

Kars Yöresi Sığırlarında Subklinik Paratüberkülozun Seroprevalansı ^[1] ^[2]

Mustafa MAKAV ¹ Erhan GÖKÇE ² 

^[1] Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu;2012- VF-46)

^[2] Bu çalışma ilk isim yazarın yüksek lisans tezinin özetidir

¹ Ardahan Üniversitesi, Göle Meslek Yüksekokulu, TR-75700 Göle, Ardahan - TÜRKİYE

² Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, TR-36200 Kars - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2013-8529

Özet

Hayvancılık işletmelerinde ciddi ekonomik kayıplarla seyreden ve önemli bir zoonoz olan paratüberkülozis'in Türkiye'de ve Kars yöresinde prevalansına yönelik çalışmalar sınırlı sayıdadır. Sunulan çalışmada Kars yöresindeki sığırlarda subklinik paratüberkülozis'in prevalansının belirlenmesi amaçlandı. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* serum örneklerinde ELISA yöntemi kullanılarak tespit edildi. Bu amaçla rastgele seçilen 13 odak ve bu odaklardaki 24 işletmeden 2 yaş ve üzeri toplam 400 sığır kullanıldı. Kars yöresinde subklinik paratüberküloz'un seroprevalansı %3.5 (14/400), çiftlik prevalansı ise %41.6 (10/24) olarak belirlendi. Yaşları ≥ 2 -<5, ≥ 5 -<7 ve ≥ 7 olarak gruplandırılan sığırlarda paratüberküloz'un seroprevalansı sırasıyla %1.7, %3.8 ve %5.1 olarak belirlendi. Hayvanların yaşı arttıkça pTB'a yakalanma riskinin arttığı belirlendi. Sonuç olarak, paratüberküloz'un her iki odaktan birinde tespit edilmesi, enfeksiyonunun yayılma hızı, başka bölgelere bulaşma riski ve ekonomik kaybı düşünüldüğünde dikkate alınması gerekir.

Anahtar sözcükler: Johne's Hastalığı, *Mycobacterium Paratuberculosis*, ELISA, Seroprevalans

Seroprevalence of Subclinical Paratuberculosis in Cattle in Kars Region

Summary

Studies on prevalence of Paratuberculosis, an important zoonosis and cause of major economic losses to farms, are limited in Kars and Turkey as a whole. This study was therefore aimed at determining the prevalence of subclinical paratuberculosis in Kars district. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* was determined using ELISA. For this purpose, 400 cattle above 2 years old from 24 farms located in 13 different localities were blood sampled. The seroprevalence of subclinical paratuberculosis was 3.5% (14/400) and farm prevalence was 41.6% (10/24) in Kars district. Age distribution of seroprevalence of paratuberculosis was 1.7% in cattle aged ≥ 2 -<5 years old, 3.8% in ≥ 5 -<7 years old and 5.1% in ≥ 7 old. The rate increased age of cattle get older. In conclusion, paratuberculosis was determined in half of the localities and its incidence may pose risk of transmission to other parts of the country and of great economical losses and therefore the disease should be taken into consideration.

Keywords: Johne's disease, *Mycobacterium paratuberculosis*, ELISA, Seroprevalence

GİRİŞ

Johne's Disease ve Hohnesche Krankheit olarak da bilinen Sığır paratüberkülozu *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) etkeninin neden olduğu, bağırsak cidarının kalınlaşması ve tedaviye cevap vermeyen kronik bir enteritisle karakterize bulaşıcı bir enfeksiyondur. Enfeksiyon Crohn hastalığının etiyolojisinde rolü nedeniyle önemli bir zoonoz olarak da bilinmektedir ^[1-3]. Hayvanlar neonatal dönem dahil çok erken yaşlarda enfekte olabilmekle birlikte hastalığa ait klinik belirtiler özellikle 2-6 yaş arasındaki hayvanlarda gözlenmektedir ^[1]. Para-

