvanların Seçimi .....	25
3.2 Örnek Alımı .....	26
3.3 Metot .....	26
3.3.1 Kit Malzemelerinin Hazırlanması .....	27
3.3.2 Ön Hazırlık: Yıkama İşlemi .....	28



3.3.2.1 Dışkı Örneklerinde Yıkama İşlemi .....	28
3.3.2.2 Süt Örneklerinde Yıkama İşlemi .....	28
3.3.3 Dışkı ve Süt örneklerinde DNA İzolasyonu .....	30
3.3.4 Real-Time PCR Yöntemiyle MAP Taraması .....	31
3.3.4.1 MAPSureEasy® Kit Prosedürü .....	31
3.4 Sonuçların Okunması ve Değerlendirme .....	33
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>34</b>
4.1 İstatistiksel Değerlendirme.....	34
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>38</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>42</b>
<b>7. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>54</b>

## KISALTMALAR

<b>%</b>	: Yüzde
<b>+</b>	: Pozitif, artı
<b>-</b>	: Negatif, olumsuz, eksi
<b>&lt;</b>	: Az
<b>&gt;</b>	: Fazla
<b>®</b>	: Tescilli markasıdır
<b>°C</b>	: Santigrat (Celcius) Derece
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>CD</b>	: Crohn Hastalığı
<b>CFU</b>	: Koloni oluşturuıcı birim
<b>cm</b>	: Santimetre
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>dk</b>	: Dakika
<b>ELISA</b>	: Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>g</b>	: Gram
<b>HEYM</b>	: Herrold's Egg Yolk Medium
<b>KOB</b>	: Koloni Oluşturan Birim
<b>MAA</b>	: <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>avium</i>
<b>MAP</b>	: <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>
<b>Max.</b>	: Maksimum
<b>Min.</b>	: Minimum
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>OIE</b>	: Uluslararası Salgın Hastalıkları Ofisi

**PCR** : Polymerase Chain Reaction  
**sn** : Saniye  
**ssp.** : Subspecies  
**ve ark.** : ve arkadaşları  
**WHO** : World Health Organization

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Yavaş gelişen Mikobakteriler ve <i>Mycobacterium avium</i> kompleksi (Mignard ve Flandrois, 2008). .....	6
Şekil 2.2: MAP elektron tarama mikrografı (JIC, 2011). .....	8
Şekil 2.3: MAP Hücre duvarı (JIC, 2011). .....	8
Şekil 2.4: Paratüberküloz gelişiminde tedavinin etkisi.....	12
Şekil 2.5: MAP'ın dağılım ve iletimleri (Hammer, 2003).....	15
Şekil 2.6: 2011 Dünya Toplam Süt Üretimi (Özder, 2012).....	17
Şekil 2.7: Türkiye'de Toplam Süt Üretiminin Türlerine Göre Dağılımı .....	17
Şekil 2.8: Türkiye'de süt ve süt ürünlerinde yıllık tüketim (Özder, 2012).....	18
Şekil 2.9: İsviçre'nin farklı bölgelerinde süt tankı örneklerinde MAP yaygınlığı. ....	20
Şekil 3.1: Dışkı Örneklerinde Yıkama İşlemi.....	29
Şekil 3.2: Süt örnekleri için Ön Hazırlık .....	30
Şekil 3.3: Dışkı ve Süt örnekleri için DNA İzolasyonu.....	32

## TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: Farklı koşullar ve ortamlarda MAP'ın hayatta kalma süreleri .....	9
Tablo 2.2: Bazı ülkelerde ve bölgelerdeki sığırlarda paratuberküloz prevalansı .....	11
Tablo 2.3: Crohn hastalığı ve paratüberkülozun karşılaştırmalı klinik bulguları .....	15
Tablo 2.4: Crohn Hastalığının Dünya Genelindeki İnsidansı.....	16
Tablo 2.5: 2002-2010 Süt Üretim Miktarındaki Değişim (Milyon Ton).....	18
Tablo 2.6: Ülkelere göre inek sütünde kültürel yöntemle MAP tespiti .....	22
Tablo 3.1: Dışkı ve Süt Örneklerinin Alındığı İşletmeler ve Örnek Sayıları .....	27
Tablo 3.2: Oligonükleotid primerler, Flourogenik problemleri ve iç amplifikasyon dizileri	33
Tablo 4.1: Dışkı örneklerinde toplama yerlerine göre Real Time PCR yöntemiyle MAP tespiti.....	35
Tablo 4.2 İşletme süt örneklerinde toplama yerlerine göre Real Time PCR yöntemiyle MAP tespiti .....	36
Tablo 4.3: Köy süt toplama tankı süt örneklerinde toplama yerlerine göre Real Time PCR yöntemiyle MAP tespiti .....	37

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyanın en yararlı içeceklerinden biri olan süt insanların doğumlarından itibaren aldıkları ilk besindir. Süt insan yaşamının her evresinde sağlıklı bir yaşam için vücudun ihtiyacı olan besin öğelerini en ideal miktarda içeren önemli bir besindir. Çocukluk, gebelik, laktasyon ve yaşlılık dönemlerinde kemik sağlığı açısından önemi bilinen sütün; kanser, obezite ve hipertansiyon gibi kronik hastalıklara karşı olumlu etkilerini gösteren araştırmalar bulunmaktadır (Ünal ve Besler 2006).

Gıda üretimi giderek artan stratejik bir öneme sahiptir. Kaliteli, sağlıklı ve yeter miktarda gıda tüketimi ülkeler açısından önemlidir. Özellikle hayvansal ürünler içerisinde süt ve süt ürünlerinin tüketimi beslenmede ve sağlıklı nesillerin gelişmesinde önemli bir yere sahiptir. İstatistiklere göre dünyada toplam süt üretimi 2010 yılında 512.708.000 ton, inek sütü üretimi ise 440.332.000 ton olarak gerçekleşmiştir. Türkiye’de süt üretimi 2010 yılında bir önceki yıla göre %8.5 oranında artmış ve 13.605.600 ton olarak gerçekleşmiştir (Ataseven ve Gülaç, 2011). Kişi başı süt tüketiminde Avustralya yıllık 107 kg ile birinci sıradadır. AB’de yıllık süt tüketimi 89 kg, Amerika’da 83 kg’dır. Türkiye’de kişi başına yıllık süt tüketimi ise 26 kg’dır (BAKA, 2011).

Yeterli ve dengeli besin ögesi ve enerji alınımının sağlanması açısından süt ve süt ürünleri tüketiminin artırılması sağlık uzmanları tarafından önerilmektedir. Süt eşsiz bileşimi ve yapısı nedeniyle mikroorganizmaların üremesi için de uygun bir ortamdır. Mikroorganizmalar besin maddelerini sulu ortamlarda daha kolay temin ederek daha hızlı çoğalırlar. Patojen bakterilerin bir kısmı ise süt içerisinde çoğalmazlar fakat canlılıklarını uzun zaman korurlar. Sütün mikrobiyal patojenlerle karşılaşması sağımla birlikte başlar. Hijyenik koşullarda yapılmayan sağım yoluyla pek çok mikrobiyal patojen süte bulaşmaktadır. Bulaşma etmenleri arasında sağım yapılan ortamın temizliği kadar sağım yapan kişi ve kullanılan ekipmanın temizliği de önemlidir. *Salmonella*, *Brucella*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* gibi bakteriler çiğ sütte bulunan patojenlere örnek verilebilir (Altın ve ark., 2002).

Sütte mikrobiyolojik bulaşma önlenemediği takdirde toplam bakteri miktarı artmakta, bu da ısı ile yok edilemeyen toksinlerin oluşumuna neden olmaktadır. Gerekli tedbirler alınmadığında, besin değeri açısından çok zengin ve yararlı olan süt, sağlığa zararlı mikroorganizmaları taşıyarak pek çok hastalıklara, hatta ölümcül sonuçlara yol açmaktadır. Bu nedenle sütün üretiminden itibaren mikroorganizmalardan arındırılmış bir şekilde tüketiciye sunulması gerekmektedir (Kabak ve Arslan, 2012).

*Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* (MAP) ruminantlarda Paratüberküloz (Johne hastalığı)'un etkenidir. Sığırlar genellikle doğumdan sonraki altı ay süresince dışkı veya oral yolla MAP ile enfekte olur. Ancak, ishal, zayıflama ve dehidratasyon gibi klinik semptomlar 2-3 yıllık bir dönemden sonra ortaya çıkar. Johne hastalığı ekonomik kayıplara neden olan bir hastalıktır (Füllgrabe, 2009).

Günümüzde insanlarda Johne hastalığıyla benzer semptomları gösteren, nedeni henüz bilinmeyen ve immün sistemin yetersizliğine bağlanan Crohn hastalığı yaygın olarak görülmektedir. Her iki hastalıkta bağırsak enfeksiyonlarıyla karakterizedir. MAP ve Crohn hastalığı arasında nedensel bir ilişkinin henüz kanıtlanmamış olmasına rağmen, insanların MAP'a maruz kalma yollarının araştırılması gerekmektedir. Crohn hastalığı ağızdan rektuma kadar sindirim sisteminin herhangi bir bölümünde oluşan kronik inflamatuvar barsak hastalığıdır ve tedavisi yoktur. İnsanlarda görülen Crohn hastalığının prevalansının yüksek olduğu yerler genellikle yaşam kalitesinin düşük olduğu bölgelerdir. Crohn hastalığına MAP'ın etkili olduğu düşünülerek, birçok ülkede bu hastalığın prevalansı konusunda araştırmalar yapılmıştır (Whan ve ark., 2006). Türkiye'de ise bu konuda yapılan araştırma sayısı çok azdır. Buna karşın gelişmiş ülkelerde Çiğ sütte ve dışkıda MAP varlığı konusunda araştırmalar yapılarak, bölgelere göre prevalanslar belirlenmeye çalışılmaktadır (Slana ve ark., 2008). MAP süt içinde olabileceği gibi memeye dışkı bulaşması yoluyla da süte geçebilmektedir. Dışkının küçük miktarı bile MAP'ı yüksek oranda süte bulaştırabilir (Mihajlovic ve ark., 2011).

MAP tespiti günümüzde kültürel ve moleküler bazlı yapılmaktadır. Kültürel bazlı yöntemler uzun zaman almaktadır (Songer ve Post., 2005). Moleküler bazlı yöntemlerden Real Time PCR çok hızlı bir sürede aynı gün içerisinde analizi sonlandırmaktadır. Bu çalışma ile Türkiye'de ilk olarak aynı ineğe ait süt ve dışkı

örneklerinde Real Time PCR yöntemiyle MAP analizleri yapılmıştır. Bu araştırmada, Edirne Keşan ilçesine bağlı 30 farklı süt sığırıcılığı işletmesinden, 2 yaşını doldurmuş, sağlıklı, ineklerden; rektal yolla dışkı ve aynı zamanda süt toplama tanklarından süt alınarak bu örneklerin MAP ile kontamine olup olmadığı Real Time PCR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.



## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1 Mikobakteriler

Mikobakteriler, Mycobacteriaceae adı verilen Actinobacteria'lardan bir ailedir. Mikobakterilerden ilk olarak cüzzam hastalığına neden olan *Mycobacterium leprae* keşfedildi. Daha sonra 1882 yılında tüberküloz hastalığının patojeni *M.tuberculosis* bulundu. Bir kaç yıl sonra sığır tüberkülozu *Mycobacterium bovis*, kuş ve kuş tüberkülozü *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* ile Johne hastalığının keşfi gerçekleşti. Mikobakterilerin, memeliler ve kuşların yanı sıra toprak ve su gibi çevreninde etkisiyle yayıldığı bildirilmiştir (Blobe ve Schliesser, 1985; Ryan, 2004).

Mikobakteriler, dallanma yapmayan kısa filament çubuklar halinde yapısı olan gram pozitif, aerobik ve hareketsiz mikroorganizmalardır. *Mycobacterium marinum* türü hariç makrofajlar içinde hareketli oldukları gözlenmiştir. Karakteristik olarak asit ve alkolde hızlı hareket ederler (Holt ve ark. 1994). Tipik olarak hücre duvarlarının yağ içeriği yüksek olup 60-90 karbon atomlu yağ asitleri (Mikolik asit) içermektedir. Mikobakteriler türüne göre aerobik hızlı ya da yavaş büyüme gösterirler (Blobe ve Schliesser, 1985; Stahl ve Urbance, 1990; Holt ve ark. 1994).

### 2.2 *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

MAP, *M.avium*'un bir alt türü olarak sınıflandırılmaktadır. Etken, genetik olarak memelilerde tüberküloz hastalığının etkeni *M. tuberculosis* aynı zamanda insanlarda lepra hastalığının etkeni *M.leprae*'ya benzerlik göstermez. Ancak *M. avium*'a genetik olarak oldukça büyük benzerlik gösterir. MAP genetik olarak IS900 adı verilen giriş sekansının (IS900) bakterinin genomu içerisinde çok sayıda (12 ila 18 arasında) kopyasının olmasıdır. Bu yüzden yapılan çoğu çalışmada, klinik örneklerde MAP tespiti veya kültürlerde bakterinin identifikasyonu için kullanılan genetik problemler, IS900'ün tayinine dayanır (Yazıcıoğlu, 2004).

MAP 1894 yılında Alman Veteriner Hekim Dr. Johne tarafından bulundu. 1910 yılında bu konuda yapılan araştırmalar hız kazandı (Songer ve Post, 2005). 1912 yılında Twort ve Ingram tarafından izole edildi. Bulunan bu bakteri kompleksi ile MAP % 95 benzerlik gösterdiği bildirildi (Thorel ve ark. 1990). MAP'ın fenotipik olarak memelilerde gelişme hızının yavaş olması ayırt edici bir özelliktir (Collins, 1997).

MAP hücrelerinin 1-2 günlük rejenerasyon süresi ve 3 haftalık kuluçka dönemi vardır (Lambrecht ve ark. 1988) Ancak, bu kuluçka dönemi genellikle 6 ay hatta bazı suşlarda 12 aya kadar uzar ve koloniler katı besiyerinde makroskopik olarak görünür (Songer ve Post, 2005). MAP'ın moleküler yapısı ve kültür özellikleri konusunda çok sayıda araştırma yapılmıştır (Pavlik ve ark, 1999; Stevenson ve ark, 2002). Bu araştırmalarda MAP'ın üç farklı alt tipi olduğu belirtilmiştir. Tip I ve Tip III koyunlarda tespit edilmiş ve kültürlerinin çok yavaş büyüdüğü görülmüştür ve bu tipler daha sonra nadir olsada sığır ve keçide de bulunmuştur (Whittington ve ark. 2001; De Juan ve ark. 2005 ve 2006). Tip II suşlarının kültürleri ise diğer tiplere oranla daha hızlı geliştiği bildirilmiştir. Pek çok ülkede ilk olarak sığırlarda görülen Tip II ye insanda da rastlanmıştır (Pavlik ve ark. 1999; Stevenson ve ark. 2002). İnsanlardaki Crohn hastalığında, sığırlarda oldukça yaygın olan aynı zamanda Johne hastalığına neden olan Tip II izole edilmiştir (Pavlik ve ark. 1999).

