



**T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KANDA VE DOKULARDA *MYCOBACTERIUM BOVIS* ETKENİNİN MOLEKÜLER  
VE SİTO-HİSTOPATOLOJİK YÖNTEMLERLE GÖSTERİLMESİ**

**Ezgi AKDEŞİR**

**(DOKTORA TEZİ)**

**Bursa-2016**



T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

KANDA VE DOKULARDA *MYCOBACTERIUM BOVIS* ETKENİNİN MOLEKÜLER VE  
SİTO-HİSTOPATOLOJİK YÖNTEMLERLE GÖSTERİLMESİ

Ezgi AKDEŞİR

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. M. Müfit KAHRAMAN


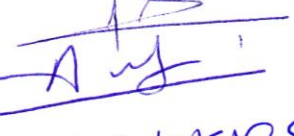


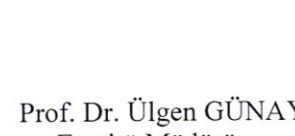
Bursa-2016



Bu çalışma TÜBİTAK, TOVAG112O440 ve UÜ BAPB KUAP (V2012-45) numaralı projeler ile desteklenmiştir.

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE**

Veteriner Patoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Ezgi AKDEŞİR tarafından hazırlanan “**Kanda ve Dokularda Mycobacterium Bovis Etkeninin Moleküler ve Sito-Histopatolojik Yöntemlerle Gösterilmesi**” konulu Doktora tezi 12/05/2016 günü, 10:00-12:30 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı ve Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. M. Müfit KAHRAMAN	
Üye	Prof. Dr. Osman KUTSAL	
Üye	Prof. Dr. Sezgin ŞENTÜRK	
Üye	Doç. Dr. Alper SEVİMLİ	
Üye	Doç. Dr. Ahmet AKKOÇ	

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun ..... tarih, ..... sayılı toplantısında alınan ..... numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ülgen GÜNAY  
Enstitü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

<b>TÜRKÇE ÖZET</b>	<b>II</b>
<b>İNGİLİZCE ÖZET</b>	<b>IV</b>
<b>GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
1. Tanım	4
2. Tarihçe	4
3. Etiyoloji	5
4. Epidemiyoloji	6
5. Bulaşma ve Patogenez	6
6. Klinik tablo	8
7. Tedavi ve Korunma	8
8. Tanı	9
9. İmmunohistokimya	11
10. İmmunositokimya	13
11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	13
12. Kan lökosit katmanı (buffy coat)	15
<b>GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>16</b>
1. Örneklenen hayvanlar	16
2. Örneklerin toplanması ve incelemeler için hazırlanması	16
3. Hematoksilin Eozin ve Ziehl-Neelsen Boyama	17
4. İmmun boyamalar	18
4.1. İmmunohistokimya	18
4.2. İmmunositokimya	19
5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	20
5.1. DNA ekstraksiyonu	20
6. Gerçek Zamanlı (Realt time) PZR	21
7. İstatistiksel Analiz	22
<b>BULGULAR</b>	<b>23</b>
1. Makroskobik bulgular	25
2. Mikroskobik Bulgular	28
2.1. Hematoksilin Eozin ve Ziehl-Neelsen	28
2.2. İmmunohistokimya	32
2.3. İmmunositokimya	33
3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	36
4. Biyoistatistik	38
<b>TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>39</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>45</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>54</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>55</b>

## ÖZET

Bu çalışmada farklı çiftliklerde tüberkülin testinde pozitif bulunan 2 yaş üzeri ineklerden oluşan 30 adet tüberkülozlu sığırdan (çalışmanın deney grubu) *Mycobacterium bovis* etkeninin varlığının periferik kanda saptanabilmesinde kullanılabilecek, alternatif bir tanı yöntemi denemesi ve rutin histopatoloji, immunohistokimya (İHK), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) farklı tanı yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Deney ve kontrol grubuna ait hayvanların kesimi sonrası kan ve doku örnekleri alınarak, taze dokularda PZR, formaldehitte tespit edilmiş dokulardan hazırlanan parafin blok kesitlerinde ise Hematoksilen-Eozin (HE), Ziehl-Neelsen (ZN) ve İHK yöntemi ile boyama uygulanmıştır. Santrifüje edilen Kanların ‘buffy coat’; lökosit katmanında PZR ve bu katmandan hazırlanan frotilere immunositokimya (İSK) uygulanmıştır. Deney grubundaki hayvanların 26’sında öncelikli olarak akciğer ve mediastinal lenf düğümlerinde, ilave olarak plöra ve karaciğerde kazeifiye-kalsifiye olmuş tipik tüberkül yapısı gözlenmiştir. Organlarında makroskobik lezyon (nodül, tüberkül) gözlenmeyen 4 hayvandan ikisinde spesifik olmayan lenfadenopati gözlenmiştir. Tipik makroskobik lezyon (tüberkül) gösteren olgularda ve ek olarak lenfadenopati gözlenen 2 olgudan bir tanesinde histopatolojik muayenede tipik tüberkül granulumu yapısı gözlenmiştir. Histopatolojik incelemeleri takiben yapılan ZN boyamalarda 20 tüberkülozla uyumlu bulunmuştur. Deney hayvanlarının akciğer, mediastinal lenf düğümü ve karaciğer dokularında yapılan İHK boyamalarında 30 hayvanının 25 tanesinde; lökosit katmanından yapılan İSK boyamalarının ise 3 tanesinde pozitif etken boyanmasına rastlanmıştır. Tespit edilmeden aynı dokularda gerçekleştirilen PZR’de 18 hayvana ait dokuda; lökosit katmanı PZR’inde ise 14 tanesinde pozitiviteye rastlanmıştır. İHK incelemelerinde pozitif boyanmış etkenlere, nekroz alanlarını çevreleyen bağ dokuda serbest şekilde; makrofajların, dev hücrelerinin, nadiren lenfositlerin ve fibrositlerin sitoplazmalarında rastlanmıştır. İSK incelemelerinde ise pozitif reaksiyon mononükleer lökosit sitoplazmalarında görülmüştür. Kontrol grubunda ise İSK’da 10, dokuda PZR’de 1, kanda yapılan PZR’de 2 hayvanda pozitif reaksiyon saptanmış diğer yöntemlerde herhangi bir pozitiviteye rastlanmamıştır. Sonuç olarak çalışmamızda *Mycobacterium bovis* etkenine ait moleküllerin periferik kandaki varlığı ve bu molekülleri saptamaya yönelik yöntemlerin kanda sığır tüberkülozunun tanısında kullanılabileceği gösterilmiştir. Klasik olarak ZN boyama ile yapılacak tüberküloz tanısının her zaman hassasiyet göstermediği ve teşhiste diğer

yöntemlere ihtiyaç olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle destekleyici diğer tanı yöntemi veya yöntemlerinin kullanılmasında fayda olacağı açıktır. Kullanılan yöntemlerden İHK'nın, etkili sonuç verdiği, kandan yapılan testlerde ise PZR'nin İSK'ya kıyasla daha etkili olduğu gözlenmiştir. Tüberküloz hastalığının kesin teşhisinde kullanılan tekniklerin birinin diğerine üstünlüğünden ziyade birbirini tamamlayıcılığından ve bir arada kullanıldığında teşhisin hem daha hızlı hem de daha güvenilir olduğundan bahsetmek daha yerinde olacaktır. Çalışmanın temel hedefini oluşturan, erken tanıya ve tüberkülin testi ile ön tanının doğrulanmasına imkan sağlayacak 'etkenin kan-lökosit katmanındaki tesbit edilebilirliği uygulamasının, hangi safhalarda, ne derece tercih edilebileceğini net olarak ortaya koyabilmek, yöntemi rutin kullanıma sunabilmek için ileri çalışmalar gerekmektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Mycobacterium bovis*, İHK, İSK, PZR, ZN, histopatoloji, klinik tanı, perifer kandan tanı

## SUMMARY

In this study it was aimed to provide an alternative method applicable to peripheral blood and compare various methods for diagnosing bovine tuberculosis by sampling from 30 cows older than 2 years, from various farms and found to be positive in intradermal tuberculin test. Following the slaughter of animals in experiment and control group, blood and tissue samples were collected. Polymerase chain reaction (PCR) was applied to the fresh tissue samples and Hematoxyline&Eosin (HE), Ziehl-Neelsen (ZN) and immunohistochemistry (IHC) was applied to the formalin fixed, paraffin embedded tissues. The buffy-coat extracted from the blood by centrifugation was further processed with PCR and the buffy-coat smears with Immunocytochemistry (ICC) method. In 27 of the experiment group classical tubercle lesion was observed. In the 4 animals which did not show characteristic macroscopic lesion, nonspecific lymphadenopathy was observed. In animals showing typical macroscopic lesion and additionally in one of the two lymphadenopathic cows, routine HE examination revealed typical granuloma structure. In examination of ZN stained slides, 20 animals of the experiment group was found to be consistent with tuberculosis. In the lungs, mediastinal lymphnodes and liver of the experiment group, 25 animals revealed positive staining against *M.bovis* in IHC and 3 animals in ICC. Tissues of 18 animals and buffy-coat of 14 animals were found to be PCR positive for mycobacteria. Positive staining in IHC was observed surrounding the necrosis in the connective tissue and intracytoplasmically in macrophages, giant-cells, rarely in lymphocytes and fibrocytes. Positive staining in ICC is observed intracytoplasmically in mononuclear leukocytes. Of the control group (*n*: 30); 10 in ICC and in PCR examination of the buffy coat 2 animals and of the tissue 1 animal were found to be positive. Other tests of the control group revealed negative results.

As a conclusion, this study has shown the possibility of detecting the molecules of the agent in peripheral blood and diagnostic feature of the blood in bovine tuberculosis. As a usual practice, use of ZN staining for the diagnosis of bovine tuberculosis is found to lack sensitivity and the need for supportive diagnostic tests is considered to be necessary. It was shown that IHC in tissue and PCR in blood samples was the most effective method to diagnose the disease. For the quick and accurate diagnosis of bovine tuberculosis, rather than the superiority of diagnostic methods it is more suitable to talk about the complementarity of these methods. Further studies are urgent to have precise information



about the utility of the method based on the theory of detecting agent components in buffy-coat.

**Keywords:** *Mycobacterium bovis*, IHC, ICC, PCR, ZN, histopathology, clinical diagnosis, diagnosis from peripheral blood,



## GİRİŞ

Dünya üzerinde ve ülkemizde yaygın bir hastalık olan sığır tüberkülozu zoonotik önemi nedeniyle insan sağlığını da ilgilendirmektedir (1). Dünya üzerindeki insan nüfusunun üçte birinde latent tüberküloz saptanması (2) ve insan tüberkülozu vakalarının gelişmekte olan ülkelerde %7-8'e varan oranda sığır kökenli olması, hastalığın yaygınlığı ve hayvan kökenli tüberkülozun hem hayvan hem de insan sağlığına bir tehdit olması bakımından önemlidir (3). Arkeolojik çalışmalarda bildirilen 500.000 yıl öncesine ait insan kafatasında insan tüberkülozu varlığına yönelik bulgular mevcuttur (4) ve hastalık etkeni ilk kez 1882'de Alman mikrobiyolog Robert Koch tarafından gösterilmiştir (5). Pastörizasyon ve yoğun eradikasyon programlarının sonucu olarak pek çok ülkede sığır tüberkülozu ve sığır kökenli insan tüberkülozu kontrol altına alınmıştır. Sığır tüberkülozu, *Mycobacterium bovis* etkeni tarafından oluşturulur ve genellikle kronik solunum sistemi problemlerine sebep olur. Bakteri, çomak şekilli, aside dirençli, Gram pozitif ve aerobiktir. Bakteri, duvarında daha yoğun olmakla beraber yüksek oranda lipid içerir (6,7). Etken sindirim, solunum yoluyla ve derideki yaralardan vücuda girerek bölgesel lenf yumrularına gider ve konağın bağışıklık durumuna göre bütün vücuda yayılabilir, orada sınırlı kalabilir veya ortadan kaldırılabilir (8-10). Oluşan hastalık çoğunlukla kronik zayıflama ve solunum yolu semptomları ile karakterizedir (1,11). Hastalığın klinik tanısı intradermal tüberkülin testi, gamma interferon testi ve solunum sekresyonları, süt, idrar, dışkı gibi numunelerden hazırlanan frotilerin ZN boyamasında asidorezistans basillerin görülmesi veya kültür ile mümkündür. Postmortem tanı, tipik tüberküllerin görülmesi, doku numunelerinden hazırlanan preparatların natif muayenesinde basillerin görülmesi, rutin histopatolojide tipik granulom yapısının görülmesi; basilin kültür ve identifikasyonu, taze veya formalinde tespit edilmiş dokularda PZR ile etkenin varlığının gösterimi ile mümkündür (1, 12, 13). Hastalığın tedavisi hayvanlarda uzun süre ve maliyet gerektirdiği için tercih edilmemekte, mücadele etkeni taşıyan bireylerin tespit edilip elimine edilmesi şeklinde yapılmaktadır. Dolayısıyla hastalığın klinik tanısı daha da önem kazanmaktadır. Mevcut klinik tanı yöntemleri (tüberkülin ve gamma interferon testi) bireyin normal hücrel immun yanıtı sayesinde sonuç vermekte, bağışıklığı baskılanmış bireylerde ise yanlış tanıya yöneltmektedir (14-16).

Bu çalışmada farklı çiftliklerde tüberkülin deri testi ile pozitif bulunan 26 adet 2 yaş üzeri ve 4 adet 2 yaş altı ineklerden oluşan 30 adet sığır, deney grubunu oluşturdu. Mezbahada rutin olarak kesilen 2 yaş altı, klinik belirti ve makroskopik lezyon göstermeyen 30 adet dana ise kontrol grubunu oluşturmak üzere toplam 60 hayvana ait doku ve kan örnekleri kullanılmıştır. Deney ve kontrol grubuna ait hayvanların kesimi sonrası kanın örnekleme takiben dokular da alınmıştır. Toplanan kan örneklerinin santrifugasyonunu takiben ayrılan lökosit katmanında PZR ve bu katmandan hazırlanan frotilere İSK uygulanmıştır. Taze dokularda PZR, formaldehitte tespit edilmiş dokulardan hazırlanan parafin blok kesitlerinde ise HE, ZN ve İHK metodu ile boyama yapılmıştır.

Etkenin varlığının periferik kanda saptanabilmesi tüberkülin duyarlılık testi veya gamma interferon gibi testlerin elverişli olmadığı durumlarda kullanılacak alternatif bir tanı yöntemi olarak düşünülmektedir. Tüberkülin duyarlılık testi veya gamma interferon gibi halen uygulanan tanı yöntemleri hücresel bağışıklığı normal şekilde çalışan enfekte bireylerde sonuç vermekte, bağışıklık düzeyi yetersiz olanlarda ise yanıltıcı olabilmektedir (11,13). Bağışıklık düzeyi yetersiz hayvanlarda hastalığın sıklıkla generalize formda seyrettiği ve bakteriyel saçılımın yüksek olduğu düşünülecek olursa, bunların tespit ve eliminasyonu önem kazanmaktadır. Klinik örneklerden yapılan izolasyon ve identifikasyon işlemi için uzun sürelere ihtiyaç duyulur. Buna karşın PZR ise etkenin nükleik asidinin saptandığı hızlı bir tanı yöntemi olup, bu yöntemin sığır tüberkülozunun tanısında kullanılması tanı süresini kısaltmaktadır. Bu tez çalışması sırasında yapılan İHK yöntemiyle dokularda ve kandaki lökositlerde mikobakteriyel antijenler gösterilerek, etkenin doku ve hücre içi lokalizasyonu arasında uyuma bakılmıştır.

Hastalığın tipik ancak patognomonik olmayan tüberkül yapısı mikobakteriler dışındaki nedenlere (paraziter, bakteriyel ve tümoral vb) bağlı olarak da şekillenebilmektedir. Etkene spesifik mikobakteriyel nükleik asidin ve antijenin gösterimi ile bu lezyonların hangi oranda mikobakterilere bağlı olarak şekillendiği ortaya konmuş, böylece hastalığın tanısında sıklıkla kullanılan makroskopik muayenede tüberküllerin gözlenmesi olgusunun ne kadar güvenilir olduğuyla ilgili veriler de elde edilmiştir. Çalışma, kan ve dokunun beraber olarak incelendiği, farklı tanı yöntemlerinin sığır tüberkülozu tanısında kullanıldığı özgün bir çalışmadır. Periferik kanda mikobakteriyel nükleik asidin gösterilerek yapıldığı tüberküloz

tanısı çalışmaları insanlarda denenmiştir (17-22). Sığır tüberkulozunun tanısında bahsi geçen yöntemlerden PZR ve İHK dokularda kullanılmıştır ancak periferik kanda denenmemiştir (23, 24). Sunumu yapılan bu tez çalışmasında, hastalık etkeninin kanda tespit edilebilirliği ortaya konmuş, bu yönde farklı tanı yöntemlerinin etkinliği karşılaştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçların, sığır tüberkulozu konusunda yalnızca ülkemiz için değil diğer ülkeler için de aydınlatıcı olacağı düşünülmektedir. Yapılan bu alışma;

1. Sığır tüberkulozunun canlı hayvanlarda hızlı tanısı için etkenin varlığının ve lokalizasyonunun moleküler ve sito-histopatolojik yöntemler kullanarak göstermeyi,
2. Tüberkülin deri testi ve makroskopik muayene gibi klinik ve mezbaha koşullarında gerçekleştirilen tanı yöntemlerine alternatif bir yöntem oluşturarak hayvan ve insan sağlığını tehdit eden sığır tberkulozu ile mücadelede erken ve güvenilir tanı yöntemi geliştirmeyi,
3. Hastalık etkenine ait bileşenlerin kanda tespit edilebilirliği ve dokudaki lezyonlar ile ilişkisinin ortaya konması ve
4. Hastalığın patogenezi anlamada önemli verilerin elde edilmesini amaçlamaktadır.

## GENEL BİLGİLER

### 1. TANIM

Tüberküloz, hayvan ve insanlarda *Mycobacterium* cinsi bakteriler tarafından oluşturulan sıklıkla solunum yollarında problemlere yol açan kronik bir hastalıktır. Sığır tüberkülozu etkeni *Mycobacterium bovis*' tir (1).

### 2. TARİHÇE

Eski bir hastalık olan tüberküloz, tüm dünyada önemli medikal problemlere ve ekonomik kayıplara neden olur. Dünya üzerindeki insan nüfusunun üçte birinde latent tüberküloz görüldüğü bildirilmektedir (2). Tarihçesi 500000 yıl öncesine kadar giden tüberküloz hastalığının sığırlara toprakta mevcut saprofit mikobakterlerden geçtiği ve hastalık oluşturduğu düşünülmektedir. Tüberküloz hastalığının insanlara bulaşmasının, insanlığın yerleşik yaşama geçmesi, hayvan evcilleştirme ve bir arada yaşama sürecinin başlaması ile oluştuğu tahmin edilmekteydi ancak son yapılan filogenetik çalışmalar bu teoriyle uyuşmamakta, insan tüberküloz etkeninin, sığır tüberküloz etkeninden çok daha önce ortaya çıktığını göstermektedir (23). Hastalık, tarih boyunca farklı şekillerde yorumlanmış, pek çok insan ve hayvan ölümüne neden olmuştur (25, 26). Hastalığın etkeni ilk kez 1882 yılında Alman mikrobiyolog Robert Koch tarafından tanımlanmıştır (5). Dünya üzerinde her yıl 2-3 milyon insan tüberküloz nedeniyle ölmekte ve 8 milyon insan da hastalığa tutulmaktadır (27). Gelişmekte olan ülkelerde insan tüberkülozu vakalarının %7-8'e varan oranda sığır kökenli olduğu bildirilmektedir (3).