tüberküloz (pTB) hayvanlarda ishal ve kilo kaybı sonucu kaşeksiye kadar zayıflama, süt veriminde düşme, kısırılık, mastitis, ölümlere neden olması ve teşhis, tedavi ve kontrol programı giderlerinden dolayı ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır ^[1-7]. Örneğin Amerika'da enfeksiyon yıllık 200-250 milyon dolar ekonomik kayba yol açmaktadır ^[8]. Etkili bir tedavi ve aşısı bulunmayan enfeksiyonda etkenin süt, dışkı ve kolostrumla buzağılara, işletmedeki hayvanlara ve diğer çiftliklere ve en önemlisi insanlara bulaşmasının önlenmesinde eradikasyon gibi tedbirlerin alınması gerek-



İletişim (Correspondence)



+90 474 2426807/5237



erhangokce36@hotmail.com

mektedir [3,5,7]. Bu nedenle enfeksiyonun özellikle sub-klinik dönemde teşhisi önemlidir [1,3]. Hastalığın seroprevalansı ve teşhisinde kültür, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tekniği ve immunolojik olarak agar jel immüno-diffüzyon test (AGID), komplement fiksasyon (KF) ve enzim linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemleri kullanılmaktadır [4-6,9-11].

Kars yöresi, ülkenin farklı bölgelerine yoğun hayvan nakillerinin yapılmasından dolayı paratüberküloz gibi bulaşıcı enfeksiyöz hastalıkların tespiti, hem yayılmasını engellenmesi hem de ekonomik kayıpların önlenmesi, açısından önemlidir. Türkiye’de pTB ile ilgili çalışmaların sınırlı olduğu ve Kars yöresinde ise konuyla ilgili herhangi bir verinin bulunmadığı bilinmektedir. Dolayısıyla bu hastalığın bölgemiz ve ülkemiz hayvancılığı açısından oluşturduğu riskin boyutları tam olarak bilinmemektedir. Sunulan araştırmada Kars ve çevresindeki sığır popülasyonunda sub-klinik paratüberkülozun seroprevalansı ve çiftlik prevalansının belirlenmesi yanında yaş ve ırka göre dağılımının tespiti amacıyla gerçekleştirildi.

MATERYAL ve METOT

Kars merkez ve ilçelerinden rastgele seçilen 13 odak ve bu odaklardaki 24 işletmeden alınan toplam 400 sığır çalışmanın materyalini oluşturdu. Her işletmeden 2 yaşından büyük, paratüberküloz yönünden aşılanmamış hayvanların yaklaşık olarak %15-25’i kadarından rastgele serum örneği alındı. Çalışılan hayvan ırkları simental melezleri (n=156), montofon melezleri (n=190) ve yerli ırk melezlerinden (n=54) oluştu. Hayvanların yaşları ≥ 2 - <5 (n=116), ≥ 5 - <7 (n=206), ≥ 7 (n=78) olarak gruplandırıldı. İrk ve yaşın paratüberküloz üzerine etkisinin belirlenmesinde X^2 for trend testi kullanıldı (EPI INFO 6). MAP etkenine karşı şekillenen antikorların belirlenmesinde ticari ELISA kiti kullanıldı (IDEXX Paratuberculosis Screening Ab Test).