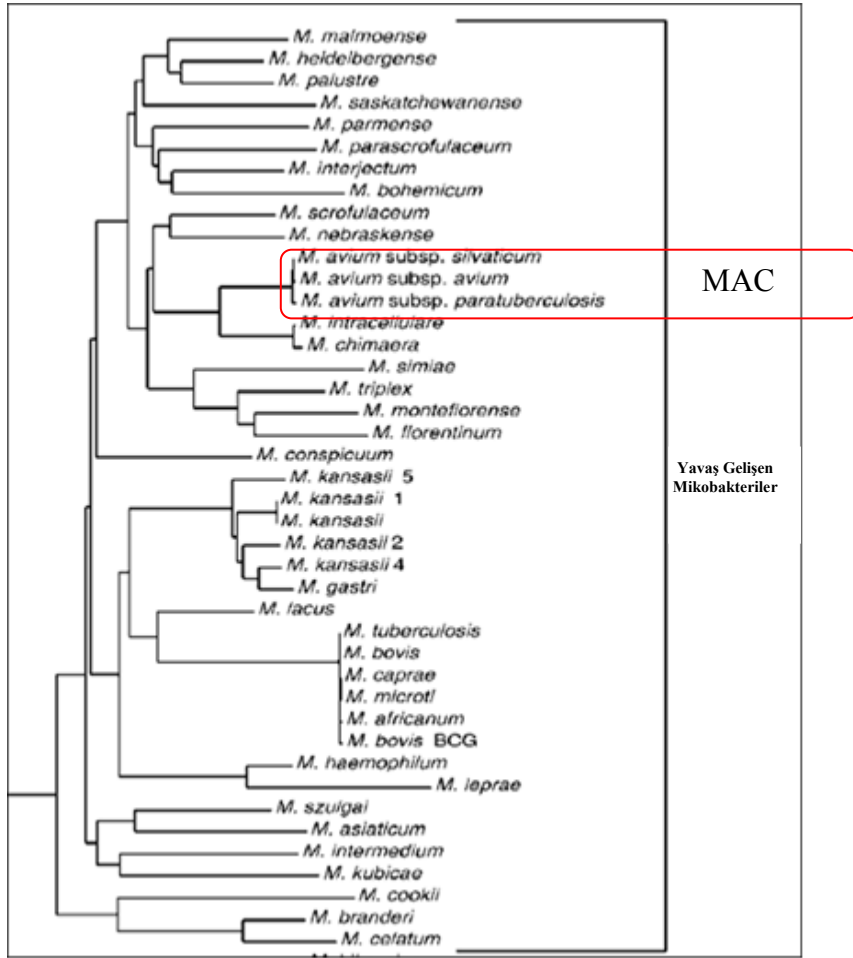
Mikobakteri türleri arasında ayrımsal tanı için kullanılan biyokimyasal testler MAP'ı analizlerinde önerilmemektedir. Nedeni olarakta organizmanın aşırı yavaş büyüme hızı nedeniyle oldukça zor olması ve uzun zaman almasıdır. Ancak Thorel ve ark., MAP- alt tipleri arasında ayırım için biyokimyasal testler ve sayısal taksonomik yöntemleri önermektedir. Bu çalışmalar sonunda MAP adının kabulüne ulaşılmıştır (Thorel ve ark., 1990).

### **2.2.1 Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri**

MAP, 0.5 x 1.5 mikron boyutlarında ve kümelenmiş şekilde bulunur (Mihajlovic ve ark., 2011). Diğer çomak şeklindeki bakterilere nazaran daha kalınca ve kümeleşme eğilimindedir. Hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz ve gram pozitif olan bakteri, ancak özel besi ortamlarında üretilebilir. Sığırdan başka geyik, lama, antilop, deve, koyun ve keçi gibi daha birçok çift tırnaklılardan da izole edilmiştir. Bulaşma, genelde oral yolla

sindirim kanalından, kirlenmiş su ve besinle gerçekleşir (Alibaşoğlu ve ark., 1973; Ayele ve ark. 2001).

Mikobakteriler, Mycobacteriaceae ailesinin tek cinsidir. İki ana gruba ayrılır ve yaklaşık 130 bilinen türü vardır: Bu gruplar 'yavaş büyüyen' ve 'hızlı büyüyen' olmak üzere ikiye ayrılır. MAP yavaş büyüyen sınıfta yer almaktadır. Bu sınıflandırma başlangıçta fenotipik özelliklere dayanmaktayken moleküler yöntemlerin gelişmesiyle günümüzde modern metotlara dayanmaktadır (Mignard ve Flandrois, 2008).



Şekil 2.1: Yavaş gelişen Mikobakteriler ve *Mycobacterium avium* kompleksi (Mignard ve Flandrois, 2008).

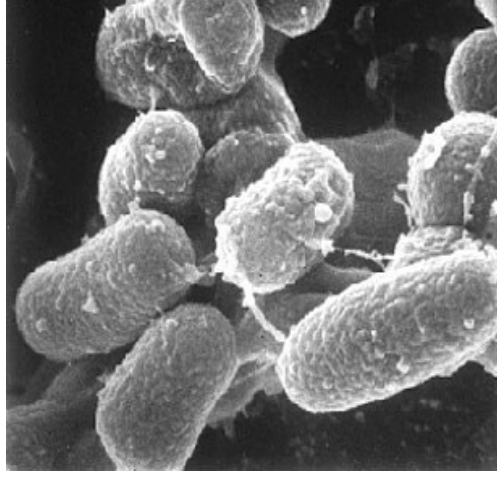
Genetik benzerliklere rağmen, birçok fenotipik özellikleri MAP'ı *Mycobacterium avium*'un diğer üyelerinden ayırt eder. MAP'ın farklı özelliklerinden bazıları şunlardır:

- MAP çok daha yavaş büyür. Yavaş büyüme patojenitenin etkisiyle ilişkilidir.
- MAP hücre sentezi için gerekli mikobaktin j olarak bilinen demir şelatını kendisi üretilmediğinden *in vitro* ekimlerde besi yerlerinde içermesi gerekir.
- MAP, enfekte ettiği organizmada bağışıklık sistemi hücrelerini etkileyerek hastalıklara neden olur. *Mycobacterium avium* kompleksinin çoğu üyeleri bağışıklık sistemi için atak fırsatçı patojenler olarak kabul edilir. Genç hayvanlar bilinmeyen nedenlerden dolayı yetişkinlerden MAP enfeksiyonuna karşı daha duyarlıdır.
- MAP enfeksiyonu genelde barsakların belirli bölgelerini (daha çok kolon ve terminal ileum bölgesi) hedef alır (Scanu ve ark., 2007)

MAP, hücre içi mikroorganizma olduğu için dış çevrede üreme gerçekleştiremez. Ancak, oldukça uzun bir süre dış çevrede canlılığını koruyabilir. Toprak ve su örneklerinde bulunan MAP, enfekte bir hayvandan kaynaklanan fekal kontaminasyon yoluyla bu çevrelerde biriktikten sonra çoğalmaksızın sabit kaldığı tespit edilmiştir (Bülte, 2006).

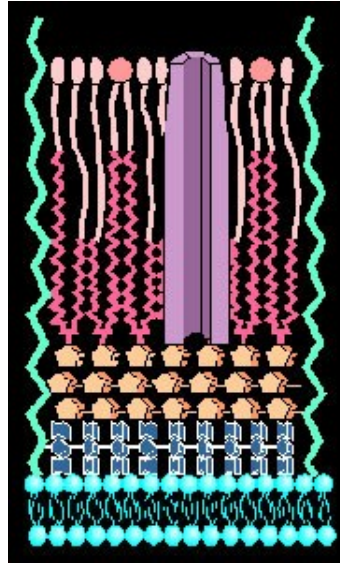
Bakterinin, türlere göre patojenitesi ve kültürel özellikleri farklı olan tipi olsa da, her suş, sığır, koyun ve keçileri enfekte edebilir ve hastalık oluşturabilir. Koyunlardan ve bazen sığırlardan izole edilen pigmentli bir suş, dokularda ve kültürde sarı-portakal renginde bir pigmentasyon meydana getirir. Ayrıca doku içerisinde hücre duvarının tam oluşmadığı ya da hücre duvarı oluşum bozukluklarında spheroblast formlar da oluşturabilirler ve bu formdaki MAP hücreleri dokulara yapılan aside dirençli boyama yöntemleri ile mikroskopik preparatlarda tespit edilememesine neden olabilirler. Bu spheroblast formundaki MAP hücreleri sadece moleküler bazlı yöntemler ile tespit

edilebilirler. Sekil 2.2’de MAP’ın Johne Bilgi Merkezi (JIC, 2011) tarafından Wisconsin Üniversitesi’nde yapılan elektron tarama mikrografisi verilmiştir.



**Şekil 2.2:** MAP elektron tarama mikrografisi (JIC, 2011).

Mikobakterilerin hücre duvarını polisakkaritlerle birlikte kalın mumsu bir lipid tabakası oluşturmaktadır. MAP’ın hücre duvarı diğer mikobakterilere birçok bakımdan benzerlik göstermektedir. Sekil 2.3’de tipik olarak Mikobakterilerin genel hücre duvarı şematize edilmiştir.



**Şekil 2.3:** MAP Hücre duvarı (JIC, 2011).

### 2.2.2 Doğada Bulunuşu ve Yaşama Süresi

MAP oldukça geniş konaklama yelpazesine sahiptir. Ruminantlar, memeli ve kuş türlerinde bulunmuştur. Bu canlılara örnek olarak; gelincik, kuzgun, tilki, karga, fare, tavşan, porsuk, tarla faresi, kır faresi, yaban domuzu, ayı ve vahşi kediler de verilebilir (Beard ve ark. 2001a; Kopecna ve ark. 2005;Palmer ve ark. 2005).

MAP, ısı, soğuk, güneş ışığı, kurutma ve dondurma gibi fiziksel faktörlere ve genel dezenfektanlara dirençlidir. Ancak formalin, fenolik ve kresilik dezenfektanlar bakteri üzerinde etkilidir. Dış çevrede, bakteri uzun periyodlarla canlılığını korur. Nehir suyunda 163 gün, göl suyunda 270 gün, sığır dışkısında ve toprakta 11 ay ve idrarda 7 gün canlı kalabilir. Dışkı bakteriostatik, idrar bakterisidal etkiye sahiptir (Füllgrabe, 2009). Tablo 2.1’de farklı koşullar ve ortamlarda MAP’ın hayatta kalma süreleri gösterilmektedir.

**Tablo 2.1:** Farklı koşullar ve ortamlarda MAP’ın hayatta kalma süreleri

Matriks	Ortam	Hayatta Kalma Süresi	Kaynaklar
Sığır dışkısı	Hava	246 gün	Lovellve ark. 1944
İçme Suyu	-	17 ay	Larsenve ark. 1956
Domuz ve Sığır Gübresi	5 °C	252 gün	Jorgensen, 1977
Sığır Gübresi	15 °C	98 gün	
Su	pH 5,3	8-9 ay	Collins ve ark. 2001
Toprak	Kuru Nemli	8 hafta %30 8 hafta %100	
Mera	Kuru ve gölgeli	55 hafta	Whittingtonve ark. 2004
Çamur	pH 12,5	72 saat	Flynnve ark. 2005
Durgun Su	-	36 hafta	Whittingtonve ark. 2005
Sığır Gübresi		56 gün	Grewalve ark. 2006

### 2.3. Paratüberküloz (Johne Hastalığı)

Paratüberküloz; sığırlarda *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*'in neden olduğu zayıflama ve kronik enteritis ile karakterize enfeksiyöz bir hastalıktır. MAP genellikle yaşamın erken dönemlerinde ortaya çıkar ve pek çok enfekte hayvanlarda kronik taşıyıcı olur (CFSPH, 2005). Diğer kullanılan isimleri ise Johne Hastalığı ve Enterit Paratüberkülozdur (Klee, 2006).

#### 2.3.1 Klinik, Patoloji ve Epidemiyolojisi

Paratüberküloz, sığırlarda, küçükbaş hayvanlarda ve yabani ruminantlarda tespit edilmiştir (Machackova ve ark. 2004; Godfroid ve ark. 2005). MAP enfeksiyonları dünya çapında özellikle sığır yetiştiriciliğinin çok olduğu bölgelerde, yoğun olarak ortaya çıkmıştır (Klee, 2006). MAP genellikle danalarda doğumdan sonraki ilk haftalarda enfekte olmakta, ilerleyen yaşlarda ise enfekte olma oranı azalmaktadır. Dışkıdan, süttten, gıdalardan dışkıyla kontamine olmuş su ve memeden sığırlara enfekte olmaktadır (Merkal, 1984). Oral alımdan sonra, MAP ince bağırsak mukozasında ve mezenferik lenf düğümlerinde vücuda alınır. Uzun bir inkübasyon periyodu sonucunda patolojik değişimler gözlenir ki bunların başında bağırsak mukozasındaki mononükleer fagositlerde sürekli artış gözlenir. Bu artışa bağlı olarak bağırsak mukozası kalınlaşır, malabsorbsiyon ve kronik ishal oluşur (Köhler ve ark. 2003). Kronik granülomatöz yangı genellikle ilyumun, sekuma geçiş bölgesinde yerleşir. Bu yangıdan sekonder lenf düğümleri, karaciğer, dalak ve bağırsak lenf düğümleri etkilenir (Füllgrabe, 2009). Hastalığın son aşamasında yüksek ishal ve enteral protein kaybına bağlı olarak ödem oluşmaktadır (Doll, 2006). Hastalık belirtileri, 2-3 yıllık uzun kuluçka döneminden sonra gösterir. Johne hastalığı tedavi edilemez olarak kabul edilir (Klee, 2006). Paratüberkülozun duyarlılığı sığırlarda genetik yatkınlık ile açıklanabilir. MAP dışkı, süt ve sperma ile atılabilir (Larsen ve ark. 1981). Enfekte hayvanların dışkılarında MAP,  $10^{12}$  KOB/g, sürekli enfekte hayvanlarda ise  $10^8$  KOB/g'dan fazla bulunmaktadır (Chiodini ve ark. 1984). Dışkı da MAP konsantrasyonu yüksek ise sütte de yüksektir (Sweeney ve ark. 1992). Hatta enfekte hayvanların sütünde belirgin olarak MAP dışarı atılmaktadır.

Paratüberküloz, AB devletlerinde göre geviş getiren hayvanlarda “Sürü veya sürü düzeyinde zorunlu veya isteğe bağlı olarak mücadele ve eradiksiyon önlemleri ile endemik hastalıkları izleme” listesinde yer almaktadır (Hayvan hastalıklarının listesi Grup 1; Konsey Kararı 90/424/EEC 26 Haziran 1990). Enfeksiyonların sadece küçük bir kısmı tespit ve rapor edilebileceğinden, bildirilen hayvan hastalıklarının nispeten az sayıda fakat dikkate alınması gerekmektedir. Paratüberkülozun yaygınlığı hakkında son on yılda çok sayıda araştırma yapılmıştır (Tablo 2.2). Kuzey ve Batı Avustralya’da paratüberküloz tespiti ve buna karşı alınacak tedbirler ücretsiz olarak yapılmaktadır (Kennedy ve ark. 2002). Tablo 2.2’de Bazı ülkelerde ve bölgelerdeki sığırlarda Paratüberkülozun MAP pozitif sürülerde prevalansı gösterilmektedir.

**Tablo 2.2:** Bazı ülkelerde ve bölgelerdeki sığırlarda paratüberküloz prevalansı

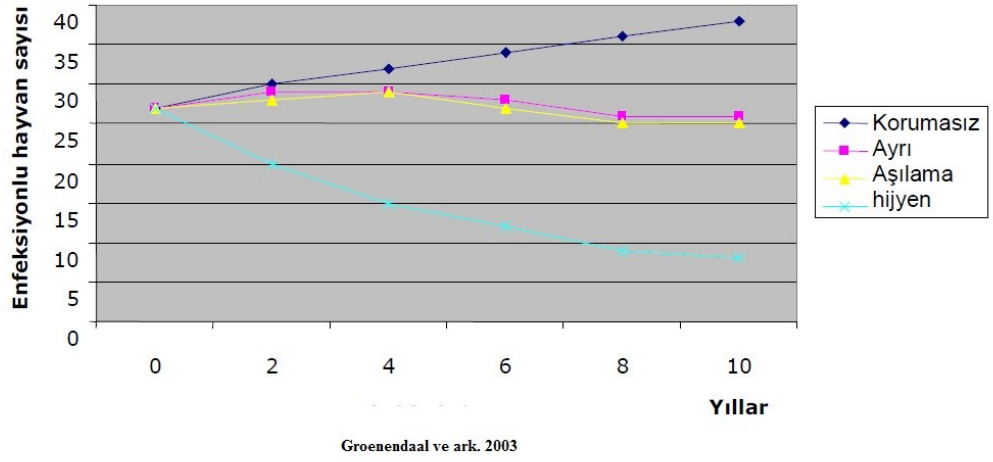
ÜLKE (ŞEHİR)	PREVALANS (%)	KAYNAKLAR
ABD (Wisconsin)	50.0	Collins ve ark. 1994
Avusturya	7.0	Gasteiner ve ark. 1999
Belçika	17,4	Boelaert ve ark. 2000
Danimarka	55.0	Nielsen ve Agger, 2000
İtalya (Lazio)	42.0	Lillini ve ark. 2005
İsviçre	8.0	Stärk ve ark. 1997
Hollanda	53.0	Van Schaik ve ark. 2003
Almanya (Arnsberg)	10-30	Bottcher, 1997
Almanya (Thüringen)	>80	Elschner ve Horner, 2003
Almanya (Meckl-Vorp.)	84.7	Hacker ve ark. 2004
Almanya (Sachsen)	90.5	Donat, 2005
Almanya (Bayern)	19,0	Bottcher ve Gangl, 2004

Federal Almanya Risk Değerlendirme Enstitüsüne göre sığır sürülerinde MAP Pozitivitesi ahır sayısı bakımından %30, keçi sürülerinde ise MAP Pozitivitesi %60’a kadar bulunmaktadır (Hacker ve ark. 2004).