Avrupada 1953-1980 yıllarında yapılan eradikasyon çalışmaları sonucunda hastalık önemli ölçüde önlenmiş, daha sonraki on yıl içerisinde sporadik vakalar bildirilmiştir. Ancak 1991 yılında İspanya (%10,8), Fransa (%0,3), İrlanda (%8,8), Yunanistan (%0,3), İtalya (%3,7) gibi Avrupa Birliği ülkelerinde yüksek prevalanslar bildirilmiştir. Bunun üzerine üye ülkelerin katılımıyla oluşturulan komisyon 1996 yılında karar almış ve sürülerdeki hayvanlarının %99,9'unda 10 yıl süre ile tüberküloz ari bulunan ülkeler tüberkülozdan ari sayılmıştır. Uluslararası Hayvan Hastalıkları Ofisi (OIE) ise hastalığın taranmasında pozitif

hayvanların toplam sürü varlığının %0,2'sini geçmeyen ülkeleri tüberküloz ari kabul etmektedir (28).

Türkiye'de sığır tüberkülozu üzerine çalışmaların 1900'lü yıllarda başladığı bildirilmektedir. Türkiye, OIE tarafından tüberkülozun bulunduğu ülkeler arasında kabul edilmektedir. Ülkemizde sığır tüberkülozu konusunda bilimsel çalışmalar (29-33) ve vaka bildirimleri (34-38) bulunmasına rağmen, hastalığın insidensi ve gerçek boyutları konusunda kapsamlı araştırma ve güncel bilgiler bulunmamaktadır (39).

### 3. ETİYOLOJİ

Mikobakteriler, *Actinomycetales* takımının *mycobacteriaceae* ailesinde sınıflandırılmaktadır. *M.tuberculosis* ve *M.avium* kompleksleri, diğer patojen mikobakteriler ve saprofitik mikobakterileri içeren mikobakteri cinsi, çomak şekilli, aside dayanıklı, Gram pozitif, aerobik bakterilerdir (5, 6). Hücre duvarlarında daha yoğun olmakla beraber, bu bakteriler lipidler yönünden oldukça zengindir. Patojenik ve immunolojik özellikleri önemli ölçüde bu lipid yoğunluğundan kaynaklanır. Bakterilerin yüzeylerindeki peptidoglikan ve glikolipidler; koloni karakterini, serolojik spesifiteyi, bakteriyofaj duyarlılığını ve fagositoza dayanıklılığını belirler. Bakterinin hücre duvarı komponentlerinden elde edilen otolizatların, nötrofil hareketini baskılayıcı, mitokondriyel aktiviteyi bozucu, hücresel bağışıklığı tetikleyerek granülom oluşturucu özellikleri vardır. Yapılarındaki sülfolipidler ve fosfatidil inositol mannozid; oksijen radikallerini baskılar, fagolizozom oluşumunu önler, fagositoz sırasında oksijen radikallerinin etkinliğini azaltarak bakteriyi fagositoza dirençli kılar. Hücre duvarındaki mikobaktinler demir bağlamada görevlidir. Tüberkülin, bakteriyel büyüme sırasında ortama salınan peptitlerdir ve vücutta gecikmiş duyarlılığı tetiklerler. Bakteri duvarındaki mikolik asidin, antibiyotiklere karşı dayanıklılıkta önemli yeri vardır. Kültür ortamında çoğaltmak için yumurta bazlı katı besiyeri olan Lowenstein-Jensen besiyeri ve bazı sıvı besiyerleri de kullanılmaktadır. Generasyon süresi 12 saat ve üzerindedir, kolonilerin görünür hale gelmesi haftalar alır. Genel olarak *M.avium* kompleks grubuna ait türler *M.tuberculosis* kompleksine ait olanlardan daha hızlı ürerler (6, 8, 11). *M.tuberculosis*, *M.canettii*, *M.africanum* öncelikli olarak insanlarda, *M.bovis* sığırlarda, *M.caprae* keçilerde, *M.pinnipedii* foklarda, *M.microtii* kemirgenlerde, *M.avium* kanatlılarda, *M.avium* subsp.

*paratuberculosis* ruminantlarda, *M. avium* subsp. *hominisuis* domuz ve ruminantlarda, *M. marinum* ise balıklarda patojen türlerdir (7, 8).

Mikobakteriler, pek çok antimikrobiyel maddelere, bakteriyostatik boyalara, dezenfektanlara ve kurumaya dayanıklıdır. Toprakta uzun süre canlı kalırlar. En çok fenolik dezenfektanlardan etkilenirler. Güneş ışığı, ultraviole ışık ve pastörizasyon sonucunda ölürlar (11).

#### **4. EPİDEMİYOLOJİ**

Bakterinin kaynağı, tüberkülozlu bireylerdir. Yabani hayvanların hastalık rezervuarı olarak önemli yeri vardır (3, 6, 12, 40). Yabani ruminantlar, yabani domuz, sansargiller, deve, fil, tapir, kemirgenler, köstebek, rakun, kedigiller gibi geniş bir tür listesinde etken izolasyonu yapılmıştır (14, 41, 42). Porsuk, feret ve Avustralya posumlarının hastalığın evcil hayvan-yabani hayvan bulaşma döngüsünde rolü büyüktür. İngiltere’de yoğun önlemlere rağmen evcil hayvanlarda hastalığın sonlandırılmaması sonrasında kaynağın yaban hayat olduğu düşünülmüş ve porsuklarda yapılan incelemeler sonucunda etkenin, evcil hayvanlara porsuklardan sürekli taşındığı saptanmıştır (8, 40, 43-45). Ülkemizde de yaylacılık geleneğinin sonucu olarak hastalığın yaban-evcil döngüsü tamamlanmaktadır (46).

#### **5. BULAŞMA VE PATOGENEZ**

Mikobakteri; damlacık, dışkı, idrar, genital akıntılar, süt aracılığıyla solunum ve sindirim yolundan bulaşır. Deri, plasenta ve kanatlılarda ovaryumlardan bulaşma nadir rastlanan durumlardır. Hastalığın annede sistemik bir gelişme gösterdiği durumlarda buzağılarda intrauterin enfeksiyon görülmüştür (6). Sığır tüberkülozunun yoğun görüldüğü bölgelerde, insanlarda da çiğ süt ve ürünlerinin tüketiminden kaynaklanan tüberküloz olguları görülmektedir. Ayrıca mezbaha çalışanları ve kontamine materyalle direk temasta bulunan meslek gruplarındaki insanlarda deride lezyonlar gözlenmektedir (3, 8). Bulaşma yolu hastalığın şekillendiği organla bağlantılıdır. Sığırlarda bulaşma daha çok damlacık şeklinde solunum sistemi yoluyla olur. Sindirim yoluyla enfeksiyon için genellikle daha yoğun dozlar gerekmektedir (8). Lezyonların vücuttaki dağılımı bulaşma yoluna ve immuniteye göre değişmektedir. Sığır tüberkülozunda lezyonlar çoğunlukla solunum sistemi ve ilgili lenf

düğümlelerinde (retrofaringeal, bronşiyal ve mediastinal) sınırlı kalmaktadır (9, 10). Lezyon gösteren sıgırların %10-20 sinde akciğer lezyonları gözlenmekte ve bunlar özellikle de kaudal loplarda yerleşmektedir. Bağırsak ve mezenteriyel lenf yumrularında tüberkül ve kazeöz ülser oral bulaşma veya bakteri içeren solunum sekretlerinin yutulmasına işaret eder. Karaciğerdeki tüberküloz tutulumu ise hematojen yayılıma veya intrauterin enfeksiyona işaret eder. Tüberküller, 1-40 mm çapında, çoğunlukla bağ dokudan oluşan kapsülle çevrelenmiş, sınırları belirgin, sarı-kazeöz, nekrozlu veya mineralize, granulomatöz yangısal odaklardır. Tüberküllerin tipik mikroskopik görüntüsü merkezde kazeifikasyon nekrozu, etrafında mononükleer yangı hücreleri ve dev hücrelerinin (Langhans tipi dev hücresi) bulunmasıdır. Kazeifikasyon nekrozunun oluşmasında, aktif makrofajlardan salınan matriks metalloproteinazların önemli rolü olduğu bildirilmiştir (8).

Müköz membranlardaki bakteriler, yüzeylerinin opsoninlerle kaplanması sonucunda bölgesel makrofajlar tarafından fagosite edilir (15). Primer organda (akciğer ve bağırsak) lezyon gözleniyor ve bölgesel lenf yumrularında da lezyon şekillenmiyorsa 'primer kompleks' olarak isimlendirilir. Vücudun bağışıklık durumuna göre etken ömür boyunca burada sınırlı kalabilir, diğer organlara yayılabilir, kapsülle çevrelenip latent hale geçebilir (8, 47). Reenfeksiyon durumlarında etkenin lenfojen yayılımı bellek hücrelerinin etkinliği sonucunda sınırlandırılır. Reenfeksiyon genellikle primer kompleksin aktif hale geçmesi ve etkenin makrofajlar içerisinde hematojen yolla vücuda yayılması şeklinde olur. Bu durum milier tüberküloz şeklinde görünümün oluşmasına neden olur. Reenfeksiyonlarda hastalık daha çok doku nekrozlarının yoğun olduğu lezyonlarla seyreder. Bakteriye fagosite eden makrofajlar bölgeye diğer mononükleer hücrelerin çağrılmasına yarayan sitokinleri (tümör nekroz faktörü (TNF)- $\alpha$ , C-C kemokinleri) ve mikobakterilere karşı bağışıklıkta önemli yeri olan interferon gammanın CD4<sup>+</sup> Th-1 hücreleri tarafından salınımına sebep olan IL-12 üretirler. İnterferon  $\gamma$  üreten lenfositler, hücrel bağışıklığın göstergesidir. Nitekim, enfeksiyonu takiben 18-24. günlerde kanda interferon  $\gamma$  yükselişi tespit edilebilir. İnterferon  $\gamma$  ve TNF-  $\alpha$  tüberkül oluşumunda sinerjik olarak çalışırlar (8, 10, 48). Salınan sitokinlerle aktive olan makrofajların mikobakterileri fagositozla öldürme kapasiteleri artar. İmmun sistem, bakteriyi fagosite etmiş makrofajları, hücrenin salgıladığı 'stres proteinleri' aracılığıyla tanır. Bazıları hücrede normalde de bulunan, bazıları ise hipertermi, oksidatif stres, ağır metallerin etkisinde kalma,



enfeksiyöz etkenler gibi hücre için anormal koşullara yanıt olarak hücre tarafından salgılanan stres proteinleri, hücrenin reseptör yapısını veya proteinlerinin katlanma özelliklerini etkilemektedir. Mikobakterilere karşı yanıtta her ikisi de makrofaj türevi olan epitelooid hücreler ve dev hücreleri öne çıkan hücrelerdir (6, 10). Makrofaj etkinliği sonucu oluşan kazeifiye nekrotik alanlarda bakteri üreyemez ve latent şekilde kalır (8).

Etkili bir hücrel immun yanıt mikobakterilerin etkisiz hale getirilmesinde çok önemlidir. Ancak mikobakterilerin immun yanıtta kaçmada etkili mekanizmaları vardır. Bakterinin hastalık oluşturabilmesi için reaktif nitrojen ve oksijen ürünlerine, hipoksiye, düşük pH'ya, besinsizliğe ve bakteri duvarı hasarına karşı dayanması gerekmektedir. Öncelikle bakteri duvarlarındaki kalın mumsu tabaka fagositoza dirençte etkilidir. Virulent suşların fagozom içerisindeyken sitoplazma içerisine geçebilme kabiliyeti vardır (40). Bakteri, fagolizozom oluşumunu da engellemektedir. Sahip olduğu süperoksid dismutaz enzimleri ile oksidatif hasardan korunur. Bakteriler 'iki bileşenli sistem' (two compound system) sayesinde çevresel değişimlere uyum sağlarlar. Bu mekanizmada çeşitli sigma faktörler görev alır. Sigma faktörleri, prokaryotik hücrelerde RNA polimeraz enziminin gen promotörlerine bağlanmak suretiyle transkripsiyonu başlatan faktörlerdir (7).

## **6. KLİNİK TABLO**

Hastalığın klinik semptomları oldukça farklılık göstermektedir. Pek çok olguda kronik seyretmekte ve yaygın organ tutulumuna rağmen belirgin bir semptom göstermemektedir. Akciğer tutulumunda sıklıkla dispne, öksürük ve hatta ileri aşamada şiddetli lenfadenopati nedeniyle solunumun engellenmesi gözlenebilir. Sindirim sistemi tutulumunda ise aralıklı ishal ve sıklıkla konstipasyon gözlenir. Hastalığın ileri aşamasında şiddetli kaşeksi ve solunum depresyonu oluşabilir. Genital kanal tutulumu nadir de olsa şekillenebilir (1, 11).

## **7. TEDAVİ VE KORUNMA**

İnsan tüberkülozu, 1940 lı yıllarda isoniazidin bulunmasıyla önemli ölçüde tedavi edilmiştir. Daha sonra hatalı ilaç kullanımları ve toplumsal göçler sonucu *M.tuberculosis* 'in antibiyotiklere dirençli suşları oluşmuştur. Güncel olarak insanlarda isoniazid, rifampisin, ethambutol, pyrazinamid isimli antibiyotikler 6-12 ay süreyle kullanılmaktadır (15, 25).

Hayvanlar ise uzun tedavi süreci ve maliyeti nedeniyle genellikle tedavi edilmeyip kesime gönderilmektedir. Bu yüzden hayvanlarda tanı, tedavinin önüne geçmektedir. Aşılamalar insanlarda önemli ölçüde koruma sağlamaktadır. Bunun için zayıflatılmış *M.bovis* olan Bacille-Calmette Guarin (BCG) aşısı kullanılmaktadır. Aşılamanın insanlardaki etkinliği çevresel mikobakteri varlığıyla ilişkili olarak çok değişkenlik göstermektedir. İngiltere’de %75’e varan koruma oranına karşın Güney Hindistan’da %0 şeklinde bir oran bildirilmektedir. Sığırlarda da insanlardaki aşı korumasında benzer bir durum söz konusudur. BCG aşısının yanında WAg500 ve WAg501 gibi *M.bovis*’in zayıflatılmış farklı suşları da denenmiştir (49).

## 8. TANI

Tüberküloz tanısı tek bir yöntemle güvenilir şekilde konulamamaktadır (50, 51). Klinik semptomlar ve nekropside tipik tüberkül gözlenmesi tanıya yardımcı olabilir. Canlı hayvanlarda tanıda rutinde kullanılan iki yöntem mevcuttur. Bunlar tüberkülün deri testi ve gamma interferon testidir (1, 12, 13). Ayrıca hastalığın serolojik tanısına yönelik çalışmalar (52) ve ticari ürünler (BovidTB Stat-pak®Assay, Chembio Diagnostic Systems, New York, USA) bulunmaktadır. Tüberkülün deri testi deri içerisine saflaştırılmış protein derivatı enjekte edilerek yapılır. Enjeksiyon öncesinde ve enjeksiyonu takiben 72. saatte yapılan deri kalınlığı ölçümleri ve aralarındaki farkın yorumlanmasına dayanan test, immünolojik açıdan “gecikmiş tip aşırı duyarlılığın“ bir sonucudur. Test, aktif veya latent tüberkülozu ayırt edememekte sadece bireyin enfekte olup olmadığı hakkında bilgi vermektedir. Yanlış negatif ve pozitif sonuçlar gözlenebildiğinden bazı sorunlara neden olabilir. Örneğin test, hastalığın erken dönemlerinde, ya da bağışıklığı baskılanmış bireylerde yanlış negatif, diğer adi bakterilere veya patojen olmayan mikobakterilere karşı reaksiyon nedeniyle de yanlış pozitif sonuç verebilir (53). Diğer tanı imkanı olan gamma interferon testi, test edilecek canlı hayvandan alınan kandan lökositlerin izole edilip hücre kültüründe *Mycobacterium bovis* antijenine maruz bırakılması sonucu, lökositler tarafından üretilen gamma interferonun ölçümüne dayanır. Bahsedilen her iki test de bireyin etkene karşı aktif bir bağışıklığının olması durumunda kullanılabilir (11, 13). İmmun sistemi baskılanmış bireylerin, generalize tüberküloz hastası olmasına rağmen her iki testte de negatif sonuç verdiği durumlarla karşılaşılmaktadır. Örneğin, edinsel immün yetmezlik sendromlu (AIDS) insanların tüberküloza yatkın olduğu ve klinik testlere sıklıkla yanlış negatif yanıt verdikleri bildirilmektedir (14-16). Bu durumda

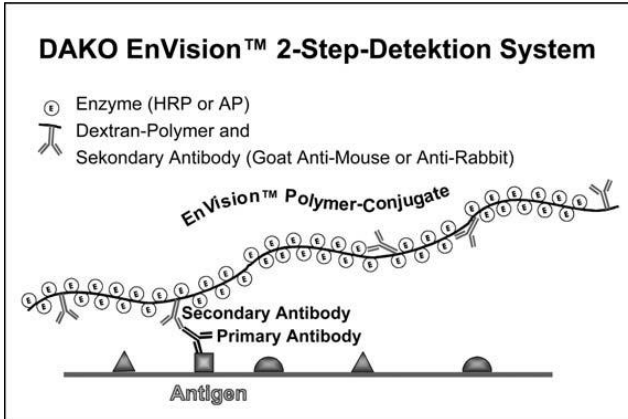
etkenin kendisinin veya bir komponentinin gösterimi tanıda önem kazanmaktadır. Solunum salgıları, lezyonlu dokular, süt ve idrardan hazırlanan preparatlarda ZN boyamada basilleri görmek mümkün olabilir ancak bu yöntemin hassasiyeti oldukça düşüktür. Makroskobik lezyon görülen dokularda histopatolojik incelemede tipik granülom yapısını görmek ve yine doku kesitlerine ZN boyama yapıldığında mavi zemin üzerinde kırmızı-pembe basilleri görmek teşhise yardımcı olur. Ancak, tür spesifikasyonu aşamasında ve az sayıda basilin bulunduğu durumda (*pausibasiller enfeksiyon*) tanı yetersiz kalabilir (54, 55). Latent faza geçen mikobakterilerin duvar yapısındaki değişimler de ZN boyamanın güvenilirliğini azaltmaktadır (56). Ayrıca etken floresan boyalar (rodamin ve oramin) ile de boyanır (11). Bununla beraber, bu boyaların kullanıldığı yöntem rutin tanıda pek kullanılmamaktadır. Etkenin, bahsi geçen klinik örneklerden kültürü mümkündür fakat inkübasyon süresinin uzunluğu nedeniyle kullanışlı değildir (1, 6, 50, 56). Son zamanlarda yarı otomatize BACTEC 460 sistemi gibi radyometrik kültür yöntemi ile de klasik kültür yöntemlerine göre daha hızlı tanı mümkündür. Bu yöntemde, bakteriyel büyüme ortamına katılan radyoaktif karbon-14 ( $^{14}\text{C}$ ) içeren palmitik asitten, bakteriyel üreme sonucu açığa çıkan  $^{14}\text{CO}_2$  ölçülmektedir. Sistem oldukça duyarlı ve hızlı, ancak mikotik kontaminasyonlara açıktır (12). İmmunohistokimya ile mikobakteriyel antijenlerin gösterimi mümkündür ve rutin histopatolojiye göre daha güvenilir bir yöntemdir. Bakteriyel nükleik asidin gösterimi ile tanı için PZR yöntemi kullanılabilir. Dokuda nükleik asit gösterim yöntemlerinden bir diğeri '*In situ* hibridizasyon (İSH)'dur. Yöntem, aranan nükleik asidin dokuda lokalizasyonunu göstermeye yarar. Yöntemin optimizasyonu zor olsa da fazla laboratuvar donanımına ihtiyaç duyulmaması nedeniyle avantajlıdır. İSH veya floresanla işaretlenmiş proplarla yapılan İSH, mikobakteriyel enfeksiyonların teşhisinde kullanılmaktadır (55, 57-60).

Tüberküloz tanısında yukarıda açıklanan yöntemlerden bazılarının uzun zaman gerektirmesi, bazılarının ise etkenin sayısı az olduğunda ve immun sistemi zayıf hayvanlarda kullanıldığında hatalı sonuç vermesi göz önüne alındığında, tanı yöntemlerinin eksikliğini gidermeye yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Buna ek olarak yöntemler arasındaki uyumsuzluk, tutarsızlık tüberkülozun tanısında alternatif yöntemler kullanmayı zorunlu kılmaktadır (61).