BULGULAR

Kars yöresindeki sığırlarda subklinik paratüberkülozun seroprevalansı %3.5 (14/400) ve çiftlik prevalansı ise %41.6 (10/24) olarak belirlendi. Paratüberküloz pozitif bulunan vakaların odak ve çiftliklere göre dağılımı *Tablo 1*’de sunulmuştur. İşletmelerden 7’sinde yalnız bir sığırda, 3’ünde ise 2 veya daha fazla sığırda paratüberküloz pozitif olarak belirlendi. Paratüberkülozun prevalans oranı Simental veya melezlerinde %3.20 (5/156), Montafon veya melezlerinde %3.68 (7/190), Yerli ırk veya melezlerinde %3.70 (2/54) olarak tespit edildi (*Tablo 2*). Pozitif 14 vakanın yaş gruplarına göre; 2’si <5 , 8’i ≥ 5 - <7 ve 4’ü >7 yaşında olarak dağıldı. Aynı yaş gruplarında paratüberküloz prevalans oranları sırasıyla %1.72 (2/116), %3.88 (8/206) ve %5.12 (4/78) olarak belirlendi (*Tablo 2*). Sığırların yaşı arttıkça pTB prevalans oranlarının arttığı görülmekle birlikte bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Tablo 1. Subklinik Paratüberküloz pozitif vakaların odak ve çiftliklerde göre dağılımı

Table 1. Distribution of subclinical paratuberculosis positive cattle according to locality and farms

Odak	Çiftlik No	N1	N2
Kars Merkez	1	29	0
Sarıkamış	2	15	2
Selim	3	12	0
	4	16	1
	5	14	0
	6	17	3
Bulanık	7	20	0
	8	20	0
Cavlak	9	10	0
	10	11	0
Yeşiltepe	11	12	1
	12	16	1
Kırkpınar	13	15	0
	14	13	1
	15	13	1
Yalmaçlı	16	7	0
Halefoğlu	17	31	0
	18	34	1
Soylu	19	15	2
Arpaçay	20	16	1
Mezra	21	13	0
	22	21	0
	23	14	0
Digor	24	16	0
Toplam	24	400	14

N1: Örneklenen Hayvan Sayısı, N2: Paratüberküloz Pozitif Hayvan Sayısı

Tablo 2. İrk ve Yaşa göre subklinik paratüberküloz prevalansı

Table 2. Breed and age distribution of subclinical paratuberculosis positive cattle

Parametre		Örnek Sayısı	Pozitif Hayvan Sayısı	Oran (%)	OR
İrk	Simental veya Melezi	156	5	3.20	1.00
	Montafon veya Melezi	190	7	3.68	1.16
	Yerli İrk veya Melezi	54	2	3.70	1.16
	İstatistik				X ² =0.05, P=0.82
Yaş	≥2 - <5	116	2	1.72	1.00
	≥5 - <7	206	8	3.88	2.30
	≥7	78	4	5.12	3.08
	İstatistik				X ² =1.7, P=0.2

TARTIŞMA ve SONUÇ

Paratüberkülozisin seroprevalansının subklinik süreçte belirlenmesi çiftlikteki hayvanlar arasında ve çiftlikten çiftliğe, enfeksiyonun yayılmasının önlenmesinde kritik bir öneme sahiptir [4,5,9]. Buzağılara doğumdan hemen sonra veya neonatal dönemde bulaşık meme, ekipman ve