Son yıllarda, Paratüberküloz ile mücadelede birçok yeni metotlar araştırıldı. Bu yöntemler arasında, enfeksiyonlu ve enfeksiyon bulaşmamış hayvanları ayırmak, bütün hayvanları aşılama ve ilk ayda sürekli bir hijyen programı geliştirilmesi bulunmaktadır. En son yöntem sürekli bir hijyen programı, aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi en etkili olanıdır (Groenendaal ve ark. 2003).

**Şekil 2.4: Paratüberküloz gelişiminde tedavinin etkisi**



### 2.3.2 Ekonomik Açıdan Paratüberküloz

Johne hastalığı olarak adlandırılan Paratüberküloz, sığır, keçi, koyun, manda, geyik ve diğer geviş getiren hayvanları etkiler. Dünya çapında yaygın olan Paratüberküloz, süt ve süt ürünleri sektöründe önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hastalığın tespiti, aşılama ve mikrobiyal genetikte son gelişmeler, aynı zamanda gıda zinciri de dahil olmak üzere, insan sağlığına etkileri Crohn hastalığı Paratüberküloz arasındaki bağlantıya işaret etmektedir (Behr, 2010).

Hayvan kaybına ek olarak süt ve döl veriminin azalması, aşırı kilo kaybı, daha az süt üretimi nedeniyle ortaya çıkan kayıplar, düşük doğurganlık ve düşük kilo gibi kayıplar bu hastalığa olan duyarlılığı artırmıştır (Köhler ve ark. 2003). Benedictus ve

ark.(1987)'a göre sondan bir önceki ve emzirme ile karşılaştırıldığında, önceki laktasyona kıyasla yaklaşık %5, hastalığın klinik aşamasında ise inekte %19,5 oranında süt verimi azalır. Subklinik hayvanlarda bu düşüş %6 ila %16 arasındadır (Benedictus ve ark. 1987; Ott ve ark. 1999). Stabel (1998) yapmış olduğu araştırmada mali kayıpların sürülerin üretim sistemleriyle alakalı olduğunu bildirmiştir. Bu mali kayıplar ABD'de 1,5 milyar dolar olarak tahmin edilmektedir.

### 2.3.3 Türkiye'de Paratüberküloz

Çok sayıda ülke sınırına sahip olan ülkemizin coğrafi konumu, salgın hastalık tehdidini sürekli kılmaktadır. Sığır vebası ile mücadelede başarı kazanılmış olsa da, Türkiye'de koyun ve keçi vebası, kuduz, şap, bruselloz, tüberküloz, **paratüberküloz**, mavidil, listerioz ve şarbon hastalıkları halen gözlenmektedir. AB Üye devletleri bu hastalıklarla mücadele programları başlatılmış ve bu programların bazılarında başarı elde edilmektedir. Türkiye'nin AB'ye üye olması halinde, hayvan ve hayvansal ürün hareketlerinde bu hastalıkların engel teşkil edeceği öngörülmektedir (Duman, 2005. AB Üyeliği Yolunda Türkiye'de Hayvan Sağlığı, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı).

Paratüberküloz Türkiye'de ilk kez 1928 yılında Sezginer ve 1932 yılında Akçay ve Erbil tarafından sığırlarda teşhis edilmiştir. Aynı hastalık 1968 yılında Hakioglu tarafından İzmit bölgesinde koyunlarda bulunmuştur. Keçi paratüberkülozu ise ülkemizde ilk olarak Alibaşoğlu ve ark. tarafından 1969 yılında tespit edilmiştir (Alibaşoğlu ve ark., 1973) Daha sonra 1983 yılında Yeşildere ve arkadaşları tarafından Marmara Bölgesi'nde (Gebze'de) bildirilmiş bu tarihten itibaren yapılan literatür taramalarında 1998 yılına kadar herhangi bir kayda rastlanmamıştır (Karadaş ve ark., 1998). Karadaş ve ark. tarafından 1998 yılında Elazığ'da bir keçide paratüberküloz olgusuna rastlanmıştır (Karadaş ve ark., 1998). Bu tarihten sonra 2007 yılında Konya sınırlarındaki Bozdağ'da paratüberküloz hastalığı nedeniyle koruma altında tutulan toplu halde ölmeye başlayan yaban koyunlarında olmuştur. Türkiye'de bulunmayan paratüberküloz aşısının yurt dışından getirilmesi için çalışmalar başlatılarak aşı 2009 yılından itibaren uygulanmıştır. 2009 ve 2010 yılında 3 yaş ve altı 332 yaban koyunu ile kuzusu aşınarak takibe alınmıştır (Tekeci, 2011).

### 2.3.4 Paratüberküloz ve Crohn Hastalığı

“Crohn hastalığı” 1932 yılında, Ginsburg ve Oppenheimer tarafından Crohn: sindirim sisteminde görülen bir hastalık olarak tarif edilmiştir. Crohn Hastalığı, dayanılmaz ağrı, sık ishal nöbetleri, malabsorbsiyon gibi belirtileri olan, kronik seyreden bir hastalık olarak bildirilmiştir (Nacy ve Buckley 2007). Tipik bir Crohn hastalığı için semptomlar; karın ağrısı (% 84), kilo kaybı (% 80) ve kronik ishal (% 79)'dir.

Son dönemde sığırlardaki Johne hastalığı ile insanlardaki Crohn hastalığının aynı etkene bağlı olacağı konusunda görüşler olmuştur (Scanu ve ark., 2007). Geçen yüzyılın başından beri süren düşünce ve tartışmalar günümüze kadar gelmiştir. Thomas Dalziel ilk defa sığır ve insanlarda kronik inflamatuvar barsak hastalığının Johne hastalığına benzer olduğunu belirtmiştir (Dalziel, 1913). Crohn hastalığının etiyolojisinde MAP'ın Crohn hastalığına neden olduğu görüşü sığırlardaki Johne hastalığının patomorfolojik benzer olmasındandır. Tablo 2.3'te Crohn hastalığı ve paratüberkülozun karşılaştırmalı klinik bulguları verilmiştir (Güner, 2004).

Epidemiyolojik çalışmalar, Crohn hastalığının etiyolojisinin araştırılması için büyük önem taşımaktadır. Hastalığı prevalansının her geçen gün arttığı bildirilmektedir. Avrupa'da sık görülen hastalık, neredeyse dünya çapında gözlenmiştir.

Yeni Zelanda, Kanada, İskoçya, Fransa, Hollanda ve İskandinavya'nın farklı bölgeleri yüksek insidanslı bölgeleri temsil ediyor. Asya'da prevalansının düşük olduğu fakat artma eğiliminde olduğu bildirilmiştir. Dünya genelinde Crohn hastalığının insidansı 100.000 nüfus ve hastalık olgusuna göre aşağıdaki tablodaki gibi bildirilmektedir (Economou ve ark., 2009).

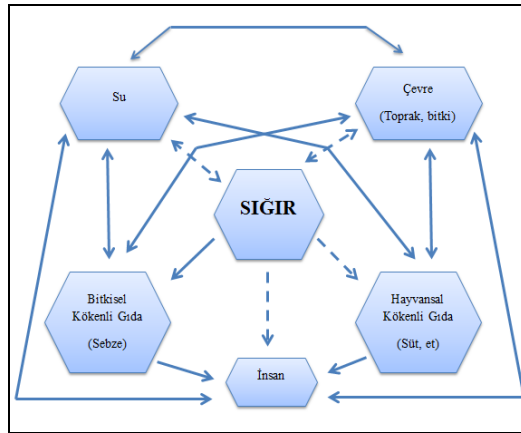
Türkiye'de Crohn hastalığı Avrupa'ya göre daha az, Ortadoğu ülkelerine yakındır. Erkeklerde kadınlara göre daha az görülmektedir (Şentürk, 2011).

**Tablo 2.3:** Crohn hastalığı ve paratüberkülozun karşılaştırmalı klinik bulguları

Klinik Bulgu	Crohn Hastalığı	Johne Hastalığı
Hastalığın görülme yaşı	Erken yaşlar	Erken yaşlar
Etkilenen bölge	Bağırsakların herhangi bir kısmı	İleumun son kısmı
Aralıklı lezyonların varlığı	Genellikle	Olabilir, fakat nadir
Yangı	Sıklıkla; transmural, ülserleşme, polip ve kanama yaygın	Genellikle çok yüzeysel ülserasyonlar, kanama çok nadir
Komplikasyon	Tıkanma, yırtılma ve fistül çok görülür	Tıkanma, yırtılma ve fistül nadir görülür
Granulomların varlığı	Evet	Evet
Bağırsak dokusunda aside dayanıklı bakterilerin varlığı	Nadir	Genellikle
MAP'a karşı immün cevap	Zayıf	İyi

## 2.4 Gıda Gruplarında MAP İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Gıda gruplarında MAP analizinde farklı metotlar kullanılarak var/yok tespiti ile miktarına ilişkin analizler yapılmaktadır. Türkiye’de gıdalarda MAP için bu zamana kadar sadece 1999 yılında Elazığ’da süt inekleri üzerinde yapılmıştır (Çetinkaya ve ark., 1999). Hayvansal ve bitkisel kökenli gıdaların, mikrobiyal patojenlerle kontaminasyonu genelde dışkı ve su ile olmaktadır. MAP fekal kontaminasyon yoluyla çevre ve su ile bulaşmaktadır. MAP stres koşullarına karşı yüksek dirençlidir (Larsen ve ark. 1956; Collins ve ark. 2001). Su ve toprakta dağılımı Şekil.2.5 ‘te gösterilmiştir.



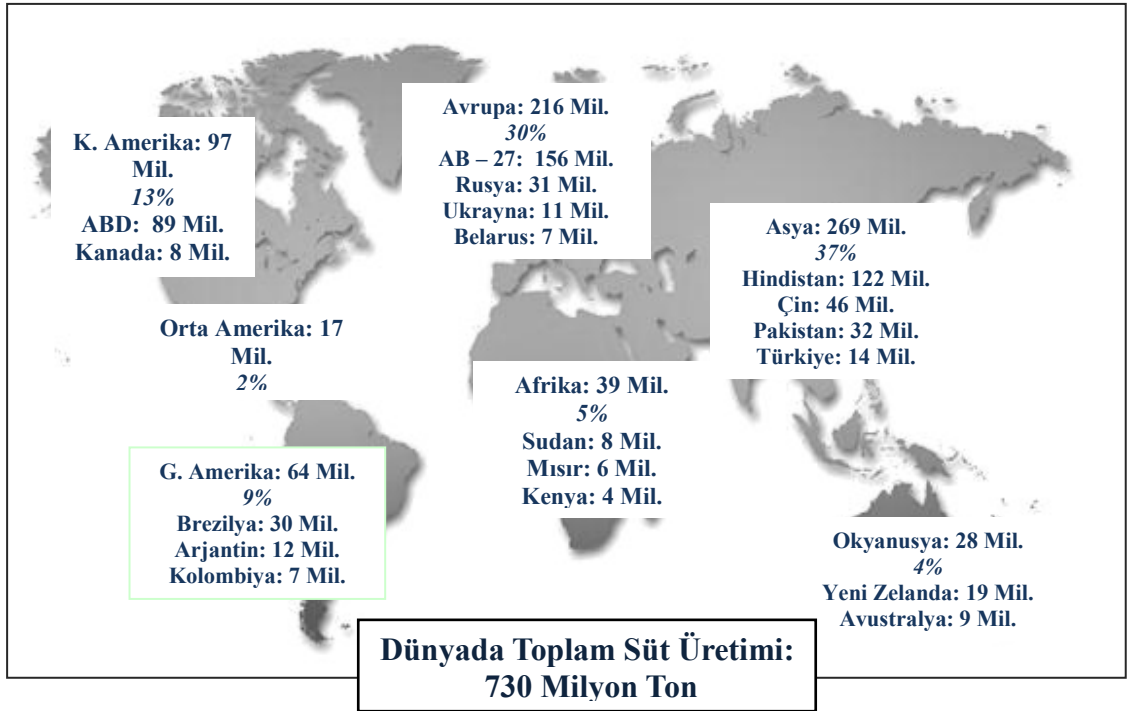
**Şekil 2.5:** MAP'ın dağılım ve iletimleri (Hammer, 2003)

**Tablo 2.4:** Crohn Hastalığının Dünya Genelindeki İnsidansı

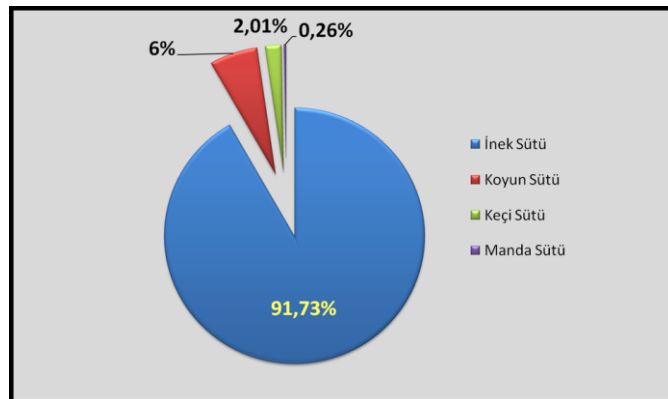
Ülke	İnsidans (Olgu/10 <sup>5</sup> )	Eğilim
Belçika	4,1-4,5	Minimum yükselen
Brezilya (Janeiro)	14,6	Yükselen
Kanada		
• Alberta	16,5	Yükselen
• Manitoba	15,4	Sabit
• Şili	Düşük	Yükselen
Hırvatistan (Rijeka)	6,5	Yükselen
Danimarka	8,6	Yükselen
Fransa	6,4-9	Değişken
Almanya	5,2	Kısmen Yükselen
Yunanistan		
• NW Yunanistan	0,9	Yükselen
• Girit	3	
Macaristan	4,68	Yükselen
İzlanda	5,5	Yükselen
İrlanda	6	Yükselen
İsrail	4,2-5	
İtalya	2,3	
Japonya	0,5-1,2	Yükselen
Lübnan	1,4	
Hollanda	6,9	
Yeni Zelanda	16,5	
Norveç	5,8	Değişken
Polonya	Düşük	
Portekiz	4,2	
Porto Riko		Yükselen
Suudi Arabistan	1,66	Yükselen
Slovakya	Düşük	
İspanya		
• Aragon	3,9	Yükselen
• Huelva	6,6	Sabit
• Vigo	5	
İsveç	8,9	Değişken
Birleşik Krallık		
• İngiltere ve Galler	5,9 – 11,1	Değişken
• İskoçya	11,7	
ABD (Minnesota)	7	Sabit

## 2.4.1 Süt

Süt; ülkemiz tarım ekonomisi içerisinde büyük paya sahiptir. Dünyada toplam süt üretimi 2011 yılında 730 milyon ton olarak belirlenmiştir (Özder, 2012). Dünya süt üretiminin %86'sını inek sütü üretimi oluşturmaktadır (Ataseven ve Gülaç, 2011). Türkiye'de süt üretimi 2002- 2010 yılları arası süt üretimi Tablo 2.5'te gösterilmektedir. Türkiye'de süt üretiminin % 91,73'ünü inek sütü oluşturmaktadır (TÜİK, 2010; Özder 2012).