## 9. İMMUNOHİSTOKİMYA

İHK spesifik bir antijenin, antijen-antikör bağlanması esasına dayanarak, doku veya hücrede gösterilmesine yardımcı olur. Geçmişte, Coons'un 1940 yılında dondurulmuş dokularda immunofloresan yöntemi uygulamalarına dayanan İHK yöntemi, sürekli geliştirilmiş ve güncel halini 1990'ların başında almıştır. Antikörlerin enzimlerle işaretlenebilmesiyle incelemenin normal ışık mikroskopunda yapılması mümkün hale gelmiştir. Antikörler, plazma hücreleri tarafından, belli bir antijene karşı üretilen, hafif ve ağır olmak üzere iki zincirden oluşan protein yapıda moleküllerdir. Antijen ise çoğunlukla protein veya karbonhidrat yapıda, organizmaya yabancı kompleks moleküllerdir. İHK yönteminde monoklonal veya poliklonal antikörler kullanılmaktadır. Poliklonal antikörlerin, bir antijen üzerindeki birden fazla epitopu tanıma özelliğinden dolayı sensitiviteyi yüksek ancak spesifiteyi düşüktür. Bu nedenle, İHK yönteminde istenmeyen, nonspesifik boyanmaları önlemek için boyanacak doku kesitinde protein blokajı, enzim inhibisyonu yapılması gereklidir. Aranan antijene spesifik antikörlerin ışık mikroskopunda görülebilmesi için işaretli moleküllerin kullanılması gerekir. İşaretleme doğrudan aranan antijene spesifik antikörün (primer antikör) kendisine veya primer antiköre spesifik diğer bir moleküle (sekonder antiköre veya özel bir moleküle) uygulanabilir. İşaretleme işleminde hidrojen peroksidaz, glukoz oksidaz, alkalin fosfat enzimleri kullanılmaktadır. Bir dokuda birden fazla antijen gösterilmek istendiğinde işaretlemede farklı enzimler kullanılmaktadır. Alkalin fosfat sıklıkla kullanılan peroksidaz enziminin alternatifidir. Farklı enzimlerin farklı renk veren substratları olması nedeniyle farklı antijenler aynı kesit üzerinde görünür hale gelmektedir. İndirekt saptama (işaretleme sekonder antikör veya molekül kullanılması) primer antikörün daha düşük konsantrasyonlarda kullanımına olanak sağlaması, antijen-antikör bağlanmasını daha belirgin, çoğaltarak göstermesi ve sekonder basamağın farklı antijenlere spesifik primer antikörlerle kullanımının pratik olması nedeniyle daha fazla tercih edilmektedir. Aranan antijenin saptanmasında peroksidaz-antiperoksidaz (PAP), avidin-biotin konjugasyonu (ABC), biotin-streptavidin (BSA), polimer tabanlı sistemler, Tiramın Sinyal Amplifikasyonu (TSA), protein A, işaretli antijen gibi farklı sistemler kullanılabilir. Bu sistemlerden biotin tabanlı çalışanları, endojen biotin nedeniyle nonspesifik boyanmalara yol açabilmektedir. Polimer tabanlı çalışan sistemlerin, kullanılan moleküllerin büyük olması

ve doku penetrasyonunda sıkıntı yaşanması nedeniyle sensitivitesinin düşük olduğu belirtilmektedir. Ancak daha küçük polimerler kullanılarak denenen sistemler (PowerVision®, ExposeKit®, Envision®) sayesinde bunun önüne geçilmiş ve oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır. Polimer tabanlı sistemler çok sayıda enzim ve antikorun primer antikora bağlanması ve dolayısıyla daha şiddetli substratın aktive olması nedeniyle daha parlak sinyal alınmasına yarar. Tespit, antijenlerin açığa çıkarılması, endojen moleküllerin inhibisyonu, primer antikor-antijen bağlanması, sekonder moleküllerin bağlanması, enzim-substrat reaksiyonu, zemin boyama aşamalarını içeren immün boyama yöntemi, formaldehitte tespit edilmiş parafine gömülmüş dokulara, dondurulmuş dokulara ve sitolojik preparatlara uygulanabilmektedir. Tespit solusyonu olarak formaldehit tercih edilmektedir. Antijenlerin açığa çıkarılmasında enzimatik yöntem ve tampon çözeltide ısı uygulaması şeklinde farklı yöntemlerden ikincisi daha fazla tercih edilmektedir (61, 62). İHK, yaygın olarak tümörlerin tiplendirilmesi amacıyla kullanılmakla birlikte doku ve hücrelerin antijenik yapılarının ortaya konduğu temel bilimsel çalışmalarda, infeksiyöz etkenlerin tanısında da yardımcı olmaktadır (61-66). Mikobakteriyel antijenlerin gösteriminde de İHK yöntemine başvurulmaktadır (67-71). Aranana etkene ait antijenlerin doku veya hücre içindeki lokalizasyonunun gösterilmesi hastalığın patogenezinin anlaşılmasında önemlidir (55).



Şekil-1: Polimer tabanlı İHK reaksiyonunun ilustrasyonu

## 10. İMMUNOSİTOKİMYA

İSK spesifik bir antijenin kendisine özel antikolar yardımıyla hücrelerde gösterilmesine dayanan bir yöntemdir. Sıklıkla eş anlamlı kullanılan İSK ve İHK, prensip olarak benzer çalışır. Fark olarak doku yerine hücre kültürü veya süspansiyonlarında spesifik antijenin aranması belirtilebilir. İSK’da dokularda olduğu gibi uzun bir fiksasyon veya takip süreçleri gerekmemektedir. Ancak, sıklıkla efüzyonların incelenmesi ve neoplazi tanısında kullanılan İSK yönteminde proteinöz örneklerle çalışıldığı ve nonspesifik reaksiyon ihtimalinin yüksek olması nedeniyle örneklerin ön işleme önem kazanmaktadır. Nitekim, hücresel örnekler froti, sitospin, hücre bloğu, Thin-prep gibi farklı şekillerde hazırlanabilen yöntemleri irdeleyen çalışmalar bulunmaktadır (72, 73). Adeziv lam yüzeyine tutunan hücelere antikoların etkimesinde ekstraselüler sıvı ve membran geçirgenliğinin önemi vardır. Bu nedenle materyal daha önceden, deterjan (Tween-20 veya Triton X-100) veya organik fiksatiflerle (aseton, metanol, etanol) muamele edilir. Hücrelerden hazırlanan bloklarda, normal doku takibi uygulandığı için ilave olarak penetrasyon aşamasına ihtiyaç duyulmaz. İSK’da da, İHK’da olduğu gibi, peroksidaz-protein blok, antijenlerin açığa çıkarılması, primer antikor, sekonder antikor ve deteksiyon sistemi aşamaları bulunmaktadır (74). Daha çok neoplazilerin hızlı tanısında başvurulan İSK yöntemi insanlarda, lenf yumrusu aspiratlarında tüberküloz tanısında da kullanılmıştır (75).

## 11. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

PZR oldukça az miktarda nükleik asitin bulunduğu numunelerde bile kullanılabilen hızlı, güvenilir bir tanı yöntemidir ve mikobakteriyel enfeksiyonların tanısında kullanılmaktadır (76-78). Ancak aranan nükleik asidin dokudaki lokalizasyonunu göstermede eksik kalan PZR yöntemi, gerektirdiği laboratuvar donanımının maliyeti ile pahalı bir yöntemdir.

PZR uygun sıcaklık ve enzimatik ortamın sağlanmasıyla, hedef nükleik asidin kısa sürede yüksek miktarlarda elde edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Oldukça az miktarlarda nükleik asit içeren örneklerde çalışılırken avantaj sağlayan yöntem, aranan molekülün dokularda yerleşimi hakkında bilgi verememektedir. PZR işleminde hedeflenen nükleik asit dizisinin çoğaltılmasını sağlayan primer nükleotid dizileri kullanılır. Tekrarlayan ısıtma ve soğutma döngülerinin sonucunda, düzenlenmiş (nükleik asit dizisi bilinen) primerlerin rehberliğinde

ortama eklenen nükleotidler kullanılarak hedeflenen genetik dizi yüksek miktarlarda çoğaltılır. Kullanılan enzimlerin ısıya dayanıklı olması gerekir. İlk kez 1983 yılında uygulanan PZR yöntemi günümüzde infeksiyöz hastalıkların ve tümörlerin tanısında, gen ekspresyonu gösteriminde, bilinmeyen materyalin türünün tayininde (gıda analizleri, ebeveynlik testi vb), diğer moleküler yöntemlerde kullanılmak üzere nükleik asit çoğaltımında kullanılmaktadır (79, 80). Denaturasyon, birleşme, uzama basamaklarını içeren PZR uygulamasının, standart PZR, Real-Time PZR, Reverse Transcription PZR, Nested PZR, Multipleks PZR, Hot start PZR ve çok sayıda farklı varyasyonları vardır (80, 81).

Nükleik asitlerin gerçek zamanlı PZR ile tespiti oldukça gelişmiş ve yaygınlaşmıştır. İnfeksiyöz hastalıkların tanısında da rutin kullanımı günden güne artan bu yöntem ile yüksek sensitivite, spesifite ve geniş çizgisel dinamiğe sahip sonuçlar almak mümkündür. Replikasyon basamağını takiben ayrı bir görüntüleme işlemini gerektirmeden, replikasyon gerçekleşirken, görüntülemeyi sağlayan gerçek zamanlı PZR hızı, az miktarda sarf malzemesine ihtiyaç duyulması ve hızlı ısıtma/soğutma oranı nedeniyle olumlu; örneklemedeki hassasiyet ve yöntem optimizasyonundaki zorluk nedeniyle olumsuz olarak yorumlanabilir. Reaksiyonun gerçek zamanlı olarak görüntülenmesini sağlayan bileşen, çift sarmal DNA molekülüne bağlanma özelliği gösteren floresan özellikte siyanin boyalardır (SYBR Green, SYBR Gold, Oxazole Yellow). Bu boyalar herhangi çift sarmal DNA molekülüne bağlanarak nonspesifik reaksiyonlara yol açabilmektedir. Bu nedenle gerçek zamanlı PZR spesifitesini arttırmak amacıyla TaqMan problemleri geliştirilmiştir. Primerlere tutunan, 5' ucunda floresan (FAM, TET gibi) ve 3' ucunda soğurucu molekül (TAMRA, MGB gibi) bulunan TaqMan problemleri, replikasyon gerçekleşirken bağlı oldukları primerden ayrılarak parçalanır ve ışığa gösterirler. Böylece yalnızca spesifik gen bölgesinin replike olması sonucu açığa çıkan ışığa görüntülenmiş olur (82). Mikobakterilerin tanısı ve tiplendirilmesinde PZR yöntemine başvurulmaktadır (17-22). Sığır tüberkülozu ile ilgili çok sayıda PZR çalışması vardır (23, 24). *M.bovis* saptanması amacıyla bakterinin genomik DNA'sı veya ribozomal RNA'sına odaklanılabilir. Kullanılan başlıca gen bölgeleri 16S rRNA (83), 16-23S intergenic spacer (84), IS6110 (85) şeklindedir. Ayrıca son zamanlarda *M.tuberculosis* kompleksine dahil türlere özgü gen delesyonlarının gösterimi de identifikasyonda yardımcı olmaktadır (18, 20, 22, 23, 86).

## 12. KAN LÖKOSİT KATMANI (BUFFY COAT):

Kan, antikoagulanlı tüplere alınıp santrifüje edildiğinde öz kütleleriyle orantılı ilişkili olarak bileşenlerine ayrışır. Tüpün en alt kısmından üste doğru sıralandığında; eritrosit, trombosit, lökositler ve plazma şeklinde bir ayrışma gerçekleşir. Lökositlerin yoğun olarak bulunduğu 'buffy coat', beyaz-opak, ince bir katman şeklinde görülebilir. İçerisinde lenfosit, monosit, dendritik hücreler, polimorfonükleer lökositlerin bulunduğu buffy coat, insanlarda tüberküloz hastalığının tanısında (78), hayvanlarda malignant kataral ateş (87), trypanosomiasis (88) gibi çeşitli bulaşıcı hastalık tanısında çalışılmıştır. Sığırlarda mikoplazma enfeksiyonunda yapılan çalışmada (89) etkenin kan lökosit katmanını içerisindeki mononükleer lökositlerine afinitesi olduğu saptanmış, bunun hastalığın patogenezinde önemli yeri olduğu öne sürülmüştür. Sığırlarda kan lökosit katmanında tüberküloz etkeni gösterilmesi veya sığır tüberkülozu tanısına yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sunumu yapılan çalışma, mononükleer lökositlerin kan-doku arasında dolaşımı, kanda buldukları esnada, öncesinde dokuda fagosit etmiş oldukları antijenlerin gösterilebilirliği esasına dayanmıştır.



## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasının etik açıdan uygunluğu TC Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından **27.03.2012** tarihi ve **2012-04/06** karar numarasıyla onaylanmıştır.

### 1. ÖRNEKLENEN HAYVANLAR

Çalışmada, farklı çiftliklerde tüberkülin deri testi uygulamasında enfeksiyon tespit edilerek kesime sevk edilmiş, 26 tanesi 2 yaş üzeri, 4 tanesi 2 yaş altı süt sığırlarından oluşan deney grubu ve mezbahane rutin dana kesimleri sırasında tüberkülin gibi makroskopik lezyon bulunmayan, 2 yaş altı 30 adet sığır kontrol grubu olarak örneklenmiştir. Kulak numaraları ve kayıtlarına göre deney grubu hayvanlarının hepsi Balıkesir bölgesinden gelmiştir. Kesimler Bursa Et-Ba, İsa Bey Et Kombinasında ve Balıkesir, Ölmezler Mezbanesinde gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu kapsamında incelenen hayvanlar ise Bursa Et-Ba Kurumunda rutin olarak kesilen 2 yaş altı danalardır.

### 2. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE İNCELEMELER İÇİN HAZIRLANMASI

#### 2.1. Kan örnekleri

Kesimi takiben boyundan akmakta olan kan, 10 ml EDTA'lı kan tüplerine (Hematube®) alınmıştır. Soğuk zincir altında laboratuvara getirilen kan örnekleri 5000 rpm'de (3310 CFxg) 5dk boyunca santrifüje edilmiş ve lökositler ayrıştırılmıştır. Şekillenen lökosit katmanı, 100 µl mikropipet yardımıyla aspire edilip yaklaşık 0.5 µl'si lizinli lamlara damlatılarak 3 adet frotiler hazırlanmış ve kalan 0,5-1 ml hacmindeki ürün, 1,5ml hacimli mikrotüplere aktarılmıştır. Lizinli lam üzerinde hazırlanan lökosit katmanı frotileri kurutulup, lam saklama kutularında +4°C'de, mikro tüpler ise PZR incelemeleri için -20°C'de saklamaya alınmıştır.

## 2.2. Doku Örnekleri

Kafanın kesilmesi ve iç organların çıkarılmasından sonra gözle ve palpasyonla genel bir inceleme yapılmıştır. Takiben, deney grubu hayvanlarında lezyonların görüldüğü akciğer, mediastinal lenf yumrusu, retrofaringeal lenf yumrusu ve karaciğer; kontrol grubu hayvanlarında ise sadece akciğer ve mediastinal lenf yumruları örneklenmiştir. Organ örnekleri her birey için ayrı eldiven ve bistüri kullanılarak kilitli poşetlere alınmış ve soğuk zincir altında laboratuvara ulaştırılmıştır. Her hayvanın, sağlıklı ve lezyonlu kısımları içerecek şekilde örneklenen dokularının bir kısmı histopatolojik inceleme için %10'luk tamponlanmış formaldehit (Merck Millipore, Merck 103999, %37 pH: 6.9, Almanya) çözeltilisine alınmış ve bir kısmı da PZR incelemelerinde kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır. Formaldehit çözeltilisinde 48 saat bekletilip trimlenmiş ve kasetlere alınmış dokular, manuel olarak gerçekleştirilen doku takibinde alkol (Emprove® exp Ethanol, Merck KGaA, Almanya) ve ksilol (Xylene, J.T.Baker, Hollanda) serisinden geçirilmiş, parafinle bloklanmış ve mikrotomda kesit alınana kadar +4°C'de saklanmıştır. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2155, Germany) ile 5µm kalınlığında hazırlanan kesitlerden rutin ve histokimyasal boyama yapılacak olanlar (HE ve ZN) normal, rodajlı lamlara; immunohistokimyasal boyama yapılacaklar ise adezivli lamlara alınarak oda sıcaklığında kurutulduktan sonra +4°C'de kapalı kutular içerisinde saklamaya alınmıştır. Hazırlanan preparatlar çift başlıklı ışık mikroskopunda (Olympus, CX41, U-D03 çift başlık ataçmanlı, ABD) incelenmiş ve fotoğraf çekilmiştir.

## 3. HEMATOKSİLİN-EOZİN VE ZIEHL-NEELSEN BOYAMA

Her iki boyama için de lamlar 60°C, kuru etüv (Elektro-mag, Türkiye) (1 saat) ve ksilol içerisinde (üçer dakika iki değişim) bekletilerek deparafinize edilip, dereceli alkollerde (% 100, 90, 80, 70, birer dakika) rehidre edilerek distile su basamağına getirildi. H&E boyama için lamlar hematoksilende (Hematoxylin Harris, Leica Microsystems, Almanya) 12 dk bekletildi. Akan suda durulanan lamlar asit alkole ve takiben amonyaklı suya birer kez daldırıldı. Eozin (Eosin Alcoholic Solution, Leica Microsystems, Almanya) içerisinde 3 dk bekletildi. Dereceli alkollerden (%70, 80, 90, 100) birer dakikalık süre geçirilerek dehidre edilen dokular kuruduktan sonra ksilol içerisinde berraklaştırılıp lamel ile

kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi (90).

Ziehl-Neelsen boyamasında lamalar 60°C'de 30 dk karbol fuksinde (Carbol fuchsin, Merck c, Almanya) bekletildi. Durulanıp asit alkolden geçirilerek renksizleştirilen dokular zemin boyaması için açık mavi renk alıncaya kadar (yaklaşık 20 sn) metilen mavisinde bekletildi. Dereceli alkollerde dehidrasyon ve ksilolde berraklaştırmayı takiben lamel ile kapatılan dokular ışık mikroskopunda incelendi (90).

Mikroskopik incelemede, doku kesitlerinde yangı hücresi infiltrasyonu, dev hücresi kazeifikasyon, kalsifikasyon varlığı ve bağ doku oluşumuna dikkat edildi; ZN boyamada ise mavi zemin üzerinde kırmızı-pembe renkli basil görülen, asidorezistans bakteri olup olmadığı incelendi.

## **4. İMMUN BOYAMALAR**

### **4.1. İmmunohistokimya**

Makroskopik ve histopatolojik olarak tüberkül oluşumu gözlenen ve kültür sonuçlarına göre *Mycobacterium tuberculosis* kompleksine ait olduğu tespit edilen olgular immunohistokimyasal boyamalarda pozitif kontrol olarak belirlenmiştir. Bu olguların doku kesitlerindeki pozitif reaksiyon elde etmek hedefiyle yöntemin basamaklarında denemeler yapılarak, farklı primer antikorlar (anti Vimentin, anti Sitokeratin) kullanılarak İHK yöntemi optimize edilmiştir. Elde edilen yöntem doğrultusunda, deney grubu ve kontrol grubunda yer alan hayvanların adezivli lama alınan doku kesitlerine aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

- Deparafinizasyon: Kuru etüvde 60°C'de 1saat ve takiben ksilol içerisinde (üçer dakika iki defa değişim) bekletildi.
- Rehidrasyon: Dereceli alkollerden (%100, 90, 80, 70, birer dakika) geçirilerek distile suya ve fosfat tampon çözeltisine (PBS) alındı.
- Peroksidaz inhibisyonu: Lamaların üzerine dokuyu kaplayacak şekilde ticari kit (EXPOSE Rabbit-specific HRP/DAB detection IHC kit, Katalog no: Ab60437, Abcam®, UK) içerisinde bulunan hidrojen peroksidaz inhibitörü damlatılarak 10 dk beklendi.
- Durulama: PBS içerisinde alınan lamalar, 5 dk durulandı.
- Antijenlerin açığa çıkarılması: 37°C'de 15 dk % 0,5'lik tripsin çözeltisinde bekletildi.