kolostrum veya sütle etkeni alabildikleri ve bu dönemin enfeksiyona en duyarlı zaman olduğunun bilinmesi, etkenin ısı ve pastörizasyona dirençli olması nedeniyle süt ve süt ürünleri ile insanlara bulaşma ihtimalinin bulunması, subklinik dönemde teşhisin önemini artırmaktadır [3,6,9]. Türkiye’de varlığı uzun süredir bilinmesine rağmen pTB’la ilgili çalışmaların sınırlı olduğu görülmektedir [4-6,9,12-14]. Orta Anadolu Bölgesinde farklı yıllarda yapılan çalışmalarda mikro ve tüp komplement fiksasyon yöntemleri ile pTB’un sığırlardaki seroprevalansı sırasıyla %2.3 ve %2.7 [12] ve ELISA yöntemiyle %4.6 [5,13] olarak tespit edilmiştir. Elazığ yöresinde [6] süt örneklerinde pTB’un prevalansını PZR ve bakteriyel kültür yöntemleri ile sırasıyla %5 ve 3.4 olarak belirlenmiştir. Uşak yöresinde [9] dışkı örneklerinde pTB prevalansı Ziehl-Neelsen (ZN) boyama, Outer PZR, Nested PZR ve bakteriyolojik kültür yöntemlerine göre sırasıyla %17, %9.5, %20 ve %4 ve süt örneklerinde ise yine aynı yöntemlerle sırasıyla %15.5, %5.5, %17.5 ve %2.5 olarak tespit edilmiştir. ELISA testi ile pTB seroprevalansı Burdur yöresinde %6.2 [4] olarak tespit edilmiştir. Trakya Bölgesinde ise PZR yöntemi ile dışkı örneklerinde pTB etkeni saptamadıklarını bildirmişlerdir [14]. Çalışmamızda ELISA yöntemiyle pTB’un seroprevalansı %3.5 olarak tespit edildi. Çalışmamızda dahil genel olarak pTB Türkiye’deki prevalansını %0 ile %20 arasında değişmesi Avrupa’daki prevalans aralığı (%0-%24) ile paraleldir [2,5,15,16]. Türkiye’de pTB’la ilgili çalışmalarda çiftlik prevalansının dikkate alınmadığı görülmektedir. Fakat paratüberküloz bir işletmede tek bir sığırdan bile tespit edilmesi buluşma riskinin yüksek ve kolay olması nedeniyle önem arz etmektedir. Ülkemizde sadece Burdur ili ve çevresinde yapılan çalışmada [4] pTB’un çiftlik prevalansı değerlendirilmiş ve %58 (14/24) olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda da çiftlik prevalans oranı %41.6 olarak diğer çalışmaya yakın bulundu. Bu iki çalışma verileri yaklaşık olarak her iki işletmeden birinde pTB’un bulunduğunu göstermektedir. Avrupa ülkelerinde pTB’un sürü prevalansının %0 ile %75 arasında değiştiği bildirilmiştir [2,5,15,16]. Çiftlikteki hayvan sayısı arttıkça ve özellikle >100 olanlarda pTB’un prevalansının da arttığı belirtilmiştir [4,16,17]. Kars ve çevresinde çiftlikler genellikle hayvan sayısı <50 olan küçük aile işletmeleri şeklindedir [18]. Bu yörede buzağılar doğumdan sonra anneleri ile birlikte barındırılması ve ilk 3 ay anne sütü ile beslendirilmesi enfeksiyonun vertikal bulaşmasına neden olabilir [3,4,6].

Prevalans oranları arasındaki farklılıklar, çalışmalara göre değişen iklim ve coğrafik şartlar, beslenme ve barındırma koşulları ve teşhis için kullanılan materyal ve yöntemlerden kaynaklanabilir [4,5,6]. Nitekim ELISA yöntemi ve serum örneklerinin kullanılmadığı bir çalışmada [9] pTB’un prevalans oranının kullanılan örnek (dışkı ve süt) ve yöntemlere göre (farklı iki PZR, kültür ve ZN boyama) göre oldukça değiştiği (%4-%20) görülmektedir. Ayrıca hastalığın döneme göre de prevalans oranları değişebilmektedir. Örneğin İngiltere’de klinik pTB’un prevalansı %1, mezbahalarda ve klinik bulgu göstermeyen hayvanlarda ise %3.5 olarak belirlenmiştir [6]. Ayrıca, KFT yalnızca klinik pTB’un