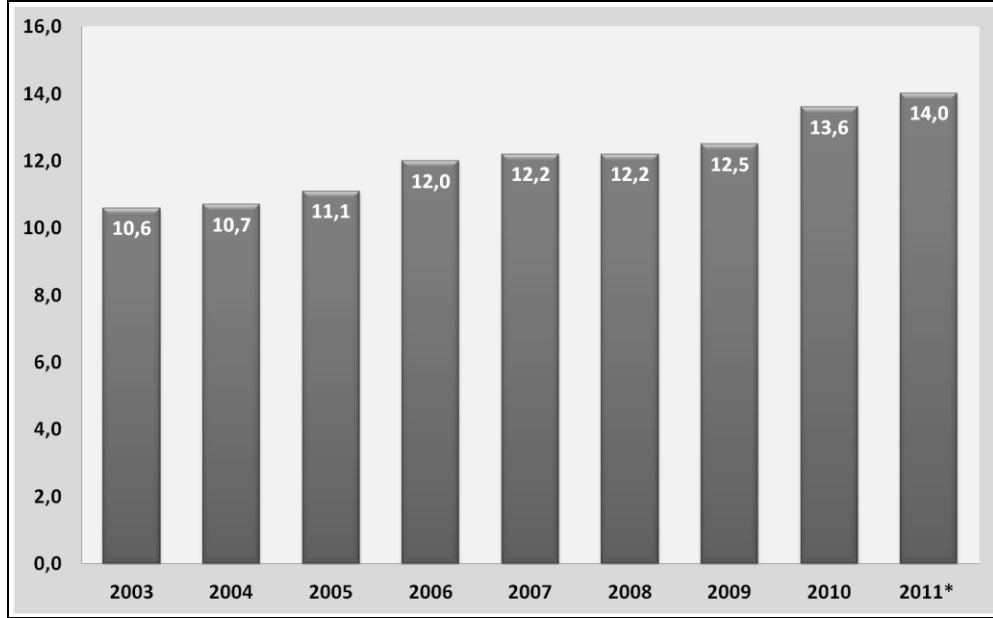


Şekil 2.6: 2011 Dünya Toplam Süt Üretimi (Özder, 2012)

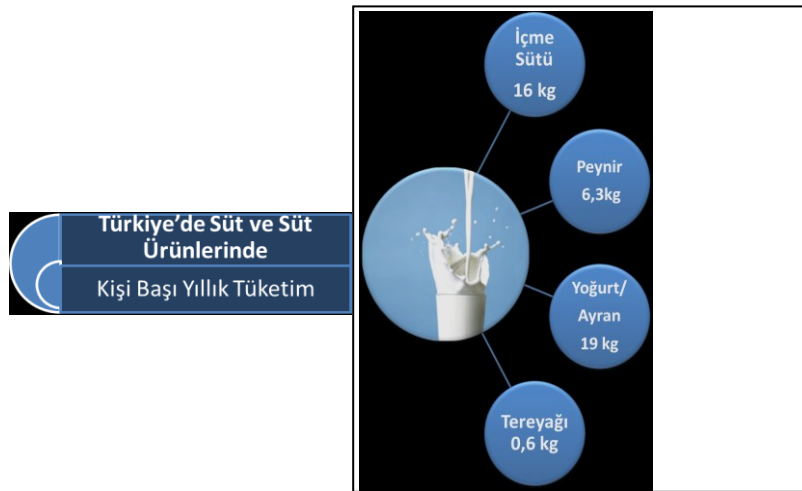


Şekil 2.7: Türkiye'de Toplam Süt Üretiminin Türlerine Göre Dağılımı

**Tablo 2.5:** 2002-2010 Süt Üretim Miktarındaki Değişim (Milyon Ton)



Kişi başına süt tüketiminde 2010 yılında bir önceki yıla göre genel olarak iniş ve çıkışların olduğu görülmektedir. AB’de %2’lik bir düşüşle 66,99 lt/kişi, Yeni Zelanda’da %1’lik düşüşle 78,2 lt/kişi, olurken Meksika’da %2’lik artışla 40,11 lt/kişi, Arjantin’de %1,4’lük artışla 48,56 lt/kişi, Çin’de ise %9’luk artış ile 12,35 lt/kişi, olarak gerçekleşmiştir (Ataseven ve Gülaç, 2011).Türkiye’de süt ve süt ürünlerinde yıllık tüketim Şekil 2.8’de gösterilmiştir.



**Şekil 2.8:** Türkiye’de süt ve süt ürünlerinde yıllık tüketim (Özder, 2012)

Ülkemiz ve dünyamız açısından önemli bir besin olan sütün pastörize edilmesi ve mikrobiyal patojenlerden arındırılması gerekmektedir. İnsanların MAP'a maruz kalması çiğ süt kaynaklı olduğu bildirilmektedir (USDA, 2010).

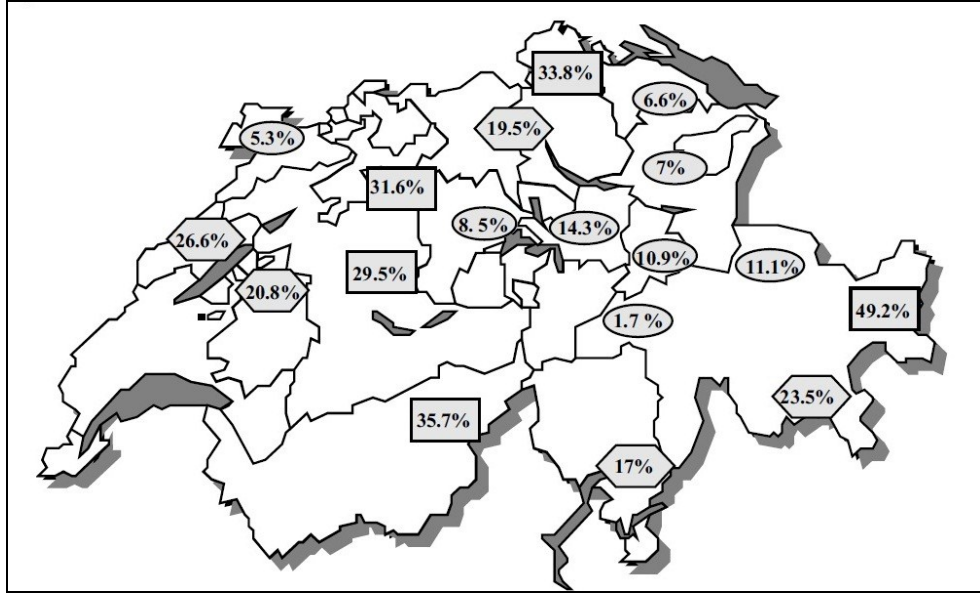
Sung ve Collins (1998) yapmış oldukları çalışma ile sütte MAP değerlerini belirlemişlerdir. Bu çalışmaya göre sığır ve insandan izole edilen örneklerle yapılan araştırma sonucunda, *Listeria*, *Salmonella*, ve *Coxiella* türleri için tahmin edilen değerler çıkarken, *M. bovis* için tahmini değerler verilmiştir. Bu değerler MAP'ın daha yüksek sıcaklıklarda ısıtılma işlemi uygulanacağı da açıklamaktadır. Uygulanan pastörizasyon işleminde (72-75 °C, 15-30 saniye) canlı organizmaların sayısını azaltırken MAP'ın bir kısmının hayatta kaldığı bildirilmektedir (WHO, 2004). Yapılan farklı araştırmalarda pastörize sütte sonuçlar çelişkili çıkmıştır. Hammer ve ark (2002) de kurmuş oldukları pilot pastörizasyon tesisi ile MAP varlığı 10<sup>1</sup> hücre/ml den yüksek olan sütlerde uygulanan pastörizasyon işlemlerinde MAP varlığını tespit etmişlerdir. Pastörize süt üzerine yapılan birçok araştırma bu sonucu desteklemektedir (Hammer ve Knapstein, 1998; ILSI, 2004; Paolicchi ve ark. 2005; Ayele ve ark. 2005).

#### **Uluslararası Araştırmalar:**

İngiltere'de yapılan araştırmada, 567 perakende pastörize inek sütü örneğinin PCR testi sonucunda % 11.8 MAP-pozitif çıkmıştır. Aynı örneklerde kültürel yöntemle yapılan çalışmada % 1,8 MAP-pozitif olduğunu saptamıştır (WHO,2004).

İsviçre'de 1384 süt tankından alınan örneklerden PCR yöntemiyle yapılan test sonucu 273 (% 19.7) MAP-pozitif çıkmıştır (Corti ve Stephan, 2002; WHO,2004). Ancak, İsviçre'nin farklı bölgelerinde %1.7 'den % 49.2'ye kadar değişen farklı prevalans değerleri saptanmıştır (Şekil 2.9). Bu durumun temel nedeni olarak subklinik MAP bulaşmış tüm hayvanlarda MAP atılımı değil, subklinik enfekte hayvanların yüksek olmasıdır. Bu durum hayvanlarda etkenin subklinik olarak dağılmasına bağlıdır. MAP prevalansının yüksek olması subklinik enfekte seyrine bağlıdır (Corti ve Stephan, 2002).





**Şekil 2.9:** İsviçre'nin farklı bölgelerinde süt tankı örneklerinde MAP yaygınlığı.

(□ yüksek prevalans ◊ orta prevalans ○ düşük prevalans)

Çek Cumhuriyeti'nde Yerel ve Ticari olarak satılan pastörize sütlerde MAP taraması sonucunda 244 ticari pastörize sütte kültür metoduyla yapılan araştırmada 4 pozitif sonuca ulaşılmıştır. Yerel olarak satılan köy sütlerinden alınan 200 süt örneği 71.7 °C'de 15 saniye pastörize edilmiştir. Bu süt örneklerinden 2'sinde MAP pozitif çıkmıştır ( Ayele ve ark. 2004).

Danimarka'da Paratüberküloz uzun bir süre için süt sığırcılığı işletmelerinde yaygın olmuştur ama sürünün düzey yaygınlığı tam olarak tespit edilmemiştir. Çeşitli bölgelerde, Danimarka süt sığırcılığı işletmelerinde Paratüberküloz prevalansını değerlendirmek amacıyla ELISA tekniğiyle MAP testi yapılmıştır. Ülkenin altı farklı bölgelerindeki altı süt toplama merkezinden 900 örnek toplanmıştır. Alınan örnekler test edilmiş ve %47 MAP pozitif sonucuna ulaşılmıştır (Nielsen ve ark., 2000, Corti ve Stephan, 2002). Bu sonuç toplam süt sürüleri için istatistiksel olarak hesaplandığında % 70 (duyarlılık% 97.1, özgüllük% 83.3) optimum pozitif sonucuna ulaşıldı. Son olarak enfeksiyonun önceki araştırmalara göre daha yaygın olduğu kanaatine varılmıştır (Nielsen ve ark., 2000).

Laboratuvarında sert peynir, yarı yumuşak peynir için kültür yöntemiyle yapılan çalışmada, MAP 28-45 gün gibi uzun bir süresiyle hayatta kaldığı bildirilmiştir (Sung ve Collins, 2000; Spahr ve Schaffroth,2001). Bu nedenle, peynir MAP için uygun yaşam ortamı kabul edilmelidir ( Ikonomopoulos ve ark. 2005; Stephan ve ark. 2006).

Hruska ve ark. (2005) yedi ülkeden çocuklar için üretilen, 51 süt tozundan üretilen bebek maması ürününü incelemiştir. Moleküler biyolojik açıdan IS900'a göre 25 (% 49.0) ve F57'ye göre 18 (% 35.3) MAP pozitif bulunmuştur. Kültürel incelemede ise bir örnek pozitif olduğu bildirilmiştir.

Akineden ve ark. (2006) Almanya'da 59 bebek maması örneğinde yapılan kültürel çalışmada 4 pozitif sonuç çıkmış ve bu sonuç moleküler biyolojik yöntemle de doğrulanmıştır.

Millar ve ark. (1996), İngiltere'de Eylül 1991 ile Mart 1993 arasındaki iki yıllık periyotta inceledikleri 312 pastörize süt ve süt ürünleri örneğinde PCR yöntemiyle 18 MAP pozitif sonucuna ulaşmışlardır. 18 PCR pozitif süt örneğinin sıvı besi yerlerinde 13 ile 40 haftalık inkübasyon sonrasında, 9 (%50)'undan, 36 PCR negatif örneğin 6(%16)'sından, pozitif sonuç aldıklarını ifade etmişlerdir ( Millar ve ark. 1996).

İrlanda'da Mart ve Eylül 1999 tarihleri arasında, yedi farklı süt işletmesi toplama tankından toplam 310 süt örneğini buna ek olarak, sekiz mandıra ve iki süt işletme sektöründen 9 pastörize keçi sütü, aynı dönemde perakende satış mağazalarından 77 pastörize inek sütünde inceleme yapmışlardır. BACTEC ® 12B ve HEYM agar kültürel tanı ile çalışılmış ve sonuç olarak toplam 396 numunenin tamamı negatif sonuç çıkmıştır ( O'Doherty ve ark. 1999).

Slana ve ark., (2008) süt ve süt ürünlerinde kültür yöntemiyle MAP tespiti ile ilgili araştırmalarının sonuçlarını hazırladıkları bir araştırma yazısında ülkelere göre MAP tespitlerini aşağıdaki tabloda belirtmişlerdir.

**Tablo 2.6:** Ükelere göre inek sütünde kültürel yöntemle MAP tespiti

Ülke	İncelenen Örnekler			Referans
	Sayı	Pozitif	%	
Arjantin	25	2	8,3	Paolicchi ve ark. (2003)
Avustralya	26	9	35,0	Taylor ve ark. (1981)
Çek Cumhuriyeti	244	4	1,6	Ayele ve ark. (2005)
	100	2	2,0	
İrlanda	389	1	0,3	O'Reilly ve ark. (2004)
	357	0	0,0	
İngiltere	312	15	4,8	Millar ve ark. (1996)
	60	4	6,7	Grant ve ark. (2002b)
	144	10	6,9	
	816	27	3,3	Grant ve ark. (2005)
Amerika	77	9	11,6	Sweeney ve ark. (1992)
	126	3	2,4	Streeter ve ark. (1995)
	7	2	28,6	Naser ve ark. (2000)
	8	0	0,0	Stabel (2001)
	156	0	0,0	Stabel ve ark. (2002)
	20	1	5,0	Pillai and Jayarao (2002)
	211	9	4,0	
	1493	43	2,8	Jayarao ve ark. (2004)
	29	6	20,6	
	702	20	2,8	Ellingson ve ark. (2005)

### **Türkiye’de Yapılan Çalışmalar:**

Çetinkaya ve ark. (1999) tarafından Elazığ ve çevresindeki süt ineklerinde paratüberkülozun prevalansını tespit etmek amacıyla yapılan çalışmada toplam 78 köyden 500 süt numunesi toplanmıştır. Toplanan süt numunelerinde hastalık etkeninin DNA’sını saptamak amacıyla MAP’a spesifik bir sekans olan IS900 ile kombine edilmiş bir Polimeraz Zincir reaksiyonu (PCR) kullanılmıştır. Metodun sensitivitesi, negatif olduğu bilinen süt örneklerine referans MAP kültürünün bir seri sulandırılması ( $1 \times 10^9$ -10 bakteri/ml) ile saptanmıştır. Bu örneklerden ekstrakte edilen DNA’ların PCR’de amplifikasyonu ve agaroz jel elektroforez analizinde 1 ml sütte yaklaşık 50

bakteri tespit edilmiştir. 500 süt rneğinde PCR yöntemiyle yapılan incelemede 25 (%5) numune MAP pozitif çıkmıştır (etinkaya ve ark.1999).

Bu alışmada Avrupa Birliğince patojen mikroorganizmalar tarafından arındırılmış bölge olarak ilan edilen Marmara Bölgesindeki mevcut süt işletmelerinde MAP varlığının PCR yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır.

### 3. MATERYAL ve METOT

Bu araştırma Trakya bölgesi Keşan ilçesi sınırları içinde yerleşik 15 köyde mevcut 30 adet süt sığırcılığı işletmesinde yürütülmüştür. Araştırmada dışkı ve süt örnekleri alınarak MAP taraması yapılmıştır. İşletmelerde mevcut 2 yaş üzeri ineklerden direkt rektal yolla toplam 270 adet dışkı numunesi alınmıştır. Ayrıca her işletmenin süt toplama tankından toplam 30 adet süt ve her köyün süt toplama tankından toplam 15 adet süt örnekleri toplanmıştır (Tablo 3.1). Toplanan örneklerde Real Time PCR yöntemiyle *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) varlığı incelenmiştir.

#### 3.1 İstatistiksel Hesaplama

Türkiye için MAP prevalansı tespitine yönelik araştırmalar literatürde bulunmamaktadır. Bu çalışmada örnek alınacak minimum işletme ve hayvan sayıları istatistiksel olarak Avrupa Birliği prevalans verileri baz alınarak incelendi. MAP pozitif işletme ve MAP pozitif hayvan örnek sayılarını belirlemek için uluslararası bilimsel çalışmalarda kullanılan geçerli, güvenilir ve basit istatistiksel yöntemler tercih edildi.