Takiben Tween-20 eklenmiş sitrat tampon çözeltisinde (50 µl/100ml) (pH:6) 100°C’de 15dk otoklavda ısı işlem uygulandı.

- Durulama: Üç dakika, PBS çözeltisinde yapıldı.

- Protein blokajı: Ticari kit içerisindeki protein blok solüsyonu lamlara uygulanıp oda sıcaklığında 10 dk beklendi.

- Primer antikor: Durulama yapılmadan, *Mycobacterium bovis*’e spesifik, poliklonal primer antikor (1/200 dilusyonunda, Anti-mycobacterium bovis antibody, Katalog no: ORB10044, Biorbyte, UK) damlatılıp 1saat oda sıcaklığında beklendi.

- Durulama: Üç dakika, PBS içerisinde yapıldı.

- Sekonder antikor: Ticari kit içerisinde tavşana karşı keçiden elde edilmiş peroksidaz ile işaretli polimer tabanlı sekonder antikor uygulandı.

-Durulama: Beş dakika, PBS çözeltisinde yapıldı.

- Kromojen uygulanması: Ticari kit yönlendirmelerine göre 1,5ml DAB Substrat sıvısına 1 damla DAB kromojen eklenerek hazırlanan çözelti lamlar üzerine dokuları kaplayacak şekilde damlatılıp 10 dk karanlık ve nemli koşulu sağlayacak kara kutuda bekletildi. Oluşan reaksiyon ışık mikroskopunda kontrol edilerek, akarsuda yıkanarak sonlandırıldı.

- Zemin boyama: Harris Hematoksilen ile 20-30 sn bekletilerek yapıldı. Durulamayı takiben amonyaklı su içerisinde dokular mavileşene kadar tutuldu.

-Dehidrasyon ve berraklaştırma: Dereceli alkollerden (%70, 80, 90, 100, birer dakika) geçirilen lamlar kurumaya bırakılıp ardından ksilol içerisinde en az 3 dk bekletildi ve Entellan® (Merck, Almanya) ile kapatılarak (Olympus, CX41, U-D03 çift başlık ataçmanlı, ABD) ışık mikroskopunda incelendi ve fotoğraf çekildi (91).

## 4.2. İmmunositokimya

Deney ve kontrol hayvanlarının kanlarından hazırlanan lökosit katmanı frotilerinin boyanma sonuçlarının değerlendirilmesinde, ön denemeler sonucunda *Mycobacterium tuberculosis* kompleks yönünden pozitifliği mikrobiyolojik incelemeler ile doğrulanmış tüberküllü organlardan hazırlanmış tuşe preparatlar pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

-Tesbit: Lamlar %10’luk tamponlu formaldehit içerisinde 20 dk bekletildi.

- Durulama: Distile suyla ve PBS ile 2x 5 dk olacak şekilde uygulandı.

- Peroksidaz inhibisyonu: Ticari kit içerisindeki peroksidaz blok solüsyonunda 20 dk

bekletildi.

- Antijenlerin açığa çıkarılması: Tween 20 eklenmiş Sitrat tampon çözeltisi (50 µl/100ml) (pH:6) kullanılarak mikrodalga fırında 360 Watt'da 5dk kaynatıldı.

Daha sonraki durulama, protein blokajı, primer antikor uygulaması, sekonder antikor uygulaması, kromojen uygulanması ve zemin boyama aşamaları immunohistokimya sırasında yapılan prosedür uygulandı.

## **5. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU**

### **5.1. DNA ekstraksiyonu**

Kan ve dokulardan DNA çıkarılmasında 'spin-column' tabanlı çalışan ticari kit (QIAamp DNA Minikit, 250, Katalog no:51306,Qiagen, Almanya) tarafından önerilen yöntem takip edilmiştir.

#### **5.1.1. Kandan DNA ekstraksiyonu:**

Her numune için ayrı hazırlanan 1,5ml'lik mikrotüp tüpe 20 µl proteinaz K ve 30µl lökosit katmanı konup üzerine 220µl'ye tamamlanacak kadar PBS eklendi. Karışım pipetaj ve Vorteks cihazı (Vortex-1 plus, Biosan, Letonya) ile homojenize edilip üzerine 200µl AL Buffer solüsyonu ilave edilip homojenize edildikten sonra 56°C'de 10dk inkübasyona (Digital Dry Heat Blocks, 48'li, Benchmark Scientific, ABD) bırakıldı. Daha sonra karışıma 200µl etanol (+4°C) eklenip homojenize edildi. Oluşan karışım kit içerisinde bulunan 'spin-column' tüpler içerisine aktarılıp 8000 rpm'de 1dk santrifüje edildi. İki parçadan oluşan tüpün içinde yer alan küçük tüp (kolon) çıkarılıp tüpün alt haznesi, içerisine geçen sıvı kısımla beraber uzaklaştırıldı. Kolon, kit içerisindeki 'collection tube' içerisine yerleştirilip üzerine 500µl AW1 (yıkama solüsyonu) eklenip 14000 rpm'de 3dk santrifüje edilerek birinci yıkama işlemi gerçekleştirildi. Önceden yapıldığı gibi alt hazne, içindeki sıvıyla beraber atılıp kolon yeni bir yıkama tüpü içerisine yerleştirilip üzerine 500µl AW2 solüsyonu eklendi. 14000rpm'de 1dk santrifüje edilerek yapılan 2.yıkama aşamasını takiben kolon 1,5ml'lik mikrotüp içerisine yerleştirilip üzerine 100µl 'Elution Buffer' çözeltisi eklenerek 8000 rpm'de 1dk santrifüje edilerek DNA Eppendorf tüpün içerisine aktarıldı. Elde edilen üründeki DNA konsantrasyonu

5µl örneklerek spektrofotometrede (190-840nm, NanoDrop 2000, Thermo Scientific, ABD) ölçüldü. PZR analizi aşamasına kadar DNA örnekleri +4°C’de saklandı.

### **5.1.2 Dokudan DNA ekstraksiyonu**

Akciğer ve lenf yumrusundan toplamda yaklaşık 25 mg doku alınıp bistüri ile kesmek ve ezme suretiyle dokular mekanik homojenasyona tabi tutuldu. Çalışma kapsamında incelenen hayvanların hepsinden mediastinal lenf yumrusu ve akciğer örnekleri cem edilerek, deney grubunda ise bu organlara ilave olarak, varsa lezyonlu karaciğer de eklenerek dokular homojenize edildi. Mikrotüp tüplere işlem görmüş 25 mg doku konduktan sonra, üzerine izolasyon kitindeki ATL buffer çözeltisinden 180µl, 20µl proteinaz K konarak 56°C’de karışım berrak sıvı haline gelene kadar (1-3saat) inkübasyonda bırakıldı. Daha sonra kan örneklerindeki işlemlerin benzeri uygulanarak DNA’lar elde edildi. PZR analizi aşamasına kadar DNA örnekleri +4°C’de saklandı.

## **6. GERÇEK ZAMANLI (REAL TIME) PZR**

Gerçek zamanlı PZR analizi için Taqman® prob tabanlı çalışan, IS6110 gen sekansını hedef alan ticari kit (TaqVet™ *Mycobacterium tuberculosis* Complex, Laboratoire Service International, Fransa) kullanıldı. Her örnek için iki ayrı kuyucukta (Mix IPC ve Mix Tube) çalışmayı gerektiren kit içerisinde mevcut olan Mastermix, Sequence Tube (1a ve 1b) ve haricen steril deiyonize su ile üretici firmanın belirttiği yöntem çerçevesinde PZR karışımları aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Mix IPC: 625µl Mastermix, 100µl sequence tube (1b), steril ve deiyonize su ile 1000µl’ye tamamlandı.

Mix tube: 625µl Mastermix, 100µl sequence tube (1a), steril ve deiyonize su ile 1000µl’ye tamamlandı.

PZR karışımları prob kalitesinin korunması amacıyla mümkün olduğunca az ışıklı ortamda hazırlanarak, PZR karışımlarının her ikisinden de kuyucuklara 20’şer µl konulmuş, üzerine her bir örnekten IPC ve Mixtube kuyucuğuna yukarıda açıklandığı şekilde öncesinde

izole edilmiş test edilecek DNA örneğinden 5 er µl eklenmiştir. Gerçek zamanlı PZR cihazında (7500 Fast Real-Time PZR System, Applied Biosystems, ABD) 96 kuyucukta çalışılmış, her PZR uygulamasında 1 negatif, 1 pozitif kontrol kuyucuğu dahil edilmiştir. Mixtub için ‘reporter’ olarak FAM, IPC Tub için VIC ve her iki tüp için de ‘quencher’ tetramethylrhodamine (TAMRA) kullanılmıştır. PZR programı, ticari kitin tariflerine göre;

1.aşama: 50°C’de 2 dk

2.aşama: 95°C’de 10 dk

3.aşama: 95°C’de 15 dk ve ardından 60°C 1 dk, 45 tekrar şeklinde oluşturulmuştur.

Oluşan reaksiyon ve sonuçların irdelenmesi, kit tariflerine göre yapılmıştır.

## **7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Çalışmada tanı testleri arasındaki uyumu incelemek için kappa istatistiğinden yararlanılmıştır. Çalışmada duyarlılık, özgüllük, negatif ve pozitif kestirim değerlerine de yer verilmiş, analizler SPSS 20 programında yapılmıştır.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

Deney grubu kapsamında incelenen 30 adet kan ve doku örneği dişi ve 2 yaş üzeri (2-7 yaş arası) hayvanlardan toplandı. Bununla birlikte kontrol grubuna ait kan ve doku örnekleri ise 2 yaş altı erkek hayvanlardan elde edildi. Kesim öncesinde Tüberkülin testi sonuçları ve getirildiği bölge haricinde hayvanlar hakkında bilgi edinmek mümkün olmamakla beraber kesimin hemen öncesinde yapılan klinik gözlemlerde düşük vücut kondüsyonu, gözlerde çökük görünüm ve letarji saptandı.

**Tablo-1:** Deney grubu bulguları, kan ve dokularda rutin, İHK ve İSK boyamaları ve PZR sonuçları

No	Makroskobik Lezyon	HE	ZN	İHK	İSK	PZR (Doku)	PZR (Kan)
1	Akciğer ve MLY	+	+	+	+	+	+
2	Karaciğer ve MLY	+	+	+	-	-	-
3	Akciğer ve MLY	+	+	+	-	-	-
4	Lezyonsuz	-	-	-	-	+	-
5	Akciğer, RFLY ve MLY	+	+	+	-	+	-
6	RFLY ve MLY	+	+	+	-	-	-
7	Akciğer	+	+	+	-	-	-
8	Akciğer ve MLY	+	+	+	-	+	-
9	RFLY, MLY ve karaciğer	+	+	+	-	-	+
10	Akciğer	+	+	+	-	+	+
11	Mediastinal lenfadenopati	+	+	+	-	+	-
12	Akciğer, RFLY ve MLY	+	+	+	-	+	-
13	Akciğer	+	+	+	-	-	-
14	Akciğer ve MLY	+	-	-	-	-	+
15	Akciğer	+	+	+	-	+	+
16	Akciğer ve MLY	+	+	+	-	+	-
17	RFLY lenfadenopati	-	-	-	-	+	-
18	Akciğer ve MLY	+	-	+	-	-	+
19	Akciğer, MLY ve karaciğer	+	+	+	-	+	+
20	Akciğer ve MLY	+	+	+	-	-	+
21	Akciğer ve MLY	+	-	+	-	-	+
22	Lezyonsuz	-	-	-	-	-	-
23	MLY	+	+	+	-	+	+
24	Akciğer, MLY ve karaciğer	+	+	+	+	-	+
25	Akciğer, Plöra ve karaciğer	+	+	+	-	+	+
26	Akciğer ve MLY	+	-	+	-	+	-
27	Akciğer ve MLY	+	-	+	-	+	-
28	Akciğer ve MLY	+	-	+	-	+	+
29	Akciğer ve MLY	+	-	+	-	+	-
30	Akciğer, MLY ve karaciğer	+	+	+	+	+	+

MLY: Mediastinal Lenf Yumrusu, RFLY: Retrofaringeal Lenf Yumrusu, HE: Hematoksilen&Eozin, ZN: Ziehl-Neelsen, İHK: İmmunohistokimya, İSK: İmmunositokimya, PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu



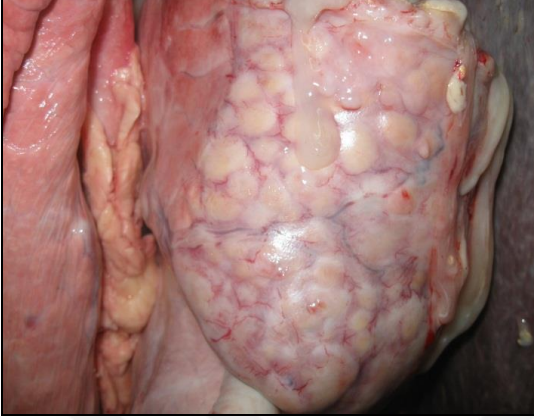
**Tablo-2:** Kontrol grubu bulguları, kan ve dokularda (akciğer ve mediastinal lenf yumrusu) rutin, İHK ve İSK boyamaları ve PZR sonuçları

No	Makroskopik Lezyon	HE	ZN	İHK	İSK	PZR (Doku)	PZR (Kan)
1	-	-	-	-	+	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	+	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	+	-	+
8	-	-	-	-	+	-	+
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	+	-	-
13	-	-	-	-	+	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	+	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	+	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	+	+	-
27	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	+	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-

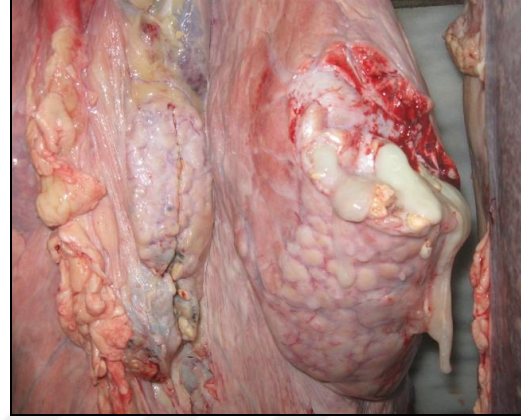
Doku olarak kan, akciğer ve mediastinal lenf yumrusu örneklenmiştir.  
HE: Hematoksilen&Eozin, ZN: Ziehl-Neelsen, İHK: İmmunohistokimya, İSK: İmmunositokimya, PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

## 1. MAKROSKOBİK BULGULAR

Deney grubundaki hayvanların 26'sının (%86) akciğer veya lenf yumrularında, kazeifiye-kalsifiye tipik tüberkül yapısı gözlenmiştir. Tipik lezyon gözlenmeyen 4 sığırdan (4, 11, 17 ve 22 numaralı olgular) ikisinde spesifik olmayan lenfadenopati (11 ve 17 numaralı olgular) ve diğer ikisinde (4 ve 22 numaralı olgular) ise hafif şiddette pulmoner hiperemi dışında makroskopik lezyon saptanmamıştır. 30 olgudan 12'sinde (%40) akciğer ve mediastinal lenf yumrusu, 6'sında (%20) solunum sistemiyle beraber karaciğer, 3'ünde (%10) sadece akciğer, 4'ünde (%13) sadece lenf yumrusu tutulumu gözlenmiştir. Akciğer lezyonlarının çoğunlukla organ içerisinde lob farkı belirgin olmaksızın sıklıkla dorsal yerleşim gösterdiği dikkati çekti (Şekil-3b ve 3c). İncelenen organlarda fibrozis, kazeifikasyon ve kalsifikasyondan oluşan tipik lezyonlar (tüberküller), 1mm-10cm çapında değişen yer yer soliter veya birleşik (konglomere) odaklar şeklinde görülmüştür. Tüberküller, şekillendikleri organ bakımından makroskopik olarak belirgin bir fark göstermemiştir. Bazı olgularda makroskopik olarak tipik kuru-kazeifiye nekrozdan farklı olarak daha yumuşak, akışkan ve yeşilimsi içerikli tüberkül yapısı gözlenmiştir (Şekil-2a, 2b, 2c). Lenf yumrusu tutulumlarının çoğunlukla mediastinal lenf yumrusunda (21 olgu, %70) gerçekleştiği görülmüştür. İki olguda (6 ve 9. olgu) sadece retrofaringeal lenf yumrusu, 4 olguda (5, 6, 9, 12. olgu) mediastinal lenf yumrusuyla beraber retrofaringeal lenf yumrusu tutulumu gözlenmiştir (Şekil-4a ve 4b). Yirmi beşinci olguda plörada çok sayıda konglomere tüberküller (miliyer tüberküloz) gözlenmiştir (Şekil-5). Solunum sistemine ek olarak karaciğerinde de lezyon gösterdiği 6 olguya rastlanmıştır. Diyaframatik yüzde lezyonların belirgin olduğu karaciğerde, visceral yüzdeki lenf yumrularında da tutulum dikkati çekmiştir (Şekil-3a).



**Şekil-2a:** Akciğer ve mediastinal lenf yumrularında generalize tüberküller (21. olgu)



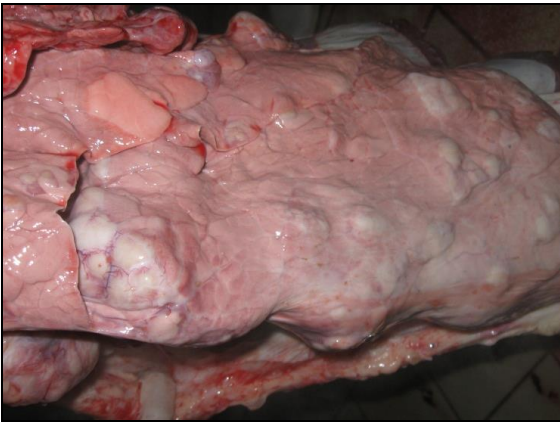
**Şekil-2b:** Aynı olguda akciğer lezyonlarının kesit yüzünde tüberküllerde purulent içerik görülmekte



**Şekil-2c:** Aynı olguda mediastinal lenf yumrularında kalsifiye tüberküller



**Şekil-3a:** Karaciğerin diyaframatik yüzünün büyük kısmını kaplayan tüberküller (2. olgu)



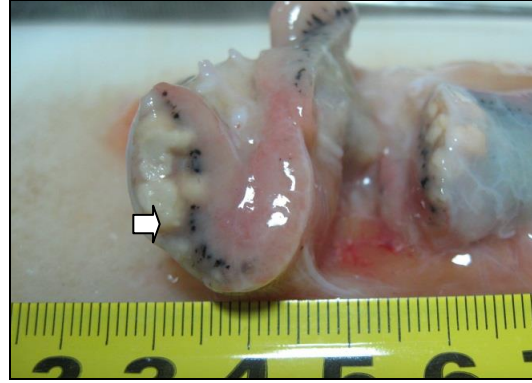
**Şekil-3b:** Akciğerlerin dorsalinde yoğunlaşmış yaygın tüberküller (1. olgu)



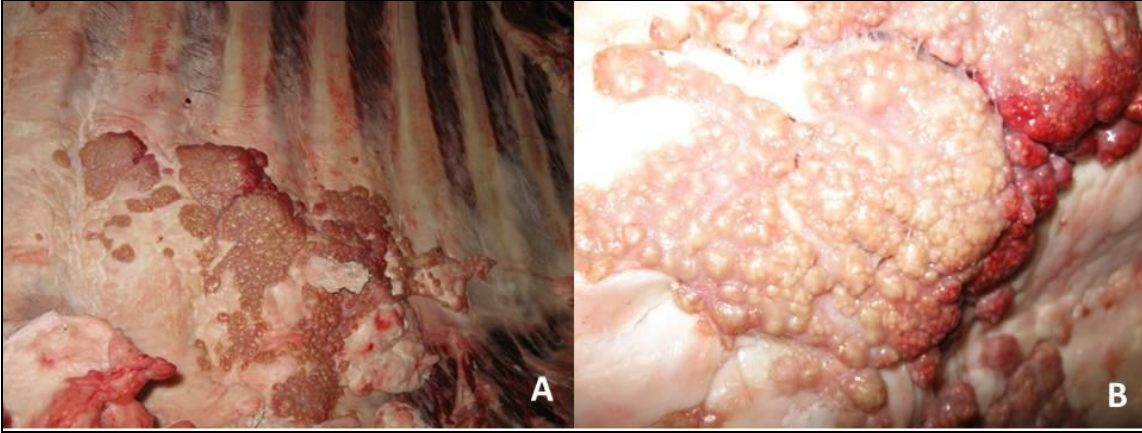
**Şekil-3c:** Sağ median lobta pulmoner tüberküllerin kesit yüzü (1. olgu)



**Şekil-4a:** Mediastinal lenf yumrusunda kapsula altından fark edilebilen tüberküller (ok) (29. olgu)



**Şekil-4b:** Aynı lenf yumrusunun kesit yüzünde kortikal bölgede sınırlı kalan kazeifikasyon (ok) ve antrakozis gözlenmektedir.