teşhisinde etkili olduğu için yalnızca bu yöntemin kullanıldığı çalışmalarda subklinik veya asemptomatik taşıyıcıları doğru belirlenemeyeceği için prevalans oranları aynı bölgelerde düşük çıkabilmektedir [6]. pTB’un subklinik dönemde teşhis önemli bir problemdir. Enfeksiyonun subklinik teşhisinde serolojik olarak spesifik antikorların belirlenmesi ve nekropsi esnasında doku veya dışkıdan MAP’ın kültürü en etkili yöntemlerdir [15]. Kültür yöntemi yüksek spesifiteye sahip olmakla beraber uzun inkübasyon süresi kullanımını sınırlandırmaktadır [9]. Ayrıca selektif vasat gereksinimi, kontaminasyon problemi ve pahalı olması bu yöntemin diğer dezavantajlarıdır. Son yıllarda moleküler biyolojide yapılan ilerlemeler sonucu geliştirilen PZR tekniği, kültür yöntemine göre daha yüksek sensitivite ile etkeni belirleyebilmektedir [9,10]. PZR yöntemi kültür yöntemine göre daha basit, hızlı, güvenilir ve yüksek spesifite ile sonuçlar verebilmektedir. Fakat özellikle ELISA gibi immunolojik teknikler kültür ve PCR yöntemlerine göre daha ekonomik ve hızlı olmasının yanında çok sayıda analizin birlikte yapılması ve kolay uygulanabilir olması gibi avantajlar sunmaktadır [4,5,19,11]. Ayrıca yapılan son güncel bir çalışmada [19] ELISA testinin sürüde enfekte hayvanları da subkutan reaksiyon testi (Avian PPD kullanılarak), dışkıda kültür (ZN boyama), PZR yöntemlerine yakın doğrulukla belirleyebildiği bildirilmiştir. Yine, pTB’la ilgili herhangi bir çalışmanın yapılmadığı bölgelerde öncelikle yüksek spesifitesinden dolayı ELISA’nın tercih edilmesi gerektiği rapor edilmiştir [11]. Son yıllarda yüksek sensitivite ve spesifite ile özellikle seroprevalans çalışmalarında ELISA hemen hemen kullanılan tek yöntem gibi görünmektedir [4-6,11,19]. Yapılan çalışmalarda ELISA’nın sensitivite değeri %30.2-%51.0, spesifite değeri ise %95 ile %99 arasında değiştiği belirtilmiştir [4,5,17,19,20]. Fakat son yıllarda geliştirilen ticari kitlerde sensitivitenin %74.1’e kadar çıktığı ve spesifite oranının ise %99’un üstünde olduğu bildirilmiştir [4,17,19,20]. Prospektüse göre, araştırmamızda kullanılan ELISA kitinin sensitivite ve spesifite oranları sırasıyla %64.7 ve %99.2 olarak belirtilmiştir. Bu nedenle pTB’un prevalansının belirlenmesinde çoğunlukla ELISA yönteminin kullanılması, kültür ve PCR yöntemlerinin ise doğrulayıcı yöntemler olarak kullanılması daha doğru bir yaklaşım olarak görülmektedir.

Çetinkaya ve ark.[7], Jersey ve Guernsey ırklarında John’e hastalığı’nın Friesian veya diğer türlerle göre daha yaygın olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan başka bir araştırmada ise pTB’un *Bos indicus* veya melez tür sığırlarda, *Bos taurus* türlerine göre 3.5 ile 17 kat daha yüksek olabileceği bildirilmiştir. Türlerle göre sonuçların değişkenlik göstermesi türe özgü duyarlılık ve kros reaksiyonla ilişkilendirilmekle birlikte nedeni tam olarak bilinmemektedir [1,21]. Burdur yöresinde pTB’nin prevalansı Holştayn ırkı sığırlarda %6.2 olarak belirlenmiştir [4]. Pozitif vakaların çoğunlukla montofon veya melezlerinde ortaya çıktığı belirlenmekle birlikte çalışmamızda ırklara arasında pTB seroprevalansının önemli değişiklik göstermediği belirlendi.