##### 3.1.1 İşletmelerin Seçimi

*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) pozitif işletme prevalansı tespiti için örnek alınacak minimum işletme sayısı **Johnson-Ifearulundu ve arkadaşlarının** (1998) istatistiksel yöntemi kullanılarak bulundu. Örnek Alınacak Minimum İşletme sayısı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$N_1 = \frac{P_h(1-P_h) Z}{e^2} (1-\alpha/2)^2$$

$N_1$  = Örnek alınacak minimum işletme sayısı

$P_h$  = Tahmini MAP pozitif işletme prevalansı (Avrupa Birliği ortalaması, %80)

$\alpha$  = 1.Tip Hata olasılığı (%5)

$e$  = Maksimum kabul edilebilir hata oranı (%10)

**Z** = Standart normal değişkeni (1.96)

Hesaplamaya göre “*Örnek Alınacak Minimum İşletme Sayısı*” ( $N_1$ ) toplam 30 adet olarak bulunmuştur.

### 3.1.2 Hayvanların Seçimi

*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) pozitif hayvan prevalansı tespiti için örnek alınacak minimum hayvan sayısı **Johnson-Ifearulundu ve arkadaşları** (1998) ile **Naing ve arkadaşlarının** (2006) kullandıkları istatistiksel yöntemler ile hesaplandı.

$$N_2 = \frac{Z^2 P (1-P)}{d^2}$$

**$N_2$**  = Örnek alınacak minimum hayvan sayısı

**P** = Tahmini MAP pozitif hayvan prevalansı (Avrupa Birliği ortalaması, %5)

**Z** = Standart normal değişkeni (1.96)

**d** = Hassasiyet değeri

Hassasiyet değeri (**d**) **Niang ve arkadaşlarının** (2006) yaptıkları çalışmada verilen Tablo 2.'ye göre 0.025 alındı. Hesaplamaya göre “*Örnek Alınacak Minimum Hayvan Sayısı*” ( $N_2$ ) 270 olarak bulundu.

Minimum işletme sayısı ( $N_1$ ) 30 ve minimum hayvan sayısı ( $N_2$ ) 270 olarak hesaplandığı için, her bir işletme için örnek alınacak minimum hayvan sayısı 9 olarak tespit edildi.

### 3.2 Örnek Alımı

Araştırma için dışkı ve süt örnekleri Keşan ilçesi sınırları içinde faaliyet gösteren ve rastgele seçilen işletmelerden ve işletmelerin yerleşik olduğu köylerden alındı. Dışkı örnekleri eldiven yardımıyla ineklerden direkt rektumdan alınarak steril numune kutularına (Fıratmed Steril Numune Kabı/Türkiye) konuldu. Kutular steril kapak ile kapatıldı. Örnekler soğuk taşıma kaplarında hızlı şekilde İstanbul Aydın Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına +4°C'de korunarak taşındı ve -20°C' de saklamaya alındı. Tablo 3.1' de işletmelerin bulunduğu köy ve bu köydeki işletmelerden alınan dışkı ve süt örnekleriyle ayrıca köydeki süt toplama tankından alınan süt örneklerinin sayısı bildirilmiştir.

### 3.3 Metot

Toplanan dışkı ve süt örnekleri Real-Time PCR yöntemiyle MAP varlığı bakımından incelendi. Dışkı örneklerinde var olan atık maddelerin DNA izolasyon performansını etkilememesi için Roche Star Buffer ve Roche Lizozim kullanılarak bir ön yıkama (hazırlık) işlemi yapıldı. Ön işlemi geçen örnekler Eurofins GeneScan GENESpin DNA izolasyon kiti kullanılarak izole edildi. Elde edilen DNA örnekleri Transmit GmbH MAPSure Easy kiti prosedürü takip edilerek Real Time PCR yöntemiyle MAP varlığı bakımından incelendi.

**Tablo 3.1:** Dışkı ve Süt Örneklerinin Alındığı İşletmeler ve Örnek Sayıları

Örnek Alınan			Örnek Sayıları		
No	Köy Adı	N <sub>1</sub> <sup>(a)</sup>	N <sub>2</sub> <sup>(b)</sup>	N <sub>3</sub> <sup>(c)</sup>	N <sub>4</sub> <sup>(d)</sup>
1	Bahçeköy	2	18	2	1
2	Çamlıca	2	18	2	1
3	Çobançeşme	2	18	2	1
4	İzzetiye	2	18	2	1
5	Karahisar	2	18	2	1
6	Karasatı	3	27	3	1
7	Karlıköy	2	18	2	1
8	Kılıçköy	1	9	1	1
9	Küçükdoğanlı	2	18	2	1
10	Lalacık	2	18	2	1
11	Orhaniye	2	18	2	1
12	Paşayığıt	2	18	2	1
13	Pırnar	3	27	3	1
14	Silli	1	9	1	1
15	Türkmen	2	18	2	1
<b>Toplam</b>		<b>30</b>	<b>270</b>	<b>270</b>	<b>15</b>

### 3.3.1 Kit Malzemelerinin Hazırlanması

Çalışmaya başlamadan önce Roche Lizozim, C4 solüsyonu, C5 Buffer ve Proteinaz K solüsyonları kit prosedürleri takip edilerek hazırlandı. Roche Lizozim elde edebilmek için; 1 ml TE (Tris-EDTA) Buffer ile 20 mg Lizozim enzimi falkon tüp

<sup>a</sup> N<sub>1</sub> : Örnek alınacak minimum işletme sayısı

<sup>b</sup> N<sub>2</sub> : Dışkı örnek sayısı

<sup>c</sup> N<sub>3</sub> : İşletmeden alınan süt örnek sayısı

<sup>d</sup> N<sub>4</sub> : Köy süt toplama tankından alınan süt örnek sayısı



içerisine konuldu. Vorteks karıştırıcıda homojenize edildi. C4 solüsyonu elde etmek için C2 Buffer solüsyonu C3 Buffer şişesinin içerisine döküldü. Vortekslenerek homojen hale getirildi. Hazırlanan C4 solüsyonu 45°C’ de 5 dakika su banyosunda ısıtıldı. C5 Buffer solüsyonu için mevcut C5 Buffer şişesine 80 ml %96’lık etil alkol eklenip, karışım vortekslenerek homojenize edildi. Proteinaz K enzimini elde edebilmek için Proteinaz K Buffer şişesinden 600 µl pipetlenerek Proteinaz K tozu bulunan şişeye aktarıldı. Karışım vortekslenerek iyice homojen hale getirildi. Hazırlanan Proteinaz K solüsyonu -20°C’ de saklamaya alındı.

### **3.3.2 Ön Hazırlık: Yıkama İşlemi**

DNA izolasyonuna geçilmeden önce dışkı ve süt örneklerinde var olan yabancı maddelerin DNA izolasyon performansına olumsuz etkilerini önlemek için ön işlem olarak yıkama uygulandı.

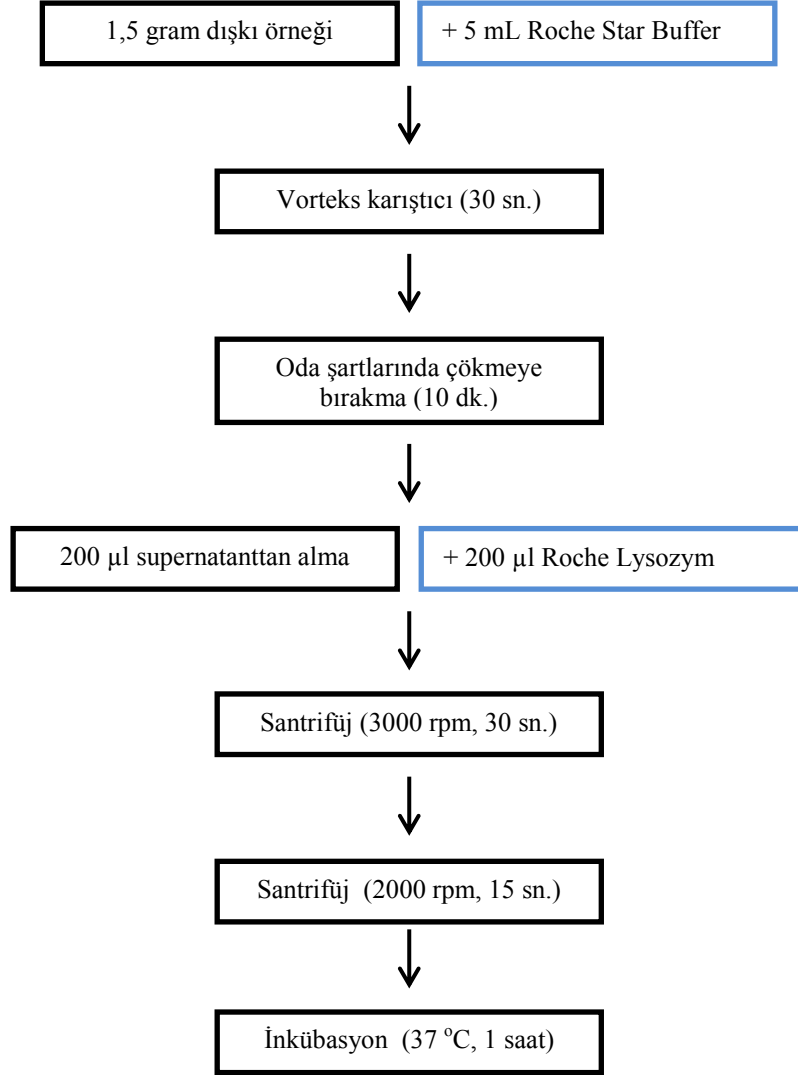
#### **3.3.2.1 Dışkı Örneklerinde Yıkama İşlemi**

1.5 gram dışkı örneği steril falkon tüpüne konuldu. Üzerine 5 ml Roche Star Buffer solüsyonu eklendi. Vorteks karıştırıcıda 30 saniye karıştırıldı. Karışım 10 dakika oda şartlarında dinlenmeye ve çökmeye bırakıldı. Tüp içinde ayrı faz haline geçen berrak supernatant kısımdan 200 µl pipetlenerek Magnalyser tüpe konuldu. Üzerine 200 µl Roche Lizozim enzimi eklendi. Karışım önce 3000 rpm’ de 30 saniye ve sonra 2000 rpm’ de 15 saniye santrifüj edilerek 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.1).

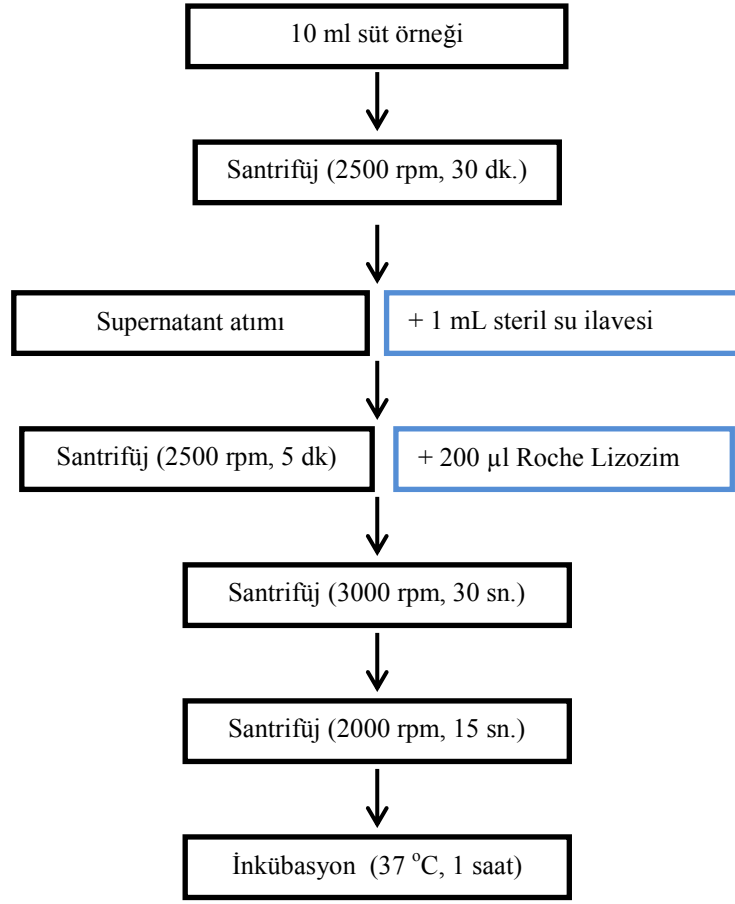
#### **3.3.2.2 Süt Örneklerinde Yıkama İşlemi**

10 ml süt örneği steril falkon tüpüne alınarak 2500 rpm’de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra çökelti üzerinde duran berrak supernatant atıldı. Sediment üzerine 1 ml steril su eklendi. Vorteks karıştırıcıda homejenize edilen örnek 2500 rpm’de 5 dakika daha santrifüj edildi. Sediment üzerine 200 µl Roche Lizozim eklendi. Karışım Magnalyser tüpe alındı. Karışım önce 3000 rpm’ de 30 saniye ve sonra

2000 rpm' de 15 saniye santrifüj edilerek 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.1: Dışkı Örneklerinde Yıkama İşlemi



**Şekil 3.2:** Süt rnekleri için n Hazırlık

### 3.3.3 Dışkı ve Süt rneklerinde DNA İzolasyonu

Dışkı ve süt örneklerinde DNA izolasyonu Eurofins *GENESpin* DNA İzolasyon kiti (Lot:1101/006, Cat. No:5224400605) prosedürü takip edilerek yapıldı. CF Liziz Buffer, steril bir eppendorf tüpe numune başına 500 µl pipetlendi. 65°C’de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen CF Liziz Buffer 400 µl n zenginleştirme solüsyonu bulunan eppendorf tp üzerine eklendi. Vorteks karıştırıcıda 15 saniye karıştırıldı. 10 µl Proteinaz K eklendi. Eppendorflar 65 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Eppendorfta bulunan karışım 10000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda hücre artıkları dibe okt. 600 µl supernatant, 2 ml’lik eppendorf tp içinde 600 µl C4 ve 600 µl etanol ile karıştırıldı. Karışım 10 saniye vortekslendi.

Eppendorf tüpünde toplam 1800 µl solüsyon elde edildi. Bu solüsyondan 700 µl *GENESpin* kolonundan geçirilerek filtreleme işlemi yapıldı. Filtre altında bulunan kolona geçen kısım uzaklaştırıldı. Filtrede kalan kısım tekrar bir kez daha kolondan geçirilerek filtrelendi. Filtre üstü 11000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilerek, 400 µl CQW filtreli kolona pipetlendi ve 11000 rpm'de 1 dakika daha santrifüj yapıldı. Kolona geçen sıvı kısım döküldü ve filtreli kısım tekrardan kolona geçirildi. Bu işlemlerden sonra saf DNA elde edebilmek için yıkama aşamasına geçildi. 650 µl C5 Buffer filtreli kolona pipetlendi ve 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Kolona geçen sıvı kısım döküldü ve filtreli kısım tekrardan kolona geçirildi. Bu işlem 2 kere daha tekrarlandı. Daha sonra, 200 µl C5 Buffer filtreli kolona pipetlendi ve 11.000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Kolona geçen sıvı kısım döküldü ve filtreli kısım tekrardan kolona geçirildi. Elüsyon Bufferdan numune başına 100 µl yeni steril bir eppendorfa pipetlendi ve 70 °C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. *GENESpin* kolonu yerine yeni steril bir eppendorf tüpü konuldu. Elüsyon Buffer CE, inkübasyon sonunda filtreli tüpe pipetlendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı. 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Elüsyon buffer DNA'nın filtreden çözünmesini sağladı. Üstteki filtreli tüp atıldı ve santrifüj sonunda eppendorfta kalan kısım DNA elde edildi (Şekil 3.4).