**Şekil-5:** Generalize tüberkülozlu bir olguda plörada şekillenen miliyer tüberküller (A) ve yakından görünümüleri (B) (25. olgu)

## 2. MİKROSKOBİK BULGULAR

Her olgu için 1adet HE, 1adet ZN, 1adet İHK yöntemi ile boyanmış doku kesiti ile kan lökosit katmanında İSK uygulanmış 1 adet froti olmak üzere 4 adet preparat incelenmiştir.

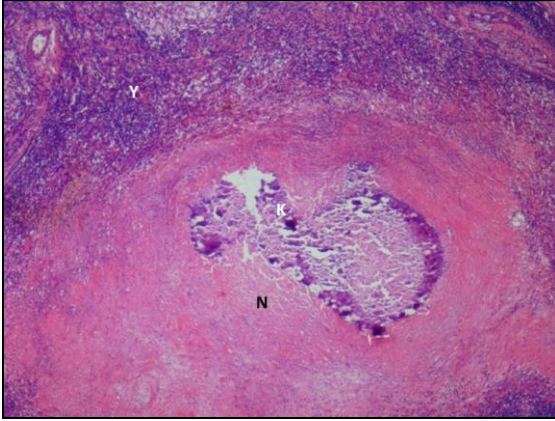
### 2.1. Hematoksilen-Eozin ve Ziehl-Neelsen

Rutin HE boyamalarda, merkezindeki nekrotik alanı mononükleer yangı hücreleri, yer yer dev hücrelerinin çevrelediği ve bağ dokunun kuşattığı tipik granulom yapısı gözlenmiştir (Şekil-6). Makroskobide kesit yapılarak incelenme sonucunda tüberkülün gözlenmediği, lenfadenopati gözlenen 2 olgudan (11 ve 16. olgu) bir tanesinde (11 numaralı olgu) histopatolojik muayenede tipik granulom yapısı görülmüştür. Bu olgu haricinde karakteristik tüberküllerin gözlenmediği diğer 2 olguda (4 ve 22. olgu) tüberkülozla uyumlu mikroskobik lezyon gözlenmezken 17. olguda retrofaringeal lenf yumrusunda spesifik olmayan lenfositer infiltrasyon dikkati çekmiştir (Tablo-1 ve Şekil-13). Yirmi dört numaralı olguda karaciğerde makroskobik olarak gözlenen lezyonun histopatolojik incelemesinde eozinofil lökosit ağırlıklı infiltrasyonların paraziter kökenli olduğu düşünülmüştür (Şekil-12). Tüberküloz hastalığında şekillenen tipik granulom yapısının farklı organlarda benzer şekillenmekle beraber lenf yumrusunda oluşan granulomların bağ doku yönünden daha zengin, dev hücrelerinin sayı bakımından fazla ve boyut bakımından daha büyük olduğu dikkati çekti (Şekil-8, 9 ve 10). Karaciğerde şekillenen tüberküllerde ise kazeifikasyon ve kalsifikasyonun daha hafif şekillendiği, bağ doku ve mononükleer lökosit infiltrasyonlarının baskın olduğu yapılar gözlendi (Şekil-11). Akciğerde şekillenen lezyonların ise lenf yumrusundakilerle karşılaştırıldığında bağ dokuyla daha az sınırlandığı ve genel olarak polimorf nükleer lökositlerin diğer organlardakine oranla daha sıklıkla gözlendiği dikkati çekti. Yer yer bronş

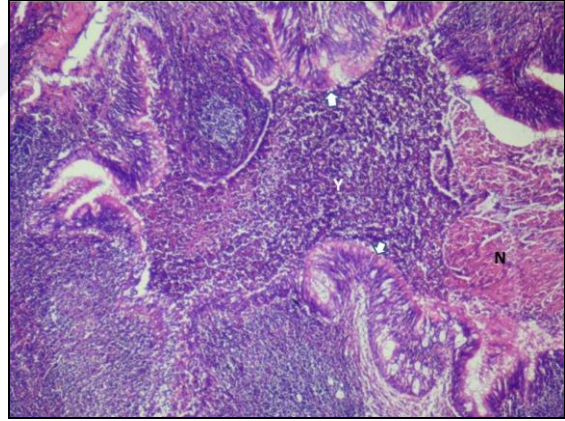
ve bronşiyol epitel katmanının hasarlandığı, lumenlerin supuratif eksudat ile dolu olduğu multifokal granulatöz bronkopnömoni alanları gözlemlendi (Şekil-7).

Kontrol grubu hayvanlarında ise herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmadı (Tablo-2).

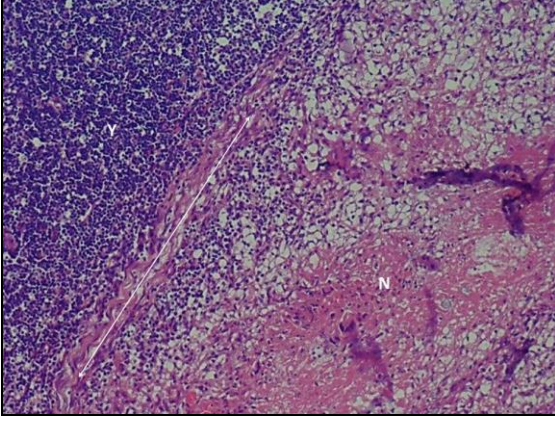
Deney grubunda ZN uygulanmış preparatların incelenmesi sonucunda, histopatolojik incelemede tipik tüberkül yapısı gözlenen 27 olgunun 20'sinde asidorezistans bakterisi gözlenmiştir (Şekil-14 ve 15). Histopatolojide tipik granülom yapısı göstermeyip, ZN boyamada asidorezistans bakterisi boyanmasının gözlemlendiği hiçbir olguya rastlanmadı. Akciğer ve mediastinal lenf yumrularında bakterisi yoğunluğunun daha fazla olduğu, karaciğerin daha az asidorezistans bakterisi barındırdığı, bazı olgularda ise torakal organlarda bakterisi gözlenirken karaciğerde bulunmadığı saptandı. Kontrol grubunda herhangi bir pozitif boyanmaya rastlanmamıştır (Tablo-2).



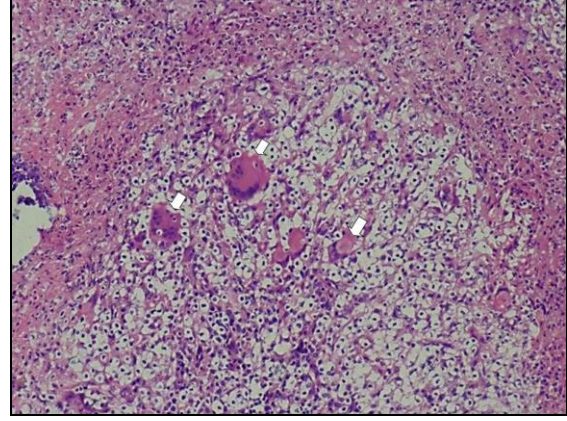
**Şekil-6:** Lenf yumrusu, mononükleer lökositler infiltrasyonu ve bağ dokusu (Y) ile çevrili kalsifiye (K) nekroz (N) alanından oluşan granülom yapısı (HEx4)  
(16.Olgu: HE,ZN,IHK,PZR(doku):+ ;PZR(kan):- )



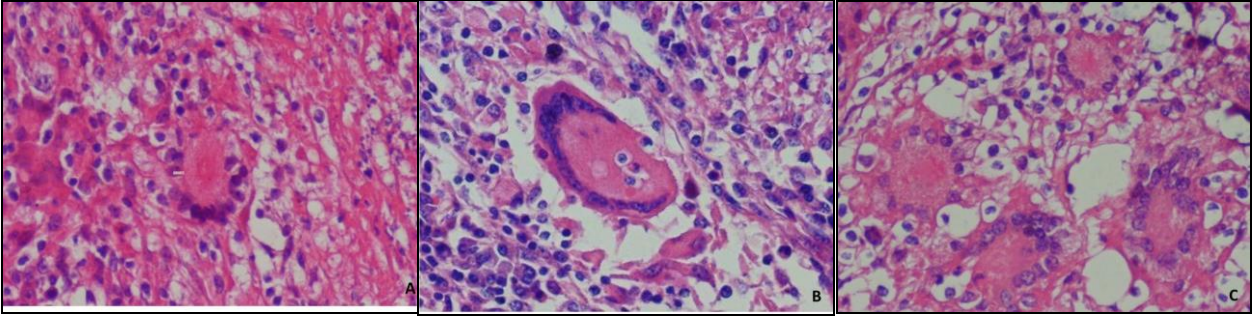
**Şekil-7:** Akciğer, bronş epitelisi(ok) intrabronşiyal inflamatuvar infiltrasyon(Y) ve nekroz(N) (HEx10)  
(15.Olgu: HE,ZN,IHK,PZR(doku):+; ISK:- )



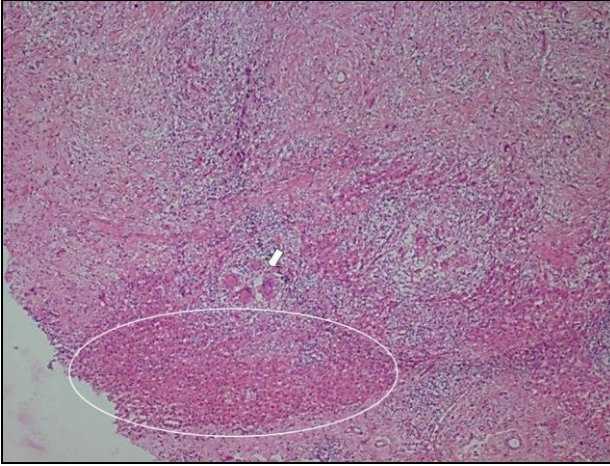
**Şekil-8:** Lenf yumrusu, nekroz alanı (N), bağ doku(ok) ve granülomatöz yangısal infiltrasyon (Y) (HEx20)  
(3.Olgu: HE,ZN,IHK:+ ;ISK,PZR(kan):-)



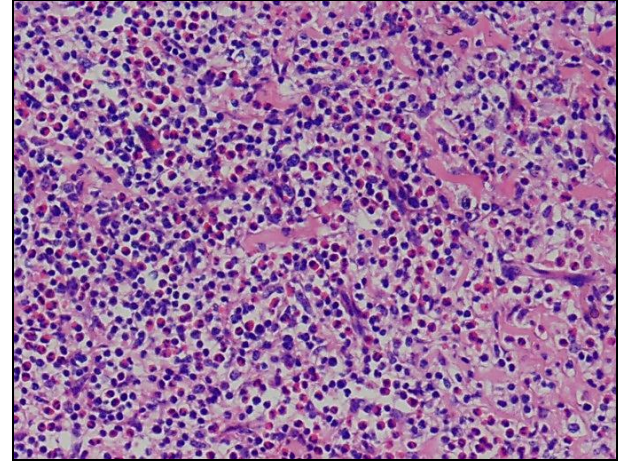
**Şekil-9:** Lenf yumrusu, Langhans tipi dev hücreleri (oklar) (HEx20)(10.Olgu: Sadece ISK negatif)



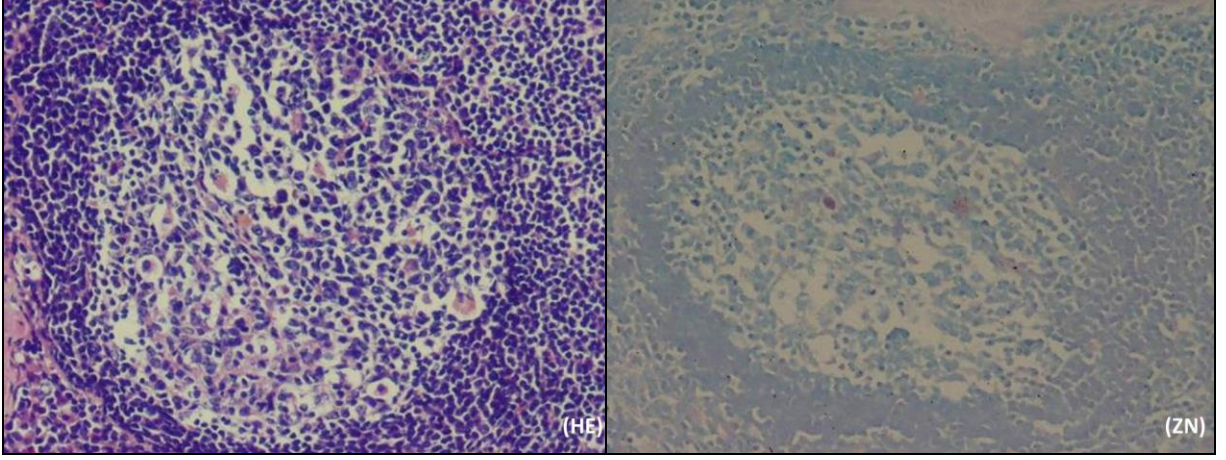
**Şekil-10:** Farklı olgularda lenf yumrularında gözlenen Langhans tipi dev hücreleri (HEx40)  
(Sırasıyla A, B, C: 10, 25, 27.Olgu)



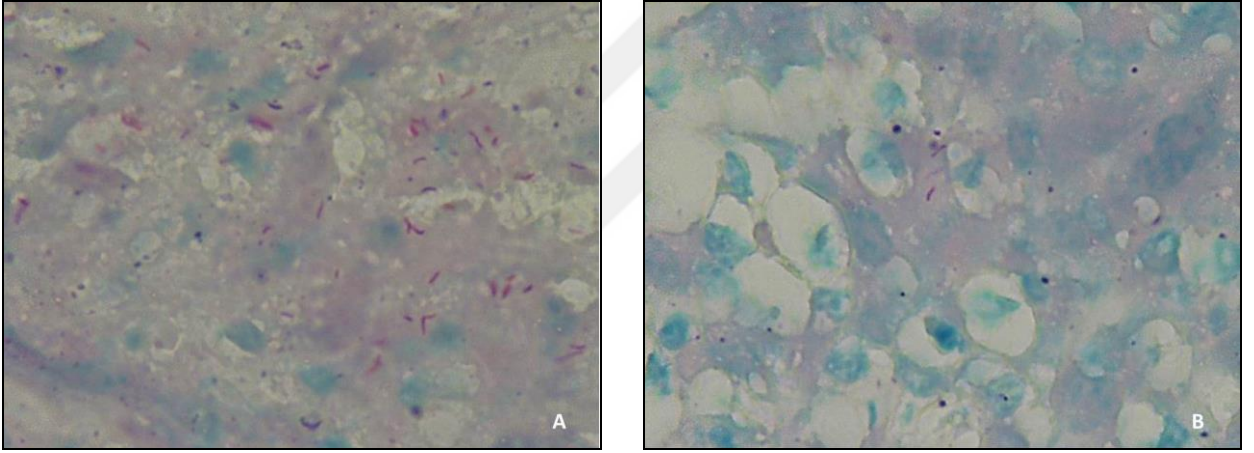
**Şekil-11:** Karaciğerde granülom içerisinde parenşim dokusu (daire) ve dev hücreleri(ok)(HEx4)  
(25.Olgu: Sadece İSK negatif)



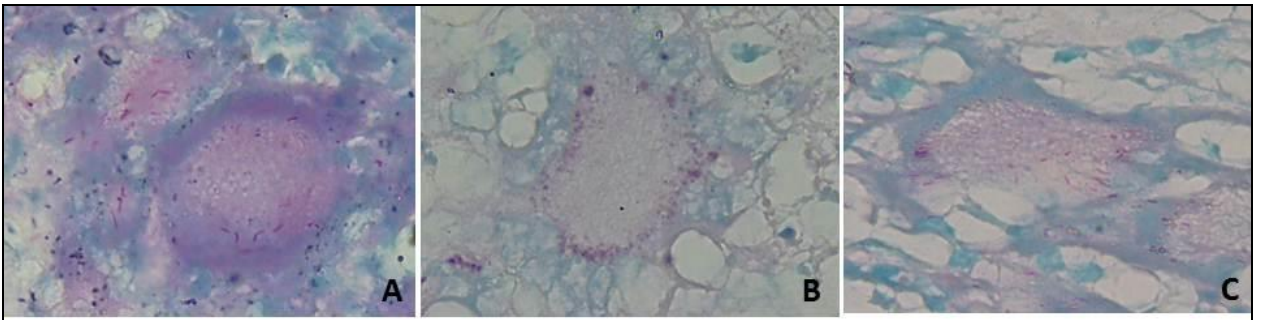
**Şekil-12:** Karaciğerde eozinofil lökosit infiltrasyonu (HEx20)  
(24.Olgu: Sadece ISK negatif)



**Şekil-13:** Faringeal lenf yumrusunda spesifik olmayan mononükleer lökositler infiltrasyon odağı (HE) ve aynı odağın asidorezistans bakteriye rastlanmayan ZN boyaması (x20).  
(17.Olgu: Sadece PZR(doku): +)



**Şekil-14:** Mediastinal lenf yumrusunda nekrotik alanda (A) ve granümatöz yangı bölgesinde (B) asidorezistans bakteriler (ZNx1000).  
(11.Olgu: HE,ZN,IHK,PZR(doku):+ ;İSK ve PZR(kan): -)



**Şekil-15:** Dev hücrelerinin sitoplazmasında asidorezistans bakteri ve componentleri (ZNx100)  
(A: Lenf yumrusu, 20. Olgu, B: Akciğer, 25. olgu, C: Lenf yumrusu, 26.Olgu)



## 2.2. İmmunohistokimya

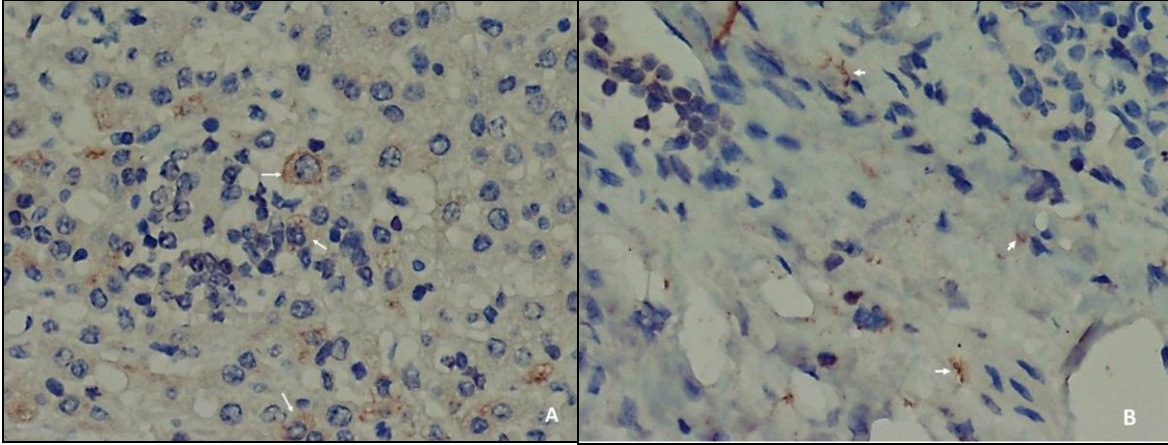
Mikobakteriyel yönden pozitif boyanmaya karar verilirken, nekrotik alan bulunan kesitlerde nekroz sahasında her zaman nonspesifik olarak şekillenen DAB boyaması göz önünde bulundurularak nekrotik alanların etrafındaki infiltrasyon kuşağındaki makrofaj, dev hücreleri, lenfosit ve diğer hücreler esas alınmıştır. Etken boyanmasının esas alındığı pozitif reaksiyonun granulumun dışına doğru gidildikçe azaldığı saptandı. Pozitif reaksiyon veren basillere, nekroz alanlarını çevreleyen bağ dokuda serbest şekilde, makrofajların, dev hücrelerinin nadiren lenfositlerin ve fibrositlerin sitoplazmalarında rastlandı (Şekil-16-18). Sıklıkla lenf yumrularında ve yer yer akciğerde rastlanan hemosiderozis ve antrakozis immün boyamalarda kromojen olarak kullanılan DAB ile benzer bir renk göstermekteydi. Hatalı yorumlamayı önlemek açısından HE boyamalar göz önünde bulundurulup bu pigmentlerin yerleşimi dikkate alınmıştır. İHK sonucunda 26 olguda pozitif boyanma gözlenmiştir. Hematoksilen eozin ile boyanarak hazırlanmış dokuların histopatolojik incelenmesinde tüberkülozla uyumlu lezyon gözlenen ancak İHK’da pozitif reaksiyon gözlenmeyen 1 olguya (Olgu No.14) rastlanmıştır. Dokularda, PZR incelemesinde tüberküloz yönünden negatif sonuç verip İHK’da pozitif bulunan 9 olgu, PZR incelemesinde pozitif olup İHK’da negatif bulunan 3 olgu saptanmıştır. İHK sonucunda pozitif bulunan olguların üçünde (3/25), İSK’da da pozitif reaksiyon gözlendi.