Uzun süre çevrede canlı kalabilen MAP güçlü bir hücre içi patojendir. Alınan MAP etkenleri savunma sisteminde

makrofaj hücreleri içerisinde uzun süre canlı kalabilmektedir. Başlangıçta etkenin proliferasyonu bu şekilde immun sistem tarafından kontrol edilmesi inkübasyonun uzun sürmesine (1.5-2 yıl) neden olmaktadır. Kandaki antikor seviyesi direkt enfeksiyonun gelişmesiyle verilen cevaba bağlı olarak artar ve buda uzun zaman alır. Bu durum genellikle iki yaşın altında sığırlarda pTB'un teşhisini zorlaştırmaktadır ve özellikle serumun kullanıldığı prevalans çalışmalarında iki yaşından küçük hayvanlar tercih edilmemektedir. Nitekim yaşı <2 olan sığırlarda pTB'un seroprevalansını düşük çıkması da bu verileri desteklemektedir [2-6]. Ayrıca yaşı <2 sığırlarda bu nedenlerden dolayı ELISA testinin sensitivite ve spesifitesinin düşük olduğu bildirilmiştir [4,5,10,16]. Bu nedenle çalışmamızda örneklem yapılıncan inkübasyon süresi dikkate alınarak hedef popülasyon olan iki veya daha büyük yaşta sığırlar seçildi. Çalışmamızda paratüberküloz belirlenen 14 vakanın çoğunlukla 5 ve 6 yaşında olduğu (n=8) belirlenmekle birlikte pTB'un seroprevalansı yaşı ≥7 olarak gruplandırılan sığırlarda (%5.1), yaşı ≥2 - <5 (%1.7) ve ≥5 - <7(%3.8) olarak gruplandırılan sığırlara göre daha yüksek olduğu tespit edildi. Çalışmamızda elde edilen veriler hayvanların yaşı arttıkça pTB'un seroprevalansının da arttığını bildiren çalışmaları doğrulamaktadır [2,4,16]. Çalışmamızda yaşı 2, 3 ve 4 olan sığır grubunda pTB'un prevalansının en düşük düzeyde belirlenmesi 2 yaşındaki hayvanlarda negatif oranının yüksek çıkmasından kaynaklanabilir [4]. Öztürk ve ark.[4], çalışmalarında yaşı ≥7 olan sığırlarda belirledikleri paratüberkülozun yaygınlık oranı (%6.6) çalışmamıza belirlenen orana (%5.1) yakın bulundu. Fakat, Öztürk ve ark.[4], en yüksek pTB seroprevalans oranını 3 yaşındaki sığırlarda (%19.7) belirlemişlerdir.

Sonuç olarak yapılan çalışmada, hastalıkla ilgili ekonomik kayıpların tahmin edilmesi ve Türkiye'deki prevalansının belirlenmesine katkıda bulunması amacıyla Kars yöresindeki subklinik paratüberkülozun prevalansı ilk kez belirlendi. Kars yöresi kendi içinde ve diğer yörelere sık hayvan geçişi olması nedeniyle enfeksiyonu ait yüksek çiftlik prevalansı (%46.1) hastalığın yayılma potansiyeli açısından önemli risk oluşturabilir. Elde edilen veriler Kars ili ve çevresinde önemli ekonomik kayıplara yol açabilecek bir enfeksiyon olarak paratüberkülozun göz önünde tutulması gerektiğini göstermektedir. MAP etkeninin sütle ciddi oranda yayılması veya taşınması, insan sağlığı açısından da önemli risk oluşturması uygun teşhis edilmesinin önemini arttırmaktadır. Türkiye'de bu alanda yapılan çalışmalar genel olarak değerlendirildiğinde paratüberkülozun ruminantlarda yaygınlığı, ülke ekonomisine zararı ve insan sağlığını için taşıdığı riskin belirlenebilmesi için ulusal düzeyde bir çalışma yapılması gerekmektedir. Ancak bu düzeyde bir çalışma hastalığa karşı etkili kontrol stratejilerinin geliştirilmesine ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. Osterstock JB, Sinha S, Seabury CM, Cohen ND: Effect of classifying disease states in genetic association studies for paratuberculosis. *Prev Vet Med*, 95, 41-49, 2010.