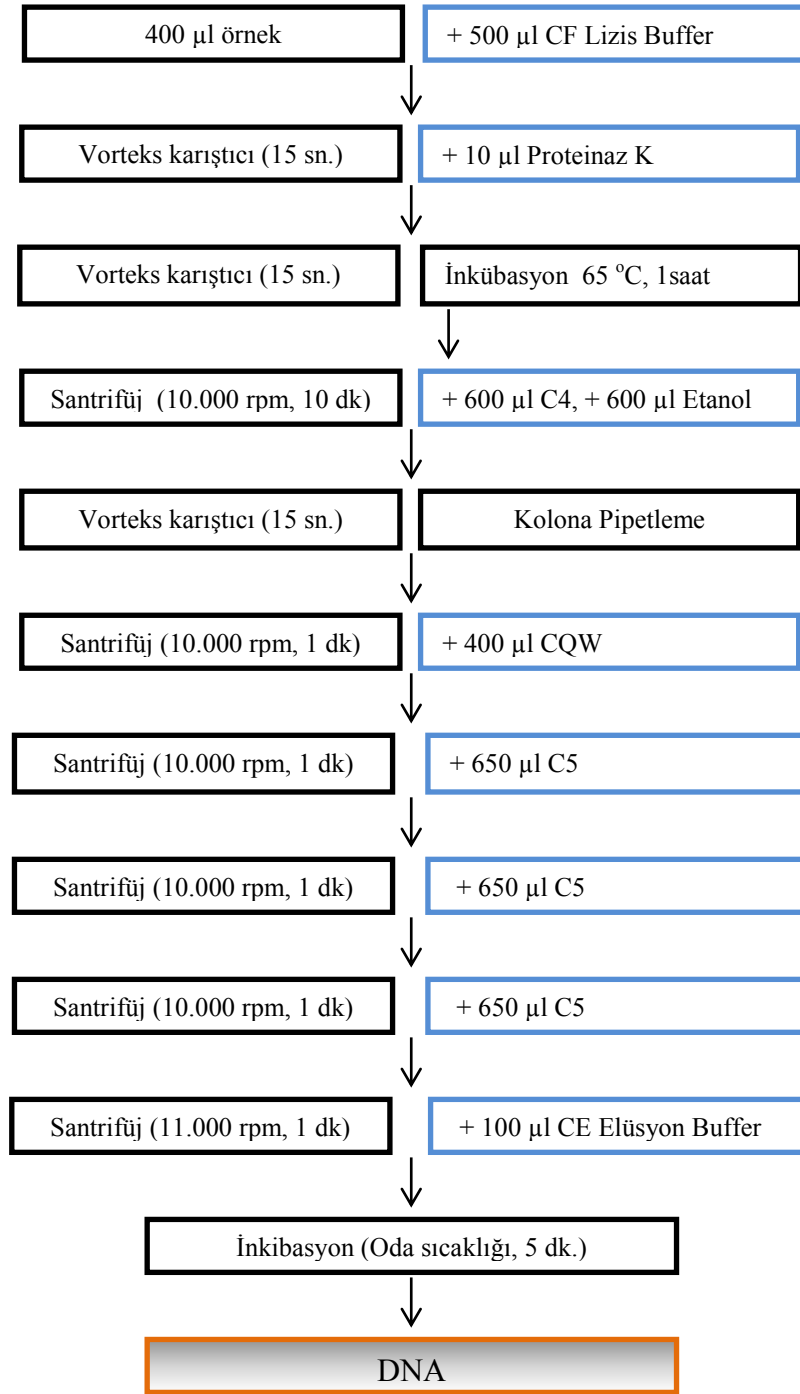
### **3.3.4 Real-Time PCR Yöntemiyle MAP Taraması**

Dışkı ve süt örneklerinden izole edilen DNA örneklerinde MAP varlığı taraması için MAPsureEasy® Kit (TransMIT GmbH, Giessen, Germany) prosedürü takip edilerek Real Time PCR cihazı Agilent Stratagene Mx3000P kullanılarak inceleme yapıldı.

#### **3.3.4.1 MAPSureEasy® Kit Prosedürü**

MAPsureEasy® Kit içerisinde reaktifler kullanıma hazır olduğu için prosedür takip edilerek Real Time PCR aşamasına başlanıldı. Hazırlıklar ve çalışma esnasında kit solüsyonlarının ışıktan etkilenmemesine, Master Mix ve hazırlanan plakaların buz blok içinde korunmasına dikkat edildi. Real Time PCR aşaması master mix hazırlanarak başlatıldı. Örnek başına 12,5 µl 2x qPCR Master Mix, 1 µl 25x MAP oligonükleotid mix, 1 µl Internal Amplifikasyon Kontrol Solüsyonu ve 5.5 µl steril su konuldu. Plakada her kuyuya 20 µl Master Mix ve 5 µl DNA pipetlendi. Negatif kontrol kuyusuna steril su ve pozitif kontrol kuyusuna kitte hazır bulunan MAP DNA'sı

konuldu. Plaka kapağı dikkatlice kapatıldı. Hazırlanan plaka Real-Time PCR cihazına yerleştirildi. HEX floresans boya seçildi. Isıl döngü ayarları yapıldı. 95 °C’de 10 dakika bir döngü; 95 °C’de 15 saniye ve 60 °C’de 1 dakika olmak üzere toplam 45 defa ikinci ısıl döngü uygulandı.



Şekil 3.3: Dışkı ve Süt örnekleri için DNA İzolasyonu

Real-Time PCR MAP primeri için; Schöenenbrücher ve ark. (2008) ile Abdulmawjood ve ark. (2009)'nın yaptıkları çalışmalar baz alındı. “A New Triplex Real-Time PCR Assay for Detection of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* in Bovine Feces” makelesine göre primerler dizayn edilmiş şekilde hazır alındı.

**Tablo 3.2:** Oligonükleotid primerler, Flourogenik problemleri ve iç amplifikasyon dizileri

Primer <sup>(a)</sup>	Sekans	Gen tespiti
F57-F	5'-TAC GAG CAC GCA GGC ATTC-3'	244-263
F57-R	5'-CGG TCC AGT TCG CTG TCA T-3'	288-307

### 3.4 Sonuçların Okunması ve Değerlendirme

Real Time PCR cihazında ısıl döngü süreci tamamlanınca yazılım kullanılarak elde edilen sonuçlar incelendi. Negatif ve pozitif kontrol kuyularının sorunsuz çalıştığı görüldü. Ct değerinin 40'ın altında pik vermesi durumunda MAP pozitif, 40'ın üzerinde pik vermesi durumunda ise MAP negatif olarak değerlendirildi. Ct değerleri Tablo 4.1, Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'de sunulmuştur.

<sup>a</sup> Oligonükleotid primerleri MWG Biotech (Ebersberg, Almanya) tarafından dizayn edilmiştir.

## 4. BULGULAR

MAP genlerinin sütte ve dışkıda yapılan Real Time PCR yöntemiyle yaptığımız araştırmamızın sonucunda bu genin varlığına rastlanmamıştır. Çalışmalarımızda Edirne ili Keşan ilçesi sığırcılık işletmelerinden 270 dışkı, 30 işletme tank sütü ve 15 köy sütü numunesi alınmıştır. Real Time PCR çalışmamızda tüm örnekler için çalışılmıştır. Tablo 4.1’de dışkı örneklerini toplama yerleri ve analiz sonuçları verilmektedir. Tablo 4.2’de işletme süt örneği ve Tablo 4.3’de köy süt toplama tankı süt örneklerinde MAP analiz sonuçları verilmektedir.

### 4.1 İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmalarda gerçek prevalans değerleri hesaplanırken kullanılan istatistiksel yöntemlerin geçerlilik, güvenilirlik, kapsam ve basitlik gibi özellikleri dikkate alınmaktadır. Tespit yöntemlerinin hassasiyet ve seçicilik özellikleri tahmini prevalans değerlerinin gerçek şekilde hesaplanmasında önemli rol oynamaktadır. Belirsizlikler gerçek prevalansı değerini geniş bir aralıkta sunmaktadır. Bu araştırmamızda Türkiye için MAP prevalansını ortaya koyan bilimsel çalışmalara literatürde rastlanmaması nedeniyle örnek alınacak minimum işletme ve hayvan sayılarının istatistiksel hesaplamasında Avrupa Birliği maksimum MAP prevalans verileri baz alınmıştır. MAP pozitif işletme prevalansı %80 ve MAP pozitif hayvan prevalansı %5 olarak kabul edilmiştir.

Johnson-Ifeorunwa ve arkadaşlarının (1998) ile Naing ve arkadaşlarının (2006) istatistiksel yöntemleri uygulanarak örnek alınacak minimum işletme sayısı ( $N_1$ ) 30 ve örnek alınacak minimum hayvan sayısı ( $N_2$ ) 270 olarak bulunmuştur. Analiz sonuçları SPSS İstatistik Programı 17. Sürümü kullanılarak incelenmiştir. Dışkı ve tüm çiğ süt örneklerinde MAP varlığı bakımından yapılan incelemede MAP pozitif sonuç bulunmamıştır. Bu bakımdan Keşan Bölgesinde MAP pozitif işletme ve MAP pozitif hayvan prevalansını ( $p < 0.05$ ) MAP pozitif işletme ve MAP pozitif süt örnekleri için (Ortalama:0, Standart sapma: 0) ispatlayacak yeterli kanıt ortaya konulamamıştır.

**Tablo 4.1:** Dışkı örneklerinde toplama yerlerine göre Real Time PCR yöntemiyle MAP tespiti

Sıra No.	Örnek No.	Yer	Real Time PCR sonucu (var/yok)	Ct değeri < 40	Ct değeri > 40
1	X1	A	-	-	+
2	X2	A	-	-	+
3	X3	B	-	-	+
4	X4	B	-	-	+
5	X5	C	-	-	+
6	X6	C	-	-	+
7	X7	D	-	-	+
8	X8	D	-	-	+
9	X9	E	-	-	+
10	X10	E	-	-	+
11	X11	F	-	-	+
12	X12	F	-	-	+
13	X13	F	-	-	+
14	X14	G	-	-	+
15	X15	G	-	-	+
16	X16	H	-	-	+
17	X17	I	-	-	+
18	X18	I	-	-	+
19	X19	J	-	-	+
20	X20	J	-	-	+
21	X21	K	-	-	+
22	X22	K	-	-	+
23	X23	L	-	-	+
24	X24	L	-	-	+
25	X25	M	-	-	+
26	X26	M	-	-	+
27	X27	M	-	-	+
28	X28	N	-	-	+
29	X29	O	-	-	+
30	X30	O	-	-	+

Yer: A: Bahçeköy; B: Çamlıca, C: Çobançeşme, D: İzzetiye, E: Karahisar, F: Karasatı G: Karlıköy, H: Kılıçköy, J:Lalacık, K: Orhaniye, L: Paşyığıt, M: Pınar, N: Silli, O: Türkmen  
X: Dışkı örneği



**Tablo 4.2** İşletme süt örneklerinde toplama yerlerine göre Real Time PCR yöntemiyle MAP tespiti

Sıra No.	Örnek No.	Yer	Real Time PCR sonucu (var/yok)	Ct değeri < 40	Ct değeri > 40
1	Y1	A	-	-	+
2	Y2	A	-	-	+
3	Y3	B	-	-	+
4	Y4	B	-	-	+
5	Y5	C	-	-	+
6	Y6	C	-	-	+
7	Y7	D	-	-	+
8	Y8	D	-	-	+
9	Y9	E	-	-	+
10	Y10	E	-	-	+
11	Y11	F	-	-	+
12	Y12	F	-	-	+
13	Y13	F	-	-	+
14	Y14	G	-	-	+
15	Y15	G	-	-	+
16	Y16	H	-	-	+
17	Y17	I	-	-	+
18	Y18	I	-	-	+
19	Y19	J	-	-	+
20	Y20	J	-	-	+
21	Y21	K	-	-	+
22	Y22	K	-	-	+
23	Y23	L	-	-	+
24	Y24	L	-	-	+
25	Y25	M	-	-	+
26	Y26	M	-	-	+
27	Y27	M	-	-	+
28	Y28	N	-	-	+
29	Y29	O	-	-	+
30	Y30	O	-	-	+

Yer: A: Bahçeköy; B: Çamlıca, C: Çobançeşme, D: İzzetiye, E: Karahisar, F: Karasatı G: Karlıköy, H: Kılıçköy, J:Lalacık, K: Orhaniye, L: Paşyığıt, M: Pırnar, N: Silli, O: Türkmen  
Y: İşletme süt örneği

**Tablo 4.3:** Köy süt toplama tankı süt örneklerinde toplama yerlerine göre Real Time PCR yöntemiyle MAP tespiti

Sıra No.	Örnek No.	Yer	Real Time PCR sonucu (var/yok)	<i>Ct değeri</i> < 40	<i>Ct değeri</i> > 40
1	Z1	A	-	-	+
2	Z2	B	-	-	+
3	Z3	C	-	-	+
4	Z4	D	-	-	+
5	Z5	E	-	-	+
6	Z6	F	-	-	+
7	Z7	G	-	-	+
8	Z8	H	-	-	+
9	Z9	I	-	-	+
10	Z10	J	-	-	+
11	Z11	K	-	-	+
12	Z12	L	-	-	+
13	Z13	M	-	-	+
14	Z14	N	-	-	+
15	Z15	O	-	-	+

Yer: A: Bahçeköy; B: Çamlıca, C: Çobançeşme, D: İzzetiye, E: Karahisar, F: Karasatı G: Karlıköy, H: Kılıçköy, J:Lalacık, K: Orhaniye, L: Paşyığıt, M: Pınar, N: Silli, O: Türkmen  
Z: Köy süt toplama tankı süt örneği

## 5. TARTIŞMA

Besin ögesi içeriği açısından süt ve süt ürünleri çocukluktan başlamak üzere yaşlılığa kadar hayatın her döneminde vazgeçilmez bir gıdadır. Vücudun gelişmesi, güçlenmesi ve sağlığın korunması için gerekli besin maddelerini içeren süt değerli bir besin maddesi olduğu gibi hastalık kaynağı da olabilir. Gerekli tedbirler alınmadığında, sağlığa zararlı mikroorganizmaları taşıyarak pek çok hastalıklara, hatta ölümcül sonuçlara yol açmaktadır. Hijyen kurallarına çiftlik ortamından, sağıma, taşınmasına ve tüketilmesine kadar uyulması gerekmektedir.

Dış ortamda canlılığını koruyan MAP dışkı yoluyla çeyreye bulaşmakta hastalık kaynağı olmaktadır. Ruminantlarda görülen MAP, Paratüberküloz (Johne hastalığı)'un etkeni olup, ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Füllgrabe, 2009). Uzun süre dış çevrede canlılığını koruyabilen MAP' ın toprak ve suda enfekte hayvandan kaynaklanan fekal kontaminasyon yoluyla biriktikten sonra çoğalmaksızın sabit kaldığı tespit edilmiştir (Bülte, 2006). Son dönemde sığırlarda görülen Johne hastalığı ile insanlardaki Crohn hastalığının aynı etkene bağlı olacağı konusunda görüşler oluşmuştur (Scanu ve ark., 2007; Dalziel, 1913; Güner, 2004). Sindirim sistemi rahatsızlığı olan "Crohn hastalığı" dayanılmaz ağrı, sık ishal nöbetleri, malabsorbsiyon gibi belirtileri ile kronik seyreden (Nacy ve Buckley 2007) bir hastalıktır. Özellikle gelişmiş ülkelerde yapılan araştırmalarda ısıtılmış sütte MAP varlığına rastlanmıştır.

Epidemiyolojik çalışmalar, Crohn hastalığının etiyolojisinin araştırılması için büyük önem taşımaktadır. Hastalığı prevalansının her geçen gün arttığı bildirilmektedir. Avrupa'da sık görülen hastalık, neredeyse dünya çapında gözlenmiştir (Economou ve ark., 2009). Crohn hastalığına MAP' ın etkili olduğu düşünülerek, birçok ülkede bu hastalığın prevalansı konusunda araştırmalar yapılmıştır (Whan ve ark, 2006). Gelişmiş ülkelerde çiğ sütte ve dışkıda MAP varlığı incelenerek, epidemiyolojisi belirlenmeye çalışılmaktadır (Slana ve ark., 2008; Mihajlovic ve ark., 2011). Türkiye'de ise bu konuda yapılan araştırma sayısı çok azdır.

Bu mikrobiyal patojenin hayvanlarda tespitine yönelik Türkiye’de 1928 yılında Sezginer (1928), 1932 yılında Akçay ve Erbil (1932), 1968 yılında Hakioğlu (1968), 1969 yılında Alibaşoğlu ve ark. (1969), 1983 yılında Yeşildere ve ark. (1983), 1998 yılında Karadaş ve ark. (1998) tarafından çalışmalar yapılmıştır. Araştırmamız AB ve T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından patojen mikroorganizmalar bakımından ari bölge olarak bildirilen ve Türkiye’de hayvancılığın düzenli şekilde yapıldığı, süt işletmelerinde hijyen kurallarının en iyi şekilde uygulandığı Edirne Keşan’da gerçekleştirilmiştir. Keşan ilçesine bağlı 30 farklı süt sığırcılığı işletmesinden, 2 yaşını doldurmuş, sağlıklı ineklerden; rektal yolla dışkı ve aynı zamanda süt toplama tanklarından süt alınarak bu örneklerin MAP ile kontamine olup olmadığı incelenmiştir.

Gıda gruplarında MAP analizinde farklı metotlar kullanılarak var/yok tespiti ile miktarına ilişkin analizler yapılmaktadır. Türkiye’de gıdalarda MAP için bu zamana kadar sadece 1999 yılında Elazığ’da 78 köy ve 500 süt ineğinden toplanan süt örnekleri üzerinde yapılmıştır (Çetinkaya ve ark., 1999) ve 25 MAP pozitif hayvan (%5) olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Avrupa’nın birçok ülkesinde yapılan MAP taramalarında sonuç pozitif çıkarken, İrlanda’da 396 süt örneği üzerine yapılan araştırmalarda tüm örneklerde MAP negatif çıkmıştır.

İsviçre’de 1384 süt tankından alınan örneklerden PCR yöntemiyle yapılan test sonucu 273 (% 19.7) MAP-pozitif çıkmıştır (Corti ve Stephan, 2002; WHO,2004). Ancak, İsviçre’nin farklı bölgelerinde %1.7 'den % 49.2'ye kadar değişen farklı prevalans değerleri saptanmıştır. Bu değerler ülke haritası üzerinde gösterilmiştir.

Araştırmamızda Keşan bölgesine özgü olarak sonuçlarımız MAP negatif çıkmıştır. Bu çalışmamız Türkiye’de MAP epidemiyolojisi ve özellikle ari bölge olarak bildirilen Trakya bölgesi açısından kapsamı ve çağdaş Real Time PCR yöntemi kullanılması nedeniyle ilk olmuştur. MAP’ ın AB uyum süreci bağlamında Türk Gıda tebliğinde izlenmesi ve kontrolü gereken mikrobiyal patojenler listesi içine dâhil edilmesi gerekmektedir.

MAP tespiti günümüzde kültürel ve moleküler bazlı yapılmaktadır (Songer ve Post., 2005). Moleküler bazlı yöntemler kültür bazlı yöntemlere göre çok daha hızlı ve

kesin sonuç vermektedir. Araştırmamızda Real Time PCR yöntemi kullanılmıştır. AB üye ülkelerinde MAP için özel araştırmalar tüm ülke genelinde yapılmış ve çıkan sonuçlara göre tedbirler alınmaktadır. Avrupa ülkelerinde olan araştırmalarda MAP taraması ülkenin tamamını kapsamakta ve araştırma merkezleri tarafından yeni analiz yöntemlerinin geliştirilmesi üzerine yoğun şekilde çalışılmaktadır. Türkiye’de halk sağlığı açısından çok önemli olan bu taramada ülkenin tamamında yapılması gerekmektedir. Gerekli önlemlerin alınmaması büyük mali kayıplarla birlikte geri dönüşü olmayan sorunlara yol açmaktadır.

Bu çalışmamız moleküler teknik Real Time PCR yöntemi kullanılarak yapılan ilk epidemiyolojik çalışma olarak Türkiye’de bir ilk olmuştur. MAP, pek çok farklı yöntemle taranmaktadır. ELISA yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, ELISA’ da antikor seviyesinin belli bir sınıra ulaşmış olması gerekmektedir. Moleküler teknik olan Real Time PCR’ da ise kullandığımız yöntem ve test kiti ile  $10^2$  KOB/gr dışkı ve  $10^2$  KOB/10 ml süt hassasiyetine inilmiştir. Kullanılan metotlar hassasiyet ve seçicilik açılarından MAP pozitif hayvan ve işletmeler için prevalansı değerlerinin geniş bir aralıkta kabul görmesine yol açmaktadır.

Araştırmamız örnek sayısı, işletme sayısı, ve süt örnekleri açısından İstatistiksel dayanaklarıyla hesaplandığı için Türkiye’de bu açıdan özgün tarafı bulunmaktadır. Türkiye’de yapılan diğer çalışmalarda dayanılan İstatistiksel hesaplamalar ve kaynakları bildirilmemiştir.

İstatistiksel hesaplamalar yapılırken Türkiye’de MAP Prevalansına yönelik bir çalışma bulunmadığı için AB prevalans değerlerini baz aldık. Bu değerler, işletme düzeyinde %80 ve hayvan düzeyinde %5’dir. Çetinkaya ve arkadaşlarının (1998) Elazığ bölgesinde yaptıkları ve buldukları %5 prevalans değerine karşı bizim çalışmamızda incelenen tüm dışkı ve süt örneklerinde MAP genomuna rastlanmamıştır. AB prevalansı değerleri baz alınarak hazırlanan deneysel modelden elde edilen sonuçların MAP negatif çıkmasıyla ( $p<0.05$ ) aynı teknik fakat farklı yöntemler kullanılarak yapılan iki çalışmanın sonuçları Türkiye’de MAP prevalansının geniş kapsamlı olarak incelenmesi gerekliliğini ortaya somut şekilde koymuştur.

Moleküler teknik olan Real Time PCR yöntemiyle DNA izolasyonu yapılan örnekler MAP varlığı bakımından incelenmiştir. İncelenen dışkı ve süt örneklerinin hiç birinde MAP genomu tespit edilememiştir.

Elde edilen verilere dayanarak; kullanılan yöntemin hassasiyeti 102 KOB/gram dışkı ve 102 KOB/10 ml süt olduğu göz önüne alınarak incelenen işletmelerin MAP'dan ari olduğu ya da kullanılan yöntemin tespit düzeyinin çok altında bir MAP varlığı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Türkiye'de ilk defa yapılan MAP prevalansı çalışmamızda halk sağlığı açısından önemli verilere ulaşılmıştır. AB ülkelerinde bu tehlikenin farkına varılarak büyük araştırmalar yapılmıştır. Türkiye'de çok önemli olan bu konunun gündeme alınması gerekmektedir. Paratüberküloz ve Crohn hastalığının tedavisinin henüz olmaması halk sağlığı açısından ayrıca bir risk konusudur. Araştırmamızda MAP'a rastlanmaması sadece araştırma yapılan Keşan bölgesi için geçerli olup, bu çalışmanın Türkiye'nin tüm bölgelerinde tekrarlanması ve ülkemiz için bir MAP haritası çizilmesi gerekmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Akineden, Ö., Hassan, A.A., Schneider, E. ve Usleber E.** (2006): Kultureller Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Säuglingsnahrung. 47. *Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft*, 26-29.09.2006, Garmisch-Partenkirchen.
- Alibaşoğlu M., Ertürk E., Yücel N.** (1973): Türkiye’de rastlanan ilk keçi paratüberküloz olayları üzerinde patolojik incelemeler. *A.Ü.Vet.Fak.Derg*, 20(1):43-63.
- Ayele W.Y., Machackova M., Pavlik I.** (2001): The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Vet. Med. Czech*, 46(7-8): 205-224.
- Ayele W.Y., Bartos M., Svastova P., ve Pavlik I.** (2004): Distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Vet. Microbiol.* 103: 209-217.
- Ayele W.Y.** (2005): *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow’s milk in the Czech Republic. *Appl. Environm. Microbiol.* 71:1210-1214.
- Batı Akdeniz Kalkınma Ajansı:** Süt ve Süt Ürünleri Sektör Raporu. <http://baka.org.tr/uploads/1303486719SUT-URUNLERi-TURKCE-KATALOG.pdf> (Erişim tarihi: Şubat 2011).
- Behr M.A.** (2010): Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. McGill University, Montreal, Canada and D M Collins, AgResearch, New Zealand ISBN: 978 1 84593 613 6 .
- Benedictus, G., Dijkhuizen, A.A., Stelwagen J.** (1987): Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Rec.* 15:142-146.
- Blobel H. ve Schliesser T.** (1985): Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. Band V: 155-313.
- Boelaert F., Walravens K., Biront P., Vermeersch J.P., Berkvens D., Godfroid J.,** (2000): Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Vet Microbiol.* 77(3-4):269-81.
- Bottcher M.**(1997): Cultural and Serological Examinations with Regard to the Prevalence of Paratuberculosis in the Primary Administrative Division of the Region ARNSBERG. <http://library.vetmed.fu-berlin.de/ResourceList/details/40588>.

- Bottcher, J. ve Gangl A.** (2004): *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* – combined serological testing and classification of individual animals and herds. *J. Vet. Med. B.* 51: 443–8.
- CFSPH - The Center For Food Security & Public Health.** (2005): Paratuberculosis Johne's Disease. [http://www.ivis.org/advances/Disease\\_Factsheets/paratuberculosis.pdf](http://www.ivis.org/advances/Disease_Factsheets/paratuberculosis.pdf). (Erişim Tarihi: Mayıs 2005)
- Chiodini R.J., Van Kruiningen H.J. ve Merkal R.S.** (1984): Ruminant paratuberculosis (Johne's disease). the current status and future prospects. *Cornell. Vet.* 74: 218-262.
- Chiodini R.J., Van Kruiningen H.J. Merkal R.S., Thayer, W.R., Coutou J. A.** (1984): Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* 20: 966-971.
- Collins D. M., Gabric D.M., De Lisle G.W.** (1990): Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restricted endonuclease analysis and DNA hybridization. 186 Literaturverzeichnis *J. Clin. Microbiol.* 28: 1591-1596.
- Collins, M.T., Sockett, D.C., Goodger, W.J., Conrad, T.A., Thomas, C.B., Carr D. J.** (1994): Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204: 636-41.
- Collins M.T.** (1997): *Mycobacterium paratuberculosis*: a potential food-borne pathogen? *J.Dairy Sci.* 80: 3445-3448.
- Collins M.T., Spahr, U., Murphy P.M.** (2001): Ecological characteristics of *M. paratuberculosis*. *Bullet. IDF* 362: 32-40.
- Cousins D.V., Evans R.J. ve Francis B.R.** (1995): Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*. *Aust. Vet. J.* 72: 458-462.
- Cousins D.V., Whittington R., Marsh I., Masters A., Evans R. J. ve Kluver P.** (1999): Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess *IS900*-like sequences detectable *IS900* polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Mol. Cell Probes*, 13: 431-442.



- Corti S. ve Roger Stephan R.** (2002): Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/2/15>.
- Crohn B.B., Ginzburg L. ve Oppenheimer G.D.** (1932): Regional Ileitis: A pathologic and clinical entity. *J. A. M. A.* 99: 1323-1329.
- Çetinkaya B., Muz A., Ertaş HB., Öngör H., Sezen IY., Gülcü HB.** (1999): Süt ineklerinde paratüberküloz prevalansının polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile saptanması. *Turk J Vet Anim Sci*, 24:371-379.
- Dalziel T. K.** (1913): Chronic interstitial enteritis. *BMJ* 25: 1068-1070.
- De Juan, L., Mateos, A., Dominguez, L., Sharp, J. M. ve Stevenson K.** (2005): Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 106: 249-257.
- De Juan, L., Alvarez, J., Aranaz, A., Rodriguez, A., Romero, B., Bezos, E., Mateos, A. ve L. Dominguez** (2006): Molecular epidemiology of types I/III strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolated from goats and cattle. *Vet. Microbiol.* 115: 102-110.
- Doll K.** (2006): Die Paratuberkulose - Eine epidemiologische Herausforderung. Hessische Landestierärztekammer, Kongressband zur Fortbildung am 06.05.2006.
- Duman G.K.** (2005): AB Üyeliği Yolunda Türkiye’de Hayvan Sağlığı, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı.  
[http://abdgm.tarim.gov.tr/ABU\\_files/Tezler/tezugulcin.pdf](http://abdgm.tarim.gov.tr/ABU_files/Tezler/tezugulcin.pdf)
- Ataseven Z.Y. ve Gülaç Z.N.,** (2011): Durum-Tahmin Raporu, T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü, TEPGE Yayın No: 191 ISBN: 978-975-407-326-3 ISSN: 1305-7618.
- EC Directorate-General Health and Consumer Protection SANCO/B3/R16/2000:** Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. Possible links between Crohn’s disease and Paratuberculosis - Epidemiology and geographical distribution of paratuberculosis in animals s22-s23 (Erişim tarihi 21.03.2000).
- EC CD90/424/EEC:** Hayvan Hastalıklarının Listesi Grup 1. [http://eur-lex.europa.eu/smartapi/cgi/sga\\_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnum](http://eur-lex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnum)

doc&lg=EN&numdoc=31990D0424&model=guichett (Erişim tarihi:26 Haziran 1990)

- Ellingson, J. L., Anderson, J. L., Kozickowski, J. J., Redcliff, R. P., Sloan, S. J., Allen, S. E., Sullivan N. M.** (2005): Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *Journal of Food Protection*, 68(5):966–972.
- Elschner M. ve Horner S.** (2003): Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen Thüringens sowie Erfahrungen. 2. *Arbeitstagung "Mykobakterieninfektionen"*, Jena, 13.-14.05.2003.
- Eltholth MM, Marsh VR, Van Winden S., Guitian FJ.** (2009): Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review. *J Appl Microbiol.* 107(4):1061-71.
- Flynn, O., Egan, J., O'grady, D., Good M.** (2005): Inactivation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in bovine slurry. *8th International Colloquium on Paratuberculosis*. 14-18. August 2005, Kopenhagen, Danmark.
- Füllgrabe Regina A.R.** (2009): Untersuchungen zum kulturellen und molekularbiologischen Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) aus humanen Darmbiopaten. <http://library.vetmed.fu-berlin.de/ResourceList/details/173546>.
- Gasteiner, J., Wenzl, H., Fuchs , K., Jark, U., Baumgartner W.** (1999): Serological cross-sectional study of paratuberculosis in cattle in Austria. *J. Vet. Med. B.* 46;457-466.
- Godfroid J., Delcorps C., Ireng L. M., Walravens K., MarchenS., Gala J. L.** (2005): Definitive differentiation between single and mixed mycobacterial infections in red deer (*Cervus elaphus*) by a combination of duplex amplification of p34 and f57 sequences and Hpy1881 enzymatic restriction of duplex amplicons. *J. Clin. Microbiol.* 43; 4640-4648.
- Grant I. R., Hitchings E., McCartney A., Ferguson, F., Rowe M. T.** (2002): Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurisation on the viability of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in natural infected cow's milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 68; 602-607.
- Grant I. R., Williams, A. G., Rowe M. T., Muir D. D.** (2005): Literaturverzeichnis 203 Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in

combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 71; 2853-2861.

- Grewal, S. K., Rajeev, S., Sreevatsan, S., Michel Jr. F. C.** (2006): Persistence of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and other zoonotic pathogens during simulated composting, manure packing, and liquid storage of dairy manure. *Appl. Environ. Microbiol.* 72; 565-574.
- Greenbloom S. L., Steinhart A. H., Greenberg G. R.** (1998): Combination of ciprofloxacin and metronidazole for active Crohn's disease. *Can. J. Gastroenterol.* 12; 53-56.
- Groenendaal, H. ve Galligan, D.T.** (2003): Economic consequences of control programs for paratuberculosis in midsize dairy farms in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223;1757-1763.
- Güner A.** (2004): Crohn hastalığının etiyolojisinde *Mycobacterium Paratuberculosis* (*Mycobacterium Avium* Sbsp. *Paratuberculosis*)'in rolü ve besinlerle bulaşma riski. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi.* 13(1) 48-54.
- Hacker U.,Huttner K., Konow M.** (2004): Literaturverzeichnis 205 Untersuchungen zur serologischen Prävalenz und zu Risikofaktoren der Paratuberkulose in Milchviehbetrieben in Mecklenburg-Vorpommern. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 117: 140-144.
- Hammer P.** (2003): Verhalten von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* bei der Be- und Verarbeitung von Lebensmitteln. Proceed. 44. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes "Lebensmittelhygiene". Vorträge und Poster. 29. September bis 02. Oktober 2003, Garmisch- Partenkirchen.
- Hammer P. ve Knappstein K.** (1998): *Mycobacterium paratuberculosis* als Zoonoseerreger. *Kieler Milchwirtsch. Forsch. Ber.* 50: 235-247.
- Hammer, P., Kiesner, C., Walte, M.-G., Knappstein, K. ve Teufel P.** (2002): Heat resistance of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in raw milk tested in pilot plant pasteurizer. *Kieler Milchwirtsch. Forsch. Ber.* 54: 257-303.
- Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. A. H., Staley J. T., Williams S. T.** (1994): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* Williams and Wilkins Verlag, 9. Auflage: 597- 603.

- Hruska K., Bartos M., Kralik P., Pavlik I.** (2005): *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in powdered infant milk: paratuberculosis in cattle – the public health problem to be solved. *Vet. Med. Czech.* 50: 327-335.
- Ikonomopoulos J., Pavlik I., Bartos M., Svastova P., Ayele W. Y., Roubal P., Lukas J., Cook N., M. Gazouli** (2005): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic. *Appl. Environm. Microbiol.* 71: 8934-8936.
- Ilsi (International Life Science Institute, Brüssel).** *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) and the food chain. Report 2004.
- Jayarao B.M., Pillai S.R., Wolfgang D.R., Griswold D.R., Rossiter C.A., Tewari D., Burns C.M., Hutchinson L.J.** (2004): Evaluation of IS900-PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle using quarter milk and bulk tank milk samples. *Foodborne Pathogens and Disease*, 1:17–26.
- JIC - Johne's Information Center.** (2011): <http://www.johnes.org/>. Erişim tarihi: Aralık 2011
- Johnson-Ifearulundu Y.J. ve Kaneene J.B.**(1998): Management-related risk factors for *M. paratuberculosis* infection in Michigan, USA, dairy herds. *Prev Vet Med.* 37(1-4):41-54.
- Jorgensen J. B.** (1977). Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. *Nord. Vet. Med.* 29: 267-270.
- Kabak G., ve Arslan S.** (2012): Türkiyede Açık Süt Satışı Konusunda Tüketicilerin Bilinçlendirilmesi, III. Süt ve Süt Hayvancılığı Öğrenci Kongresi, 21 Mayıs 2012, Aksaray, Türkiye.
- Kennedy D. J., Hood R., Allworth M. B.** (2002): Directions for the future control of Johne's disease caused by cattle types of *M. paratuberculosis* in Australia. *7th Int. Colloq. on Paratub.*, Bilbao, Spanien: 11.-14. Juni.
- Klee W.** (2006): Paratuberkulose (Johne'sche Krankheit) In: Dirksen G., Grunder H.-D. ve M. Stober (2006). Innere Medizin und Chirurgie des Rindes. Parey Verlag, 5. Auflage: 586-591.
- Köhler H., Geue L., Conraths F. J.** (2003): Zur Paratuberkulose-Situation in Deutschland. *Amtstierärztl. Dienst Lebensmittelkontr.* 1: 40-44
- Larsen A. B., Merkal R. S. ve Vardaman T. H.** (1956): Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 17: 549-551.

- Larsen A. B., Stalheim O. H., Hughes D. E., Appell L. H., Richards W. D., Himes E.M.** (1981): *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semendonor bull. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179: 169-71.
- Lillini, E., Gamberale, F., Bitonti, G., De Grossi, L., Cersini A.** (2005): A survey on the prevalence of bovine Paratuberculosis in Latium region (Italy): *8th Int. Colloq. on Paratub.*, 14.-18. August 2005, Copenhagen, Denmark.
- Lovell, R., Levi, M.ve Francis J.** (1944): Studies on the survival of Johne's bacilli. *J. Comp. Path.* 54: 120-129.
- Machackova M., Svastova P., Lamka J., Parmova I., Liska V., Smolik J., Fischer, O. A., Pavlik I.** (2004): Paratuberculosis in farmed and free-living ruminants in the Czech Republic (1999-2001) . *Vet. Microbiol.* 101: 225-235.
- Mayberry J. F. ve Hitchens R. A. N.** (1978): Distribution of Crohns's disease in Cardiff. *Soc. Sci. Med.* 12: 137-138.
- Merkal R. S.** (1984): Paratuberculosis: advances in cultural, serologic and vaccination methods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184: 939-943.
- Mignard, S. ve Flandrois J.P.** (2008): A seven-gene, multilocus, genus-wide approach to the phylogeny of mycobacteria using supertrees. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1432–1441.
- Mihajlovic B., Klassen M., Springthorpe S., Couture H., Farber J.** (2011): Assessment of Sources of Exposure for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Food and Water. *International Food Risk Analysis Journal.* 1(2):1-22.
- Millar D., Ford J., Sanderson J., Withey S., Tizard M., Doran T., Hermon-Taylor J.** (1996): IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cow's milk in England and Wales. *Appl. Environm. Microbiol.* 62: 3446-3452.
- Nacy N. ve Buckley M.** (2007): *Mycobacterium Avium Paratuberculosis*: Infrequent Human Pathogen or Public Health Threat? This report is based on a colloquium, sponsored by the American Academy of Microbiology, convened June 15-17, 2007, in Salem, Massachusetts.
- Naser S. A., Schwartz D., Shafran I.** (2000): Isolation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. 226 Literaturverzeichnis *AJG* 95: 1094-1095.

- Naing L., Winn T., Rusli B.N.** (2006): Practical Issues in Calculating the Sample Size for Prevalence Studies. *Archives of Orofacial Sciences*, 1:9-14.
- Nielsen S. S. ve Agger J. F.** (2000): Prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. Proceedings of the sixth International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics. Breckenridge, Colorado, USA, Aug 6-11, 2000: 267-269.
- Nielsen S.S., Thamsborg S.M., Houe H., Bitsch V.** (2000): Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. *Prev Vet Med*, 44:1-7.
- O'Doherty A., Grady D.O., Smith T., ve Egan J.** (1999): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in pasteurised and unpasteurised milk in the Republic of Ireland. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 41: 117-121.
- O'Reilly C.E., O'Connor L., Anderson W., Harvey P., Grant I.R., Donaghy J., Rowe M., O'Mahony P.** (2004): Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:5138–5144.
- Ott, S. L., Wells, S. J. ve Wagner B. A.** (1999): Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev. Vet. Med.* 40: 179-192.
- Özder M.** Ulusal Süt Zirvesi, Dünya ve Türkiye'de Süt Sektör İstatistikleri- 2012 <http://www.ulusalsutkonseyi.org.tr/ana/default.asp>. (Erişim tarihi:2012)
- Palmer M. V., Stoffregen W. C., Carpenter J. G. ve Stabel J. R.** (2005): Isolation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) from feral cats on a dairy farm with MAP-infected cattle. *J. Wildl. Dis.* 41: 629-635.
- Paolicchi F.A., Zumarraga M.J., Gioffre A., Zamorano P., Morsella C., Verna A., Cataldi A., Alito A., Romano M.** (2003): Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. *Journal of Veterinary Medicine Series B Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 50: 20–26.
- Paolicchi, F., Cirone, K., Morsella, C., Gioffre, A., M. Romano.** (2005): Isolation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) from commercial

pasteurized milk. *8th Int. Colloq. on Paratub.* Kopenhagen, Dänemark, 14.-17. August.

- Pavlik I., Horvathova A., Dvorska L., Bartl J., Svastova P., Du Maine R., Rychlik I.** (1999): Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J. Microbiol. Methods*, 38: 155-167.
- Pickup R. W., Rhodes G. Sidi-Boumedine K., Bull T., Weightman A., Arnott S., Hermon-Taylor J.**(2005): *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the catchment and water of the river Taff in South Wales, UK and its potential relationship to clustering of Crohn's Disease in the city of Cardiff. *8th Int. Colloq. on Paratub.*, Kopenhagen, Dänemark, 14.-17. August.
- Pickup R. W., Rhodes G., Arnott S., Sidi-Boumedine K., Bull T., Weightman A., Hurley M., Hermon-Taylor J.** (2005): *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the catchment area and water of the river Taff in South Wales, United Kingdom and its potential relationship to clustering of Crohn's Disease in the city of Cardiff. *Appl. Environm. Microbiol.* 71: 2130-2139.
- Pickup R. W., Rhodes G., Bull T., Arnott S., Sidi-Boumedine., Hurley M., Hermon-Taylor J.** (2006): *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in lake catchments, in river water abstracted for domestic use, and in effluent from domestic sewage treatment works: diverse opportunities for environmental cycling and human exposure. *Appl. Environm. Microbiol.* 72: 4067-4077.
- Pillai S.R. ve Jayarao B.M.** (2002): Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* directly from raw milk. *Journal of Dairy Science*, 85:1052–1057.
- Rowe M.T., Whan L., Ball H. J., Grant I. R.** (2005): Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw waters in Northern Ireland. *8th Int. Colloq. on Paratub.*, 14.-18. August 2005, Kopenhagen, Dänemark.
- Ryan KJ; Ray CG** (editors) (2004). Sherris Medical Microbiology (4th ed.). McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9 .
- Scanu A.M, Bull T.J, Cannas S., Jeremy D., Sanderson, Leonardo A., Sechi, Dettori G., Zanetta S., Taylor H.** (2007): *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cases of irritable bowel syndrome and comparison with Crohn's disease and Johne's disease:

common neural and immune pathogenicities. *J Clin Microbiol.* 45(12):3883-90.

- Schönenbrücher H., Abdulmawjood A., Failing K., M. Bülte.** (2008): New Triplex Real-Time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2751-2758.
- Slana I., Paolicchi F., Janstova B., Navratilova P., Pavlik I.** (2008): Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Veterinarni Medicina*, 53(6): 283–306.
- Songer J. G. ve Post K. W.** (2005): Veterinary Microbiology. Bacterial and fungal agents of animal disease. Elsevier Saunders, 1. Auflage: 104-106.
- Spahr U., ve Schafroth K.** (2001). Fate of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in swiss hard and semihard cheese manufactured from raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4199-4205.
- Stabel J. R.** (1998): Johne's disease: a hidden threat. *J. Dairy Sci.* 81: 283-288.
- Stabel J.R.** (2001): On-farm batch pasteurization destroys *Mycobacterium paratuberculosis* in waste milk. *Journal of Dairy Science*, 84:524–527.
- Stabel J.R., Wells S.J., Wagner B.A.** (2002): Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne's disease in US dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 85:525–531.
- Stahl D. A. ve Urbance J. W.** (1990): The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J. Bacteriol.* 172: 116-124.
- Stärk, K., Frei-Stäheli, C., Frei, P. P., Pfeiffer, D. U., Strasser, N.M., Gottstein, B., Kihm U.** (1997): Häufigkeit und Kosten von Gesundheitsproblemen bei Schweizer Milchkühen und deren Kälbern (1993–1994). *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 139: 343–353.
- Stephan R., Schumacher S., Grant I., Tasara T.** (2006): Prevalence and persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (MAP) in raw milk cheeses collected at retail level in Switzerland. 47. *Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft*, 26.-29.09.2006, Garmisch-Partenkirchen



- Stevenson K., Hughes V. M., De Juan L., Inglis N. F., Wright F., Sharp J. M.** (2002): Molecular characterization of pigmented and non-pigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1798-1804.
- Streeter R.N., Hoffsis G.F., Bech-Nielsen S., Shulaw W. P., Rings D.M.** (1995): Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *American Journal of Veterinary Research*, 56:1322–1324.
- Sung N. ve Collins M. T.** (1998): Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environm. Microbiol.* 64:999-1005.
- Sung N. ve Collins M. T.** (2000): Effect of three factors in cheese production (pH, salt, heat) on *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* viability. *Appl. Environm. Microbiol.* 66: 1334-1339.
- Sweeney R. W., Whitlock R. H., Rosenberger A. E.** (1992): *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J. Clin. Microbiol.* 30: 166-171.
- Şentürk Ö.** (2011): Crohn Hastalığı Epidemiyoloji, Etiyoloji, Risk Faktörleri, Patogenez. KOÜ Gastroenteroloji BD, Kocaeli. [http://www.dromersenturk.com/tibbi\\_sunu/Crohn-Epidemiyoloji-ve-Patogenez.pdf](http://www.dromersenturk.com/tibbi_sunu/Crohn-Epidemiyoloji-ve-Patogenez.pdf) Erişim tarihi: Mart 2011
- Taylor JH ve El-Zaatari F.A.K.** (2004): The *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* problem and its relation to the causation of Crohn disease. World Health Organization. Pathogenic Mycobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management. Edited by S. Pedley, J. Bartram, G. Rees, A. Dufour and J. Cotruvo. ISBN: 1 84339 059 0. Published by IWA Publishing, London, UK.
- Taylor T.K., Wilks C.R., McQueen D.S.** (1981): Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. *The Veterinary Record*, 109: 532–533
- Tekeci F.** (2011): Bizim koyuna rahat yok. <http://www.hurriyet.com.tr/ankara/19328612.asp>. (Erişim tarihi: 26 Kasım 2011).
- Thorel M.F., Krichevsky M., Levy-Frebault V. V.** (1990): Numerical taxonomy of mycobactin-dependent Mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp.

*avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* subsp. nov, and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 40: 254-260.

**TÜİK Türkiye İstatistik Kurumu** (2010): Süt Ürünleri Üretim İstatistikleri. TÜİK Haber Bülteni. Sayı 8. (Erişim tarihi 11.01.2011).

**USDA:** National Advisory Committee On Microbiological Criteria For Foods. [http://www.fsis.usda.gov/PDF/NACMCF\\_AMSCharge\\_032812.PDF](http://www.fsis.usda.gov/PDF/NACMCF_AMSCharge_032812.PDF) (Erişim tarihi: 28.03.2012).

**Ünal R.N., ve Besler T.** (2006): Beslenmede Sütün Önemi. [http://sdb.meb.gov.tr/okulsagligi/beslenmede\\_sutun\\_onemi.pdf](http://sdb.meb.gov.tr/okulsagligi/beslenmede_sutun_onemi.pdf) (Erişim tarihi: Ekim 2006)

**Van Schaik, G., Rossiter, C. R., Stehmann, S. M., Shin, S. J., Schukken Y.H.** (2003): Longitudinal study to investigate variation in results of repeated ELISA and culture of fecal samples for *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in commercial dairy herds. **Am. J. Vet. Res.** 64: 479-84.

**Whan L. B., Grant I. R., Ball H. J., Scott R., Rowe M. T.** (2001): Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. **Lett. Appl. Microbiol.** 33: 227-231.

**Whan L. B., Ball H. J., Grant I. R., Rowe M. T.** (2005): Occurrence of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in untreated water in Northern Ireland. **Lett. Appl. Microbiol.** 71: 7107-7112.

**Whan L., Grant I. R., Rowe M.T.** (2006): Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* and environmental protozoa. This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/6/63>.

**Whittington R.J., Lloyd J.B. ve Reddacliff L.A.** (2001): Recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from nematode larvae cultured from the faeces of sheep with Johne's disease. **Vet. Microbiol.** 81:273-279.

**Whittington R.J., Marsh I.B. ve Reddacliff L. A.** (2005): Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. **Appl. Environm. Microbiol.** 71: 5304-5308.

**Yazıcıoğlu Ö.** (2004):TAGEM/HS/98/10/04/035'no'lu proje. Patoloji Bölümü BVKAE.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

### 7.1 Kişisel Bilgiler



- Uyruğu :T.C.
- Doğum Yeri/Tarihi :Sivas, 1987.
- Adres :Karadeniz Mahallesi 1215 Sokak No:16/1 GOP/ İST
- Tel :+90 536 507 98 10
- E-posta :kurtyunus@gmail.com

### 7.2 Eğitim Bilgileri

- Mehmetçik İlköğretim Okulu – Sivas, Türkiye.
- H.M. Sabancı Lisesi – Sivas, Türkiye.
- İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü (Mezuniyet yılı: 2008 ), Malatya, Türkiye.
- İstanbul Aydın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Müh. Yüksek Lisans Programı (Mezuniyet yılı: 2012 )

### 7.3 Sertifikalar

- Agilent Mx3000P QPCR Cihazı Eğitim Sertifikası (2012).
- EUROFINS GeneSpin DNA İzolasyon kiti Kullanım Sertifikası (2012).
- Et Tür Tayinleri için CHIPRON Cihazı Kullanım Sertifikası (2012).
- Toplam Kalite Yönetimi (2012).
- Gıda İşletmelerinde Sorumlu Müdürlük Sertifikası (2008).
- ISO 22000:2005 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi ( HACCP) Sertifikası (2008).

### 7.4 Bilgisayar Bilgisi

- MS Office Paket Programları.

### 7.5 Yabancı Dil

- İngilizce