Kontrol grubunda ise herhangi bir pozitif reaksiyon gözlenmemiştir (Tablo-2, Şekil 19).

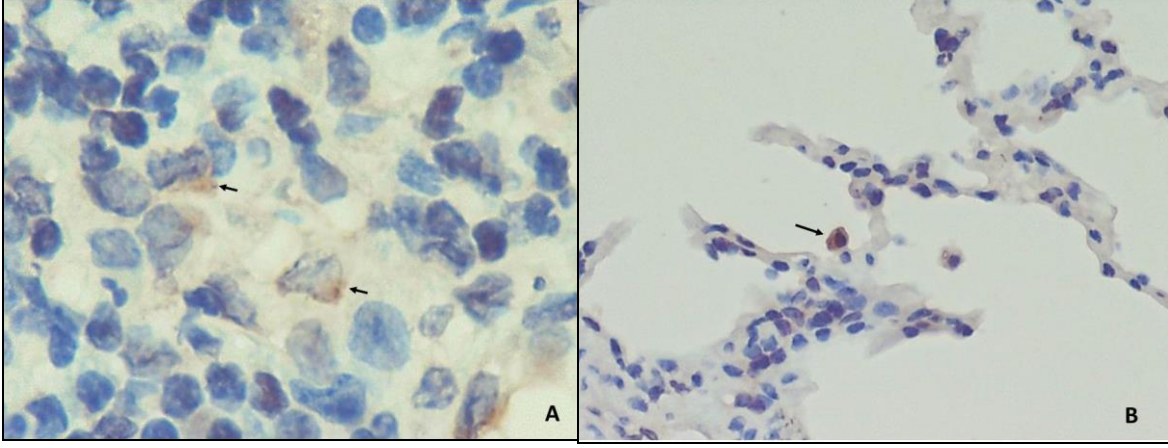
### 2.3. İmmunositokimya

Pozitif reaksiyona lenfosit (Şekil-20) ve monositlerin (Şekil-21) sitoplazmasında, nekroz sahasının periferinde rastlandı. Yer yer nötrofillerin de sitoplazmasında DAB ile boyanmış düzgün şekilli granüller yapılar rastlanmış, bu spesifik olmayan pozitif reaksiyonun sitoplazmik granüllerin yoğun enzimatik içeriğinden kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır (Şekil-22). Deney grubunda tipik tüberkül yapısı gözlenen 27 olgunun 3 tanesinde (Olgu no.1, 24 ve 30) lökosit katmanı frotilerinde pozitif reaksiyon gözlendi. Bu olguların üçünde de HE, ZN, İHK ve PZR incelemelerinde tüberküloz yönünden pozitif sonuç alındı. Beş olgunun (Olgu no. 3, 10, 11, 14, 27) kan frotilerinde rumen protozoonlarına rastlanmıştır (Şekil-23).

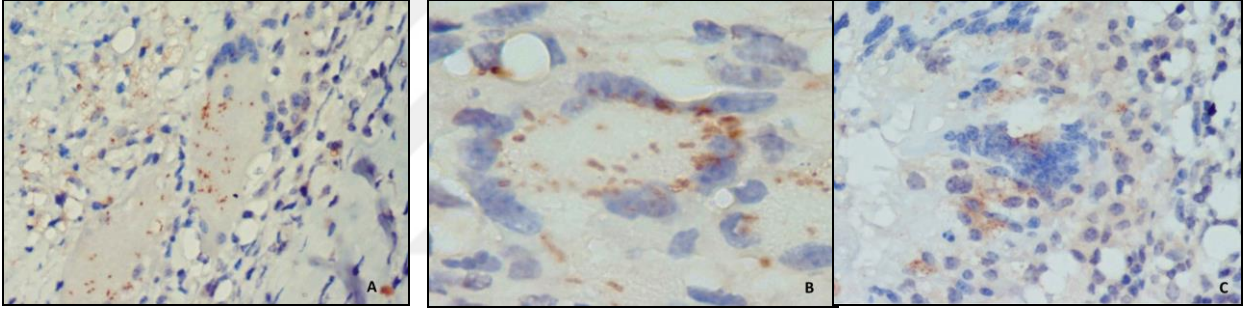
Kontrol grubunda 10 olguda (Olgu no. 1, 3, 7, 8, 12, 13, 15, 20, 26, 28) pozitif reaksiyon gözlenmiştir. Bu olgulardan ikisinin kandaki ve birinin dokudaki PZR incelemelerinde de pozitif sonuç alınmıştır. İSK incelemesinde negatif bulunup, diğer inceleme yöntemlerinde pozitif bulunan kontrol grubu olgusuna rastlanmamıştır (Tablo-2).



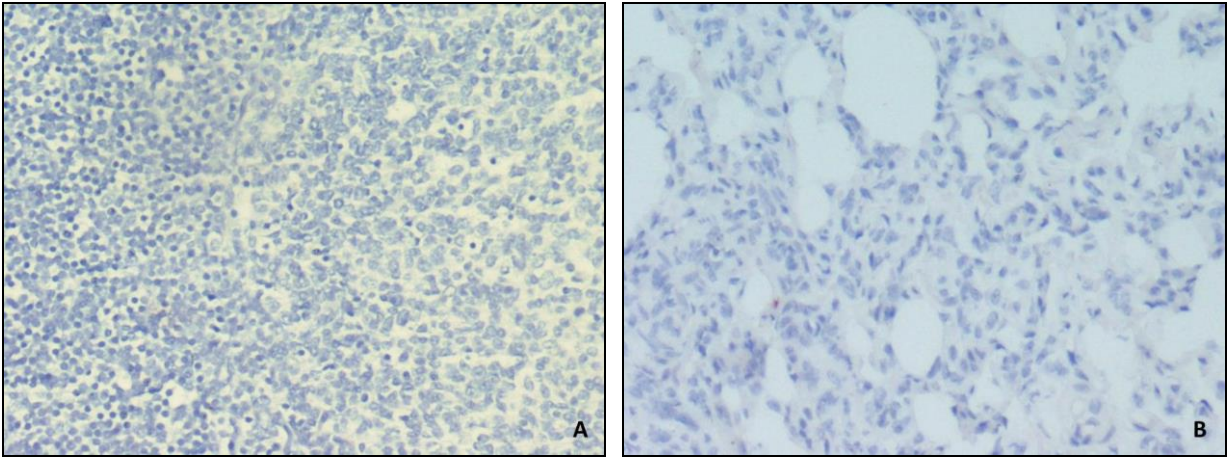
**Şekil-16:** Makrofajların sitoplazması (A, lenf yumrusu) ve dokuda serbest halde (B, akciğer) anti-*M.bovis* ile pozitif boyanma veren basil ve antijenik yapılar (oklar). (İHKx100, DAB kromojen) (25 ve 15.Olgu)



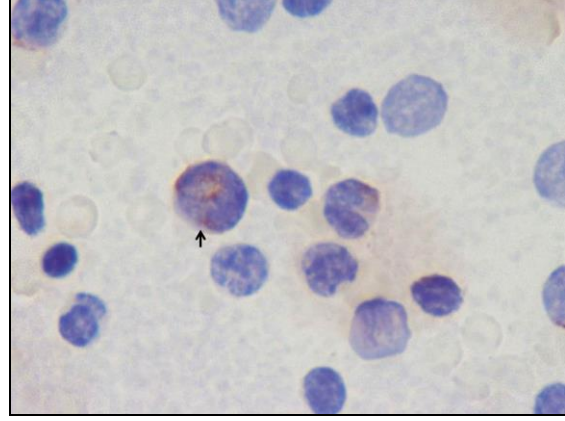
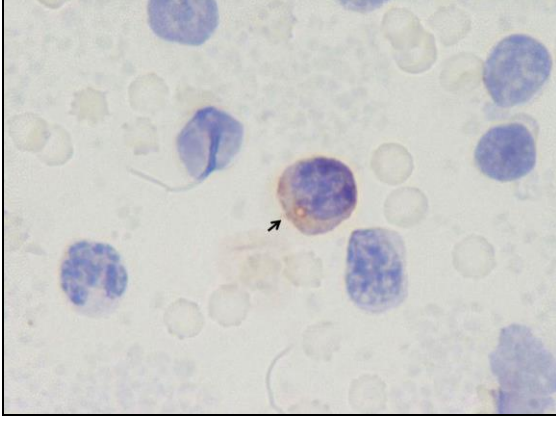
**Şekil-17:** Akciğer dokusunda nekroz şekillenmemiş bir granulom içindeki makrofaj sitoplazması (A) ve alveolar makrofajda (B) pozitif boyanma (İHKx100 ve x40, DAB kromojen) (A: 6.Olgu: HE, ZN, İHK:+ ; ISK, PZR:- ) (B: 24.Olgu: Sadece ISK -)



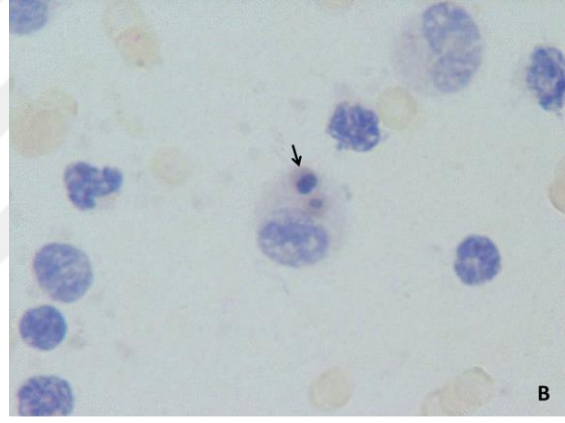
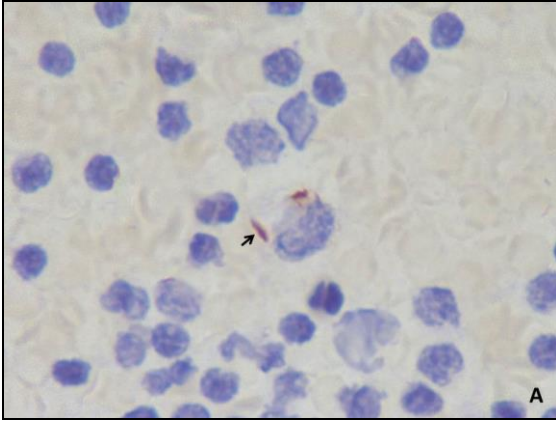
**Şekil-18:** Lenf yumrularında dev hücrelerinin sitoplazmalarında pozitif boyanma (x40, x100, DAB kromojen) (Sırasıyla A, B, C: 2, 26, 24. Olgu)



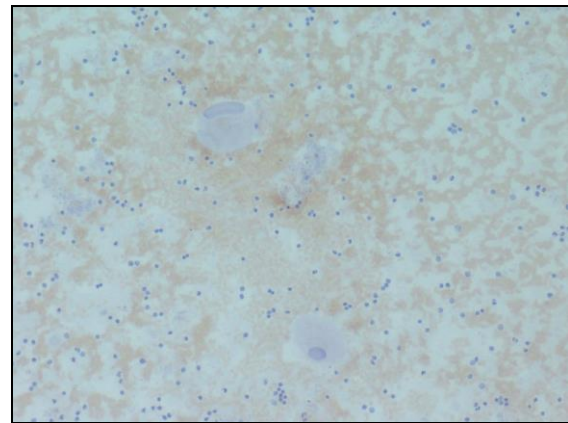
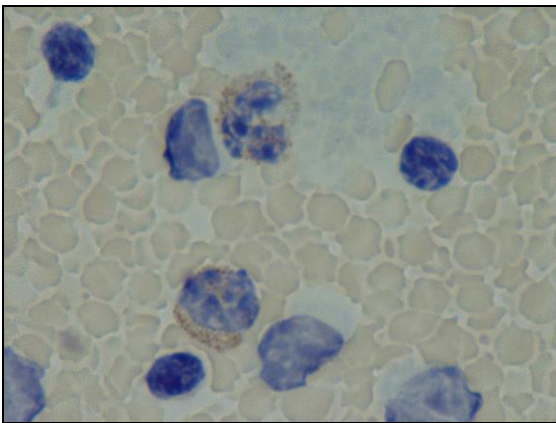
**Şekil-19:** Lenf yumrusu (A) ve akciğerde (B) negatif reaksiyon (İHK x40, DAB kromojen)



**Şekil-20:** Kan frotisinde pozitif boyanma gösteren lenfositler (İSKx100 DAB kromojen) (1.Olgu)



**Şekil 21:** Monosit sitoplazmasında pozitif boyanma (A) ve intrasitoplazmik yapılar (B) (İSKx100 DAB kromojen) (25.Olgu: Sadece İSK -)



**Şekil 22:** Nötrofil granüllerinde pozitif boyanma (İSKx100 DAB kromojen) (8.Olgu: İSK, PZR<sub>kan</sub>:-)

**Şekil 23:** Rumen protozoonlarının gözlendiği kan frotisi (İSKx100 DAB kromojen) (27.Olgu)

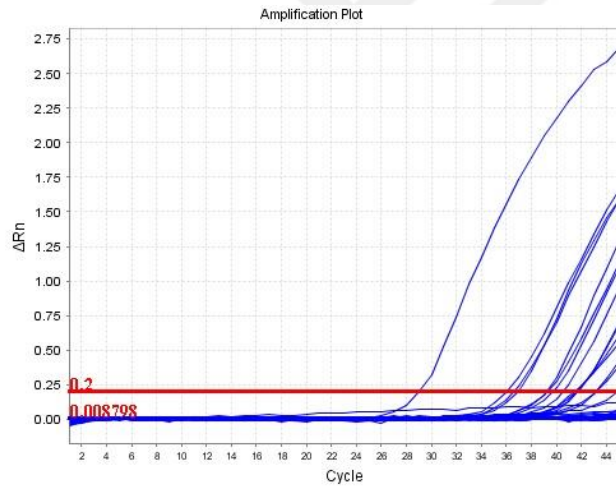
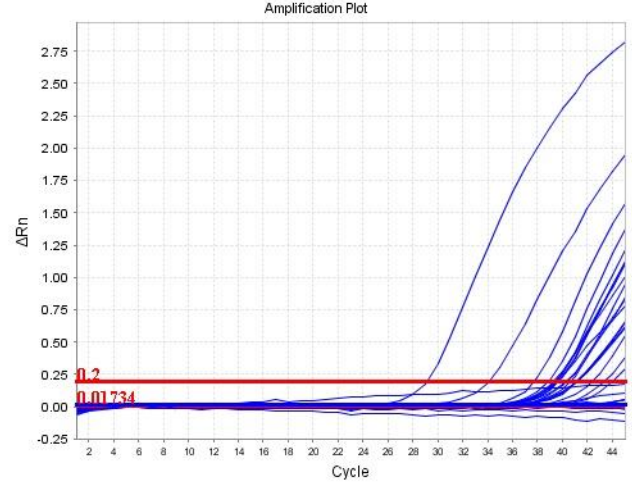
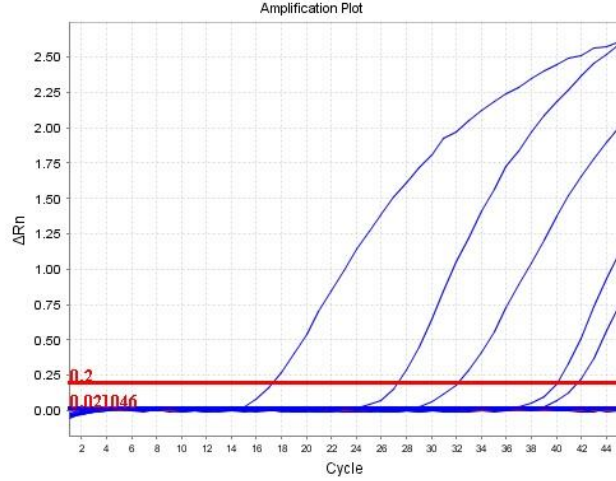
### 3. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Dokularda (akciğer, lenf yumrusu veya karaciğer), ticari ürün yönlendirmelerine göre yapılan PZR incelemelerinde, 30 adet deney grubundan 18 pozitif olgu saptanmıştır. Diğer inceleme yöntemlerinde (HE, ZN, İHK, İSK, PZR<sub>kan</sub>) tüberküloz yönünden negatif bulunup, PZR incelemesinde dokuda pozitivite gösteren iki olgu (Olgu no. 4 ve 17) tespit edilmiştir. PZR yöntemiyle dokularında pozitif, kanında ise negatif sonuç veren 10 olguya, doku ve kanın paralel olarak pozitif sonuç verdiği 8, negatif sonuç verdiği 6 olguya rastlanmıştır. İSK ile negatif bulunup, kanın PZR incelemesinde pozitif saptanan 11 olgu gözlenmiştir (Tablo-1 ve Şekil-24).

Kontrol grubunda ise 2 pozitif kan (Olgu no: 7 ve 8), 1 pozitif (Olgu no: 26) doku numunesine rastlanmıştır. Bu olguların üçü de İSK'da pozitif bulunmuştur (Şekil-24 ve Tablo-2).

**Tablo.3** Çalışma hayvanlarında İHK ve PZR incelemelerinde tüberküloz yönünden pozitif bulunan olgu sayıları

	<b>Deney (kan)</b>	<b>Deney (doku)</b>	<b>Kontrol (kan)</b>	<b>Kontrol (doku)</b>
<b>PZR</b>	14	18	2	1
<b>İmmun boyama</b>	3	26	10	0



**Şekil-24:** Kan ve dokudan elde edilen PZR grafikleri görülmektedir. Kan ve dokunun bir arada çalışıldığı, üç turda tamamlanan gerçek zamanlı PZR işleminde kırmızı çizgi ( $\Delta R_n$ : 0.2) testin dahili pozitif kontrol çizgisidir. Bu çizginin üzerindeki değerler *mycobacterium* kompleks pozitifdir.  $\Delta R_n$ : Bağlı floresan emüsyon yoğunluğu  
IPC: Dahili Pozitif Kontrol  
TUB: Test edilen örnek

#### 4. İSTATİSTİK

Makroskobik lezyonun varlığı temel alınarak yapılan ikili karşılaştırmaların biyoistatistiksel değerlendirme sonuçları tabloda görülmektedir. Pozitif/negatif tabanlı yapılan bu karşılaştırmalar sonucunda HE, ZN ve İHK sensitivite yönünden yüksek, makroskobik tanıyla uyumlu ( $p<0,05$ ) bulunmuştur (Tablo-4). Tanıda kan veya doku kullanılması yönünden yapılan karşılaştırmada ise biyoistatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ( $p=0.341$ ).(Tablo-5).

**Tablo-4:** Makroskopi ve diğer tanı yöntemlerinin uyumluluğunun incelenmesi

Karşılaştırılan yöntem	Sensitivite %	Spesifite %	Value (N:30)	Asymp.Std. Error <sup>a</sup>	Approx.T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
HE	92,86	100	,634	,233	3,732	,000
ZN	71,43	100	,250	,150	2,070	,038
İHK	89,29	100	,526	,228	3,273	,001
İSK	10,71	100	,016	,014	,488	,626
PZR (doku)	60,71	50	,032	,112	,299	,765
PZR (kan)	50	0,00	,118	,081	1,369	,171

**Tablo-5:** Tanı materyali olarak kan-doku karşılaştırmasıyla oluşan istatistik değerleri

Sensitivite %	Spesifite %	Value (N:30)	Asymp.Std. Error <sup>a</sup>	Approx.T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
48,28	100	,059	,058	,951	,341

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Hayvancılıkta önemli kayıplara yol açan ve halk sağlığını da tehdit eden sığır tüberkülozu ülkemizde sıklıkla gözlenmekte, mücadele etmek için tanıya önem verilmekte ve eradikasyon çalışmaları uygulanmaktadır (1, 5, 7). Bu nedenle hastalığın tanısının ön plana çıkması ve mevcut tanı yöntemlerinin yetersiz kaldığı noktalar, tanı yöntemleri konusunda araştırma ihtiyacını göstermektedir. Bu ihtiyaç göz önünde bulundurularak planlanan ve gerçekleştirilen bu tez çalışmasında deney grubunu oluşturan hayvanların hepsinin dişi ve ileri yaşlı bireylerden oluşması tüberküloz için tipik bir tablodur (1, 5, 7). Çünkü erkek hayvanlar dişilere göre daha kısa sürede kesime sevk edildiklerinden, hastalığın şekillenmesi için gereken uzun inkübasyon süresi, uzun süre beslenen dişi hayvanlara kıyasla erkek hayvanlarda oluşmamaktadır. Deney grubunda 4, kontrol grubunda ise 2 adet genç yaştaki (yaklaşık 1 yaş) tüberküloz olguları maternal bulaşmadan veya çok sayıda ve virulansı yüksek bakteriye maruz kalmaktan kaynaklanmış olabilir (5, 9, 35). Makroskobik muayenede gözlenen tüberkül yapısı daha önce belirtilen (7, 85) tanımlamalar ile uyumluluk göstermektedir. Bazı olgularda hastalık için tipik sayılan peynirimsi nekroz yerine daha akışkan, irinli içeriğin bulunduğu lezyonlar görülmüş, bunlar geç generalizasyon şeklinde yorumlanmıştır. Bu tarz lezyon (46) gözlenen olgular kronik-aktif tüberküloz şeklinde yorumlanmaktadır. Çoğu kaynakta belirtildiği gibi (7, 8, 85, 86), bu tez çalışması sırasında da hastalığın daha çok bir solunum yolu enfeksiyonu olduğunu düşündürecek şekilde, incelenen olgularda solunum yollarında daha sık lezyon şekillendiği görülmüştür. Lenf yumrusu tutulumlarında, lezyon gelişme sıklığı bakımından, bazı kaynaklar retrofaringeal lenf yumrularını (87), bazılarıysa mediastinal lenf yumrularını (33, 86) vurgulamaktadır. Retrofaringeal lenf yumrularında öncelikli olarak lezyon şekillenmesinin deneysel enfeksiyonlarda gözlendiği belirtilmektedir (86). Bu tez çalışmasında da lenf yumrularındaki tutulum göz önünde bulundurulduğunda, 18 olguda (%60) sadece mediastinal, 1 olguda (%3) sadece retrofaringeal, 11 olguda (%36) her iki lenf yumrusunda lezyon saptanmış, mediastinal lenf yumrularının diğer lenf yumrularına göre öncelikli olarak etkilendiği görülmüştür. Akciğerde lezyonların dorso-kaudal yerleşimi sıklıkla belirtilmiştir (46) ve bu çalışmada da paralel bir durum gözlenmiştir. Karaciğerde tüberkül gözlenmesi (6 olgu), hematojen yayılım (7, 88) olabileceği gibi sindirim yoluyla da



enfeksiyonun yayılımı şeklinde yorumlanmıştır. Karaciğerdeki bu lezyonların çalışmada gözleendiği gibi özellikle organın diyaframatik yüzünde konglomere, kabarık şekilde gözleendiği öncesinde belirtilmiş (89) ancak bu lezyon lokalizasyonunun belirgin lezyon gözlenmesiyle ilgili bir bildirimle rastlanmamıştır. Makroskopik inceleme sırasında nodüler lezyon gözlenen ancak histopatolojik incelemede tüberküloz bulguları göstermeyen olgular veya makroskobik lezyon saptanmadığı halde diğer tanı yöntemlerinde tüberküloz tanısı konan olgular da, tek başına makroskopiye dayanarak tüberküloz için tipik kabul edilen nodüler lezyonların tanıda yanıltıcı olabileceğini göstermektedir. Nodüler lezyonların diğer bakteriyel, paraziter, mikotik enfeksiyonlarda ve bulaşıcı olmayan diğer durumlarda da (46, 90-92) şekillendiği unutulmamalıdır.

Deney grubundaki HE ve ZN incelemeleri sonucu gözlenenler daha önce kaynaklarda belirtilen (7, 93), tipik granülom yapısıyla uyumluluk göstermektedir. Akciğerdeki mikroskobik lezyonların genel olarak incelen diğer organlarla kıyaslandığında daha nekrotik yapı göstermesi geç generalizasyon odakları şeklinde yorumlanmıştır (46). Ayrıca deney grubunda bronş, bronşiyol duvarlarında mikroskobik olarak gözlenen granülomlar, kronik akciğer tüberkülozunda bahsi geçen bakterinin öksürük yoluyla dışarı saçılmasına yardımcı olan açık organ tüberkülozu lezyonlarına (46) örnek olarak değerlendirilmiştir. ZN ile boyanmış preparatların incelenmesi makroskobik yönden tüberkülozla uyumlu bulunmuş olguların doğrulanmasında yardımcı olmuştur. Ancak Tablo-1'de de görüleceği gibi, tüberkülin deri testi pozitif ve organlarında makroskobik lezyon gösteren hayvanların (27 adet) bu dokularından hazırlanan preparatların ZN boyamasının sonucunda 20 tanesi (%74) pozitif, 7 tanesi ise negatif (%26) sonuç vermiştir. Bu 7 olgunun diğer testlerin en az birinde tüberküloz yönünden pozitif bulunduğu göz önünde bulundurulursa sadece ZN boyama ile yapılacak olan tanının sağlıklı olmayacağı görülmektedir. Pausibasillar veya latent enfeksiyonda bakteriyel hücre duvarı yapısının değişmesinin ZN boyamada yanlış negatif sonuca neden olabileceği bildirilmiştir (74).

İHK, yaygın olarak tümörlerin tiplendirilmesi amacıyla kullanılmakla birlikte doku ve hücrelerin antijenik yapılarının ortaya konduğu temel bilimsel çalışmalarda kullanıldığı gibi, infeksiyöz etkenlerin tanısında da yardımcı olmaktadır (60-64). Mikobakteriyel antijenlerin gösteriminde de İHK yöntemine başvurulmaktadır (65-69). Aranılan etkene ait antijenlerin

doku veya hücre içindeki lokalizasyonunun gösterilmesi hastalığın patogenezinin anlaşılmasında önemlidir (54). *M.bovis*'e özel, poliklonal primer antikorla yapılan bu tez çalışmasında, İHK incelemelerinde, başka çalışmalarda bildirildiği gibi (93) bakterilerin intra ve ekstraselüler olarak, nekroz alanının periferinde, nekrozu çevreleyen bağ doku ve lökosit infiltrasyon kuşağında yer aldığı, granulomun periferine gidildikçe bakteri yoğunluğunun azaldığı görülmüştür. Bakterilerin hem makrofaj hem de dev hücrelerinin sitoplazmalarında tespit edilmesi, antijen sunan hücre olarak hastalığın patogenezinde makrofajların önemini vurgulamaktadır (93-96). Bakterinin intraselüler fazına ilave olarak, ekstraselüler fazının, savunula gelen bakterinin daha ziyade intraselüler olduğu, ekstraselüler olması halinde baskılandığı ve üreyemediği görüşünün aksine, hastalığın patogenezi ve epidemiyolojisinde önemli rol oynadığını savunan güncel görüşle (97) uyumlu şekilde dokularda ekstraselüler olarak basiller gözlenmiştir. Ayrıca HE boyamalarda tüberkülozla uyumlu lezyonlar gözlenen deney grubundaki 27 olgunun 26'sının İHK'sında (%96) pozitif reaksiyon gözlenmiştir. Bu gözlem İHK'nın histopatolojiyle yüksek oranda uyumlu olduğunu göstermektedir.

Mikobakterilerin tanısı ve tiplendirilmesinde, insanlarda ve daha kısıtlı olarak sığırlarda bakteri kültürü, doku, kan, sekret gibi çeşitli örneklerde uygulanan yöntemlerden biri de PZR'dir (16-21). Sığır tüberkülozu ve *M. bovis* ile ilgili spesifik ve suş tayinine yönelik PZR çalışmaları vardır (22, 23). Ticari insan kiti kullanılarak yapılan bu tez çalışmasında dokulardan hazırlanarak yapılan PZR incelemeleri sonucunda doku numuları toplanan 30 vakanın 18 tanesinde elde edilen pozitif reaksiyon (%60) aynı dokular üzerinde yapılan İHK boyanması sonuçları (%96 pozitif reaksiyon) ile kıyaslandığında (%96) düşüktür. Ortaya çıkan bu farklılığın çalışmalarda kullanılan primer antikorlar ve PZR yöntemi farklılığından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Diğer yöntemlerin hepsinde negatif bulunan 4 ve 17. olguların dokularındaki pozitif PZR bulguları, PZR'nin yöntem olarak hassasiyetinden kaynaklanabileceği veya bu olguların çok erken dönemde olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, İHK'da kullanılan primer antikorun *M.bovis* türüne, PZR analizinde kullanılan ticari kitin, *M.tuberculosis* kompleksine (*M. tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*, *M.caprae*, *M.microti*, *M.pinnipedii*) ait herhangi bir mikobakteri cinsinde bulunan, IS6110 gen bölgesine spesifik olduğu düşünüldüğünde, bu olgularda, düşük bir ihtimal olsa da *M.tuberculosis* kompleksi içerisinde *M.bovis* olmayan bir mikobakteri türüyle enfeksiyon

yorumunu yapmak mümkündür. Bu iki olguya ek olarak İHK'da negatif, kan PZR'sinde pozitif bulunan 14. olgu için de bu yorumu yapmak mümkündür. Dördüncü olguda makroskobik veya mikroskobik lezyon görülmeden PZR'de pozitif sonuç alınması, erken evredeki bir enfeksiyon şeklinde yorumlanabilir. Bu olgunun sadece PZR ve deney grubundaki tüm olgular gibi tüberkülin deri testinde pozitif bulunması tüberkülin deri testinin hassasiyeti konusunda fikir vermektedir. Ancak yukarıda değinildiği gibi, bu enfeksiyonun *M.bovis* türüyle ilişkili olmama ihtimali unutulmamalıdır. Buna karşılık 22. olguda hiçbir testte pozitif sonuç alınmamasına karşılık tüberkülin deri testinde pozitif reaksiyon alınmış olması, bu testin patojen olmayan diğer mikobakterilerin varlığında da yanlış pozitif sonuç verebileceğine iyi bir örnektir. Çalışmadaki iki yöntem değerlendirildiğinde, PZR ve İHK, birbirine alternatif olmaktan ziyade birbirini tamamlayan iki teknik olarak görülmektedir.

Mononükleer fagositik sisteme dahil olan monosit, makrofaj, lenfositlerin ve dentritik hücrelerin fagositoz ve antijen sunumu göreviyle doku ve lenf-kan dolaşımı arasında her iki yönlü olarak geçiş yaptığı bilinmektedir (95, 98). Çeşitli çalışmalarda infeksiyöz etkene ait bileşenlerin kanda tespit edilebilirliği teorisi farklı hastalıklarda insan (99-102) ve hayvanlarda (103, 104) çalışılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. İnsanlarda tüberküloz etkeninin periferik kanda tanısına yönelik PZR ağırlıklı çalışmalarda (53, 76, 105) hastalığın tanısında periferik kanın kullanılabileceği ortaya konmuştur. İnsanlarda, farklı metodlarla öncesinde tüberküloz tanısı konmuş 48 bireyin örneklendiği bir çalışmada (76), PZR ile %33 oranında lökosit katmanında etken DNA'sı saptanmış bu da aktif tüberkülozla ilişkilendirilmiştir. Sığırlarda tüberkülozun tanısında ise immun sistemin reaksiyonuna dayalı çalışan testler (ELISA, tüberkülin deri testi, Interferon Gamma Testi) kullanılmasına karşın, etken veya etkene ait komponentlerin kanda tespitiyle tanıya yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Kanda etkene ait antijenik yapıların pozitif olarak boyanması bakteriyemi veya etkeni fagosite etmiş, dolayısıyla etken antijenlerini barındıran mononükleer fagositik sistem hücrelerinin dokulardan kana geçmesi ihtimalini de düşündürmüştür (95-98). İlave olarak *Mycoplasma bovis*'in periferik kan mononükleer hücrelerine ve eritrositlere invaze olduğu bildirilmekte (106) ancak mikobakteri türleri için böyle bir invazyon belirtilmemektedir. Bu tez çalışması sırasında gerçekleştirilen İSK sonucunda, periferik kandan alınan lökositlerde deney grubunda 3 (%10) ve kontrol grubunda gözlenen 10 (%30) pozitif reaksiyon veren olgu, kan lökosit

katmanının etkene ait bileşenlerin tespiti yoluyla tüberküloz hastalığının tanısında kullanılabileceğini göstermektedir. Deneysel gruba olgularında olduğu gibi tüberkülozla uyumlu lezyon gözlenmeksizin İSK'da 10, kan PZR'sinde 2 olgunun pozitif bulunması etkenin tanısında kanın önemini öne çıkarmaktadır. Deneysel grubundaki 3 olgunun karaciğerinde de tüberküloz tutulumu olduğu ve deneysel grubunda karaciğer tutulumu şekillenen olguların hepsinin (6 olgu) kan PZR'lerinde pozitif sonuç alındığı göz önünde bulundurulduğunda, etkenin kanda saptanmasının hastalığın generalizasyonu ile ilişkisi ortaya konmuş olur. Kandan hazırlanmış preparatların incelenmesi sırasında serbest halde pozitif boyanmış basil yapısına rastlanmamış, sadece lökositlerin sitoplazmasında boyanma saptanmıştır. Bu durumda etken kanda tespit edilmesine rağmen, bakterinin her zaman bakteriyemi safhasında, serbest halde etkenlerin varlığıyla kanda yakalanmasının, yapılan çalışmada da gözlemlendiği gibi zor olacağı anlaşılmaktadır. İSK'da kan frotilerinde gözlenen protozoonlar, örnekleme sırasında özofagusun da kesilmesi sonucunda rumen içeriğinin karıştığını göstermektedir. Bunun kullanılan yöntemleri etkilemiş olabileceği düşünülmemektedir ancak daha uygun örnek elde etmek açısından benzer tarzda bir çalışmada kanın kesim öncesinde alınması tercih edilmelidir. Bu çalışmanın, canlı hayvanda periferik kan alınarak yapılacak tanı için deneme olduğu göz önünde bulundurulursa, hedeflenen kan alma yolu olan venöz kanın örneklenmesi ile bu kontaminasyon doğal olarak ortadan kalkmış olacaktır.

Sığır tüberkülozunun tanısında nazal svab, süt gibi klinik örnekler üzerinde PZR yöntemi kullanılmıştır ve olumlu sonuçlar alınmıştır (107), ancak kanda, özellikle de lökosit katmanında tüberküloz tanısı yalnızca insanlarda denenmiştir (53, 76, 105). Bu tez çalışması kapsamında kandan hazırlanarak lökositler üzerinde yapılan PZR'de ise 14 vakada pozitif (%46) sonuç elde edilmiştir. Bu çalışmada PZR yöntemiyle dokularda saptanan (%60) pozitivite insanlarda yapılan benzer çalışmadaki doku pozitivitesinden (%63) düşük, kanda tespit edilen pozitivite ise (%46) insanlardaki kan pozitivitesinden daha (%33) yüksek saptanmıştır (76). Etkenin kanda saptanabilirliği gerçeği göz önüne alınacak olursa çalışma sonuçlarına göre PZR yönteminin İSK'ye göre kanda daha etkili olduğu söylenebilir. Bu farkın ortaya çıkmasında antijen ve nükleik asit stabilitesindeki farkın da etkili olduğu düşünülmektedir. Örnekleme sürecinde geçen zamanın antijenik yapıyı olumsuz etkilemesi İSK'deki düşük pozitivite nedenlerinden olabilir. Buna karşılık DNA, daha dayanıklı bir

moleküldür (108) örnekleme ve analiz arasındaki sürenin, molekülün saptanabilirliğine daha az etkisi vardır.

Sonuç olarak bu çalışmada etkene ait moleküllerin periferik kandaki varlığı ve sığır tüberkülozunun tanısında etkenin saptandığı yöntemlerde kanın kullanılabilceğı gösterilmiştir. Klasik olarak ZN boyama ile yapılacak tüberküloz tanısının her zaman hassasiyet göstermediğı ve teşhiste diğcr yöntemlere ihtiyaç olduğı gözlemlenmiştir. Bu nedenle destekleyici diğcr tanı yöntemi veya yöntemlerinin kullanılmasında fayda olacağı düşünülmektedir. Kullanılan yöntemlerden ise dokuda kullanılanlardan İHK nın kullanılan diğcr yöntemlere göre daha etkili sonuç verdiğı, kandan yapılan testlerde ise PZR' nin diğcr yöntemlere kıyasla daha etkili olduğı gözlenmiştir. Tüberküloz hastalığının kesin teşhisinde ise kullanılan tekniklerin üstünlüğü yerine birbirini tamamlayıcılığından ve bir arada kullanıldığında teşhisin hem daha hızlı hemde daha güvenilir olduğundan bahsetmek mümkündür. Bu tez çalışması kapsamında sığır tüberkülozu tanısı için PCR ve İSK yöntemleri kanda ilk kez denenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Çalışmanın temel hedefini oluşturan etkene ait bileşenlerin (antijen ve nükleik asit) kan-lökosit katmanındaki tesbit edilebilirliğinin, hangi safhalarda, ne derece tercih edilebileceğini net olarak ortaya koyabilmek, yöntemi rutin kullanıma sunabilmek için ileri çalışmalar gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Anonymous. BOVINE TUBERCULOSIS Terrestrial Manual of World Organization for Animal Health, C H A P T E R 2. 4. 7, 2009.
2. SUDRE P, TEN DAM G, KOCHI A. Tuberculosis: a global overview of the situation today, Bull World Health Organ, 70(2): 149-159, 1992.
3. COSIVI O, GRANGE JM, DABORN CJ, RAVIGLIONE MC, FUJIKURA T, COUSINS D, ROBINSON RA, HUCHZERMEYER HFAK, de KANTOR I, MESLIN FX. Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerging Infectious Diseases, 4: 59-70, 1998.
4. DONOGHUE HD, SPIGELMAN M, GREENBLATT CL, LEV-MAOR G, BAR-GAL GK, MATHESON C, NERLICH AG, ZINK AR. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA, The Lancet, 4:584-592, 2004.
5. HIRSCH DC, ZEE YC. Veterinary Microbiology, Blackwell Science, Massachusetts, page: 158-164, 1999.
6. OLSEN I, BARLETTA RG, THOEN CO. *Mycobacterium*, Editors: GYLES CL et al, Pathogenesis of Bacterial Diseases in Animals, 3rd edition, Blackwell Publishing, Iowa, page: 69-76, 2004.
7. JUBB KVF, KENNEDY PC, PALMER NC. Pathology of Domestic Animals, 5<sup>th</sup> edition, Elsevier Saunders, New York, page: 606-610, 2007.
8. WHIPPLE DL, BOLIN CA, MILLER JM. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 8: 351-354, 1996.
9. NEILL SD, BRYSON DG, POLLOCK JM. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. Tuberculosis, 81: 79-86, 2001.
10. ARDA M, MİNBAŞ A, AYDIN N, AKAY Ö, İZGÜR, LELOĞLU N, KAHRAMAN M, ILGAZ A, DİKER KS. Özel Mikrobiyoloji, 4.baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, s: 180-198, 1997.
11. AYELE WL, NEILL SD, ZINSSTAG J, WEISS MG, PAVLIK I. Bovine tuberculosis: An old disease but a new threat to Africa. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 8: 924-937, 2004.
12. MAZUREK GH, LOBUE PA, DALEY CL, BERNARDO J, LARDIZABAL AA, BISHAI WR, IADEMARCO MF, ROTHEL JS. Comparison of a Whole-Blood Interferon  $\gamma$  Assay with Tuberculin Skin Testing for Detecting Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection, Journal of the American Medical Association, 286: 1740-1747, 2001.

13. O' REILLY LM, DABORN CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle Lung Disease*, 76: Supplement: 1:1-46, 1995.
14. KAUFMANN S, WALKER BD. AIDS and Tuberculosis. *Infection Biology Handbook Series*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, page: 34-39, 2009.
15. KUMARARATNE DS. Tuberculosis and immunodeficiency-of mice and men. *Clinical and Experimental Immunology*, 107:11-14, 1997.
16. SACHSE K, FREY J. PCR detection of microbial pathogens: Methods and protocols, Humana Pres, New Jersey, page: 201-221, 2002.
17. BROSC R, GORDON SV, MARMIESSE M, BRODIN P, BUCHRIESER C, EIGLMEIER F, GARNIER T, GUTIERREZ C, HEWINSON G, KREMER K, PARSONS LM, PYM AS, SAMPER S, Van SOOLINGEN D, COLE ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6): 3684-3689, 2002.
18. HERMANS PW, SCHUITEMA AR, Van SOOLINGEN D, VERSTYNNEN CP, BIK EM, THOLE JE, KOLK AH, Van EMBDEN JD. Specific Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(6): 1204, 1990.
19. PARSONS LM, BROSC R, COLE ST, SOMOSKÖVI A, LODER A, BRETZEL G, Van SOOLINGEN D, HALE YM, SALFINGER M. Rapid and Simple Approach for Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by PCR-Based Genomic Deletion Analysis. *Journal of clinical microbiology*, 40(7): 2339–2345, 2002.
20. KAMERBEEK J, SCHOULS L, KOLK A, VAN AGTERVELD M, VAN SOOLINGEN D, KUIJPER S, BUNSCHOTEN A, MOLHUIZEN H, SHAW R, GOYAL M, VAN EMBDEN J. Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. *Journal of clinical microbiology*, 35(4): 907–914, 1997.
21. HUARD RC, LAZZARINI LCO, BUTLER WR, Van SOOLINGEN D, HO JL. PCR-Based Method to Differentiate the Subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex on the Basis of Genomic Deletions. *Journal of clinical microbiology*, 41(4): 1637–1650, 2003.
22. SMITH NH, GORDON SV, RUA-DOMENECH R, CLIFTON-HADLEY RS, HEWINSON RG. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nature*, 4(9): 670-681, 2006.
23. ZUMARRAGA MJ, MEIKLE V, BERNARDELLI A, ABDALA A, TARABLA H, ROMANO MI, CATALDI A. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(3): 232–238, 2005.

24. WOUK H. Tuberculosis. Marshall Cavendish Corporation, New York, page: 28-67, 2010.
25. FINER KR. Tuberculosis. Deadly Diseases and Epidemics, Chelsea House Publishers, New York, page: 8-23, 2003.
26. SAJDUDA A, BRZOSTEK A, POPLAWSKA M, AUGUSTYNOWICZ-KOPEC E, ZWOLSKA Z, NIEMANN S, DZIADEK J, HILLEMANN D. Molecular characterisation of rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. Journal of Clinical Microbiology, 42(6): 2421-2425, 2004.
27. PAVLIK I, YAYO AYELE W, PARMOVA I, MELICHAREK I, HANZLIKOVA M, KOERMENDY B, NAGY G, CVETNIC Z, OCEPEK M, FEJZIC N, LIPIEC M. Incidence of bovine tuberculosis in cattle in seven central European countries during the years 1990-1999. Veterinarni Medicina, 2-3: 45-51, 2002.
28. AKAY Ö, AYDIN N, ARDA M, HAZIROĞLU R. Bir minkte saptanan tüberkülozis olgusu üzerinde araştırmalar, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 31: 463-470, 1984.
29. AKAY Ö, HAZIROĞLU R, KUTSAL O. Bir kedide tüberküloz olgusu. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 32: 438-445, 1985.
30. DİKER F. Bursa yöresinde çeşitli ırk sığırlarda görülen tüberküloz lezyonlarının organlara dağılışı ve histolojik yapıları. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Patoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, Bursa, 1988.
31. KAHRAMAN MM, KAHRAMAN F. İki maymunda görülen tüberküloz olgusu. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 8:47-58, 1996.
32. BOZOĞLU H, SAĞLAM YS, BAŞ AT. Erzurum ve çevresindeki mezbahalarda kesilen sığırlarda *Mycobacterium* spp. izolasyonu ve lezyonların histopatolojik incelemesi. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 9:45-56, 1997.
33. ÖZCAN K, BEYTUT E, AYDIN F, TUZCU M. Tuberculosis in geese (*Anser anser*) in Turkey. Avian Diseases, 45: 755-759, 2001.
34. ÖZMEN Ö, KURŞUN O, ÖZÇELİK M. Bovine tuberculosis in Burdur, Southern Turkey: epidemiological, pathological and economic study. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 9: 1398-1402, 2005.
35. GÜMÜŞSOY KS, ATASEVER A, AYDIN F. Prevalance of tuberculosis in cattle in Turkey, Medycyna Weterynaryjna, 63: 305-308, 2007.
36. OZYIGIT MO, SENTURK S, AKKOC A. Congenital generalized tuberculosis in a new-born calf. Veterinary Record, 160: 307-308, 2007.



37. ÜNVER A, ATABAY Hİ, GÜNEŞ V, ÇİTİL M, ERDOĞAN HM. Kars yöresinde sığır tüberkülozunun yaygınlığının PCR ile belirlenmesi. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 13: 27-31, 2007.
38. ÖZBEY G, KALENDER H, MUZ A. Sığır tüberkülozunun epidemiyolojisi ve teşhisi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, sayfa: 307-314, 2008.
39. CLIFTON-HADLEY RS, SAUTER-LOUIS CM, LUGTON IW, JACKSON R, DURR PA, WILESMITH JW. Mycobacterial diseases. Editors: WILLIAMS ES, BARKER IK. Infectious Diseases of Wild Mammals, 3<sup>rd</sup> Edition, Blackwell Publishing, Iowa, page: 340-371, 2001.
40. DE LISLE GW, MACKINTOSH CG, BENGIS RG. *Mycobacterium bovis* in free living and captive wildlife including farmed deer. Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties, page: 86-111, 2001.
41. O'BRIEN DJ, FITZGERALD SD, LYON TJ, BUTLER KL, FIERKE JS, CLARKE KR, SCHMITT SM, COOLEY TM, DERRY DE. Tuberculous lesions in free-ranging white-tailed deer in Michigan. Journal of Wildlife Diseases, 37: 608-613, 2001.
42. GILBERT M, MITCHELL A, BOURN D, MAWDSLEY J, CLIFTON-HADLEY R, WINT W. Cattle movements and bovine tuberculosis in Great Britain. Nature, 435: 491-496, 2005.
43. GORMLEY E, COSTELLO E. Tuberculosis and badgers: new approaches to diagnosis and control. Journal of Applied Microbiology, 94: 80-86, 2003.
44. FITZGERALD SD, KANEENE JB. Wildlife reservoirs of bovine tuberculosis worldwide: Hosts, pathology, surveillance and control. Veterinary Pathology, 50: 488-499, 2013.
45. BARWINEK F, TAYLOR NM. Assessment of the socio-economic importance of bovine tuberculosis in Turkey and possible strategies for control or eradication. Turkish-German Animal Health Information Project General Directorate of Protection and Control, Ankara, 1996.
46. WEISS E, RUDOLPH R. Atmungs Organe. Editors: DAHME E, WEISS E. Grundriss der Speziellen Pathologischen Anatomie der Haustiere, Enke Verlag, Stuttgart, 6.Auflage, seite:73-74, 2007.
47. SAKAMOTO K. The Pathology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Veterinary Pathology, 49: 423-439, 2012.
48. BUDDLE BM, WARDS BJ, ALDWELL FE, COLLINS DM, de LISLE GW. Influence of sensitisation to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. Vaccine, 20: 1126-1133, 2002.

49. MILLER MA. Current diagnostic methods for tuberculosis in zoo animals. Editors: FOWLER ME, MILLER ME. Zoo and wild animal medicine current therapy 6, Saunders Elsevier, Missouri, page: 10-18, 2008.
50. SCHILLER I, OESCH B, VORDERMEIER HM, PALMER MV, HARRIS BN, ORLOSKI KA, BUDDLE BM, THACKER TC, LYASHCHENKO KP, WATERS WR. Bovine Tuberculosis: A Review of Current and Emerging Diagnostic Techniques in View of their Relevance for Disease Control and Eradication. *Transboundary and Emerging Diseases*, 57(4): 205–220, 2010.
51. WHELAN C, SHURALEV E, O'KEEFFE G, HYLAND P, KWOK HF, SNODDY P, O'BRIEN A, CONNOLLY M, QUINN P, GROLL M, WATTERSON T, CALL S, KENNY K, DUGNAN A, HAMILTON MJ, BUDDLE BM, JOHNSTON JA, DAVIS WC, OLWILL SA, CLARKE J. Multiplex Immunoassay for Serological Diagnosis of *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle. *Clinical and vaccine immunology*, page: 1834–1838, 2008.
52. BEKMURZAYEVA A, SYPABEKOVA M, KANAYEVA D. Tuberculosis diagnosis using immunodominant secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 93: 381-388, 2013.
53. TEHMINA M, WIKER HG, MFINANGA SGM, MORKVE O, SVILAND L. *Modern Pathology*, 19:1606-1614, 2006.
54. MOTER A, GÖBEL UB. Fluorescence in situ hybridisation for direct visualization of microorganism. *Journal of Microbiological Methods*, 41: 85-112, 2000.
55. SEILER P, ULRICHS T, BANDERMANN S, PRADL L, JÖRG S, KRENN V, MORAWIETZ L, KAUFMANN SH, AICHELE P. Cell wall alterations as an attribute of *Mycobacterium tuberculosis* in latent infection. *Journal of Infectious Diseases*, 188(9): 1326-1331, 2003.
56. STENDER H, LUND K, PETERSEN KH, RASMUSSEN OF, HONGMANEE P, MIÖRNER H, GODTFREDSSEN E. Fluorescence in situ hybridization assay using peptide nucleic acid probes for differentiation between tuberculous and nontuberculous mycobacterium species in smears of mycobacterium cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 2760-2765, 1999.
57. FENHALLS G, STEVENS-MULLER L, WARREN R, CARROLL N, BEZUIDENHOUT J, VAN HELDEN P, BARDIN P. Localisation of mycobacterial DNA and RNA in human tuberculous granulomas. *Journal of Microbiological Methods*, 70:197-208, 2002.
58. FENHALLS G, STEVENS L, MOSES L, BEZUIDENHOUT J, BETTS JC, HELDEN Pv P, LUKEY PT, DUNCAN K. In situ detection of *Mycobacterium tuberculosis* transcripts in human lung granulomas reveals differential gene expression in necrotic lesions. *Infection and Immunity*, 70: 6330-6338, 2002.

59. LEFMANN M, SCHEICKERT B, BUCHHOLZ P, GÖBEL UB, ULRICHS T, SEILER P, THEEGARTEN D, MOTER A. Evaluation of peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization for identification of clinically relevant mycobacteria in clinical specimens and tissue sections. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10): 3760-3767, 2006.
60. DABBS D. *Diagnostic immunohistochemistry*, 3rd edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, page: 1-25, 2010.
61. BUCHWALOW IB, BÖCKER W. *Immunohistochemistry: Basics and methods*, Springer Verlag, Heidelberg, page: 1-66, 2010.
62. PUROHIT MR, TEHMINA M, WIKER HG, MORKVE O, SVILAND L. Immunohistochemical diagnosis of abdominal lymph node tuberculosis by detecting *Mycobacterium tuberculosis* complex specific antigen MPT64. *Diagnostic Pathology*, 40: 782-791, 2007.
63. RAMOS-VARA JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 42(4): 405-426, 2005.
64. CARTUN RW. Immunohistochemistry of Infectious Diseases. *Journal of Histotechnology*, 3: 195-202, 1995.
65. HUNTER RL, JAGANNATH C, ACTOR JK. Pathology of postprimary tuberculosis in humans and mice: contradiction of long-held beliefs. *Tuberculosis*, 87(4): 267-278, 2007.
66. SUMI S, RADHAKRISHNAN VV. Evaluation of immunohistochemistry with a panel of antibodies against recombinant mycobacterial antigens for the diagnosis of tuberculous lymphadenitis. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, 1(5): 215-219, 2009
67. CASSIDY JP, BRYSON DG, POLLOCK JM, EVANS RT, FORSTER F, NEILL SD. Lesions in Cattle Exposed to *Mycobacterium bovis*-inoculated Calves. *Journal of Comparative Pathology*, 121(4): 321–337, 1999.
68. TÜZÜN-İNCE A, GÜNEŞ P, ŞENATEŞ E, SEZİKLİ M, TİFTİKÇİ A, ÖVÜNÇ O. Can an Immunohistochemistry Method Differentiate Intestinal Tuberculosis from Crohn's Disease in Biopsy Specimens? *Digestive Diseases and Sciences*, 56(4): 1165–1170, 2011.
69. GUTIÉRREZ CANCELA MM, GARCIA MARIN JF. Comparison of Ziehl-Neelsen staining and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and caprine tuberculous lesions. *Journal of Comparative Pathology*, 109(4): 361-370, 1993.
70. FETSCH PA, ABATI A. Immunocytochemistry in Effusion Cytology. *Cancer Cytopathology*, 93: 293-308, 2001

71. FETSCH PA, SIMSIR A, BROSKY K, ABATI A. Comparison of three commonly used cytologic preparations in effusion immunocytochemistry. *Diagnostic Cytopathology*, 26: 61-66, 2002
72. DABBS D. *Diagnostic immunohistochemistry*, 3rd edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, page: 890-897, 2010.
73. GOEL MM, BUDHWAR P. Species specific immunocytochemical localization of *Mycobacterium tuberculosis* complex in the fine needle aspirates of tuberculous lymphadenitis using antibody to 38kDa immunodominant protein antigen. *Acta Cytologica*, 52: 424-433, 2008.
74. HERNANDEZ-PANDO R, JEYANATHAN M, MENGISTU G, AGUILLAR D, OROZCO H, HARBOE M, ROOK GA, BJUNE G. Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *The Lancet*, 356: 2133-2138, 2000.
75. PALMER MV, STOFFREGEN WC, CARPENTER JG, STABEL JR. Isolation of *M.avium subsp paratuberculosis* (Map) from feral cats on a dairy farm with Map-infected cattle. *Journal of Wildlife Diseases*, 41:629-635, 2005.
76. MIRZA S, RESTREPO BI, McCORMIK JB, FISHER-HOCH SP. Diagnosis of tuberculosis lymphadenitis using a polymerase chain reaction on peripheral blood mononuclear cells. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69: 461-465, 2003.
77. DARBY IA, HEWITSON TD. *In Situ Hybridization Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, 3<sup>rd</sup> edition, Humana Press, New Jersey, page: 9-16, 2006.
78. SACHSE K, FREY J. *PCR detection of microbial pathogens: Methods and protocols*, Humana Press, New Jersey, page: 1-50, 2002.
79. LO YMD, CHIU RWK, CHAN KCA. *Clinical applications of PCR*, 2<sup>nd</sup> Edition, Humana Press, New Jersey, page: 1-10, 2006.
80. WILKS M. *PCR Detection of microbial pathogens*, *Methods in Molecular Biology* 943, 2nd Edition, Humana Press, London, Page:1-16, 2013.
81. KOX LFF, LEEUWEN, KNIJPER S, JANSEN HM, KOLK HJ. PCR assay based on DNA coding for 16S rRNA for detection and identification of mycobacteria in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 3225-3233, 1995.
82. PARK H, JANG H, KIM C, CHUNG B, CHANG CL, PARK SK, SONG S. Detection and Identification of Mycobacteria by Amplification of the Internal Transcribed Spacer Regions with Genus and Species-Specific PCR Primers. *Journal of clinical microbiology*, 38(11): 4080-4085, 2000.

83. RORING S, HUGHES MS, SKUCE RA, NEILL SD. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. *Veterinary Microbiology*, 74(3): 227-236, 2000.
84. CADMUS S, PALMER S, OKKER M, DALE J, GOVER K, SMITH N, JAHANS K, HEWINSON RG, GORDON SV. Molecular analysis of human and bovine tubercle bacilli from a local setting in Nigeria. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(1): 29-34, 2006.
85. MENIN A, FLEITH R, RECK C, MARLOW M, FERNANDES P, PILATI C. Asymptomatic cattle infected with *Mycobacterium bovis* present exacerbated tissue pathology and bacterial dissemination. *PlosOne*, 8 (1): e53884, 2013.
86. MENZIES FD, NEILL SD. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *The Veterinary Journal*, 160: 92-160, 2000.
87. PALMER MV, WHIPPLE DL, RHYAN JC, BOLIN CA, SAARI DA. Granuloma development in cattle after intratonsillar inoculation with *Mycobacterium bovis*. *American Journal of Veterinary Research*, 60: 310-315, 1999.
88. McGAVIN MD, ZACHARY JF. *Pathologic Basis of Veterinary Diseases*, 4th Edition, Mosby Elsevier, St. Louis, Page: 432, 2007.
89. PAMUKÇU M. *Veteriner Patoloji*, II. Cilt, Ankara Üniversitesi Basımevi, sayfa: 166, 1970.
90. VICENTE J, HÖFLE U, GARRIDO JM, FERNÁNDEZ-DE-MERA IG, ACEVEDO P, JUSTE R, BARRAL M, GORTAZAR C. Risk factors associated with the prevalence of tuberculosis-like lesions in fenced wild boar and red deer in south central Spain. *Veterinary Research*, 38(3): 451-464, 2007.
91. LUNA LG. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, Blakiston Division, McGraw-Hill; 3rd edition, New York , page: 32-46 and 220,1968.
92. JACKSON P, BLYTHE D. Immunolabelling techniques for light microscopy. In J.E. Beesley (Ed.), *Immunocytochemistry*. Oxford, Oxford University Press, page:15-41, 1995.
93. BOROS DL. Granulomatous infections and inflammations, *Cellular and Molecular Mechanisms*. American Society for Microbiology Press, Washington DC, page: 1-21, 2003.
94. MUKHOPADHYAY S, GAL AA. Granulomatous Lung Disease. *Archives of Pathology&Laboratory Medicine*, 134: 667-687, 2010.
95. DIVANGAHI M. *The new paradigm of immunity to tuberculosis*. Springer Science+Business Media, New York, page: 238-239, 2013.

96. CREVEL R, OTTENHOFF THM, MEER JWM. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*, *Clinical Microbiology Reviews*, 15: 294-309, 2002.
97. KAUFMAN S, MEDZHITOV R, GORDON S. The innate immune response to infection, ASM Press, Washington, Page: 444-448, 2004.
98. RUSSEL DG. Who puts the tubercle in tuberculosis, *Nature Reviews Microbiology*, 5: 39-47, 2007.
99. ORME IM. A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis, *Tuberculosis*, 94: 2014.
100. McGAVIN MD, ZACHARY JF. *Pathologic Basis of Veterinary Diseases*, 4th Edition, Mosby Elsevier, St. Louis, Page: 249-252, 2007.
101. QUEIPO-ORTUNO MI, MORATA P, OCON P, MANCHADO P, COLMENERO JD. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay, *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 2927-2930, 1997.
102. LION T, BAUMGARTINGER R, WATZINGER F, MATTHES-MARTIN S, SUDA M, PREUNER S, FUTTERKNECHT B, LAWITSCHKA A, PETERS C, POTSCHGER U, GADNER H. Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease, *Blood*, 102: 1114-1120, 2002.
103. BOMAN J