2. Diequez FJ, Gonzales AM, Menendez S, Vilar MJ, Sanjuan ML, Yus E, Arnaiz I: Evaluation of four commercial serum ELISAs for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cows. *Vet J*, 180, 231-235, 2009.

3. Çetinkaya B, Erdoğan HM, Morgan KL: Risk factors for Bovine Paratuberculosis. II. The multiple analysis of risk factors for Bovine Paratuberculosis. *Türk J Vet Anim Sci*, 21, 303-306, 1997

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

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

6. Çetinkaya B, Muz A, Ertaş HB, Öngör H, Sezen İY, Gülcü HB: Süt ineklerinde Paratüberküloz prevalansının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile saptanması. *Türk J Vet Anim Sci*, 24, 371-379, 2000.

7. Çetinkaya B, Erdoğan HM, Morgan KL: Relationships between the presence of John's Disease and farm and management factors in dairy cattle in England. *Prev Vet Med*, 32, 253-266, 1997.

8. Sharma G, Singh SV, Sevilla I, Singh AV, Whittington RJ, Juste RA, Kumar S, Gupta VK, Singh PK, Sohal JS, Vihan VS: Evaluation of indigenous milk ELISA with m-culture and m-PCR for the diagnosis of bovine John's Disease (BJD) in lactating Indian dairy cattle. *Res Vet Sci*, 84, 30-37, 2008.

9. Yıldırım D, Civelek T: Prevalence of subclinical paratuberculosis in dairy cattle in Uşak Region. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 19 (1): 121-126, 2013, DOI: 10.9775/kvfd-2013-7306

10. Civelek T, Celik HA, Ozenc E, Avci G, Kav K, Cingi CC, Yilmaz O: Effects of PCR-confirmed subclinical paratuberculosis on retinol and β-carotene levels in dairy cattle. *Arch Med Vet*, 41, 281-284, 2009.

11. Shin SJ, Cho D, Collins MT: Diagnosis of bovine paratuberculosis by a novel enzyme-linked immunosorbent assay based on early secreted antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol*, 15, 1277-1281, 2008.

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

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

14. İkiz S, Bağcigil AF, Ak S, Özgür NY, Loaz A: Paratuberculosis in cattle in Turkey detected by PZR. *Medycyna Wet*, 61, 881-883, 2005.

15. Pozzato N, Capello K, Comin A, Toft N, Nielsen SS, Vicenzoni G, Arrigoni N: Prevalence of paratuberculosis infection in dairy cattle in Northern Italy. *Prev Vet Med* 102, 83-86, 2011.

16. Woodbine KA, Schukken YH, Green LE, Ramirez-Villaescusa A, Mason S, Moore SJ, Bilbao C, Swann N, Medley GF: Seroprevalence and epidemiological characteristics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on 114 cattle farms in south west England. *Prev Vet Med*, 89, 102-109, 2009.

17. Nielsen SS: Transitions in diagnostic tests used for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol*, 132, 274-282, 2008.

18. Erdoğan HM, Çitil M, Güneş V, Saatci M: Dairy cattle farming in Kars district, Turkey: I. Characteristics and production. *Türk J Vet Anim Sci*, 28, 735-743, 2004.

19. Costanzo G, Pinedo FA, Mon ML, Viale M, Gil A, Illia MC, Gioffré A, Arese A, Travería G, Romano MI: Accuracy assessment and screening of a dairy herd with paratuberculosis by three different ELISA. *Vet Microbiol*, 156, 183-188, 2012.

20. Fry MP, Kruze J, Collins MT: Evaluation of four commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine paratuberculosis in Chilean dairy herds. *J Vet Diagn Invest*, 20, 329-332, 2008.

21. Roussel AJ, Libal MC, Whitlock RL, Hairgrove TB, Barling KS, Thompson JA: Prevalence of and risk factors for paratuberculosis in purebred beef cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 226, 773-778, 2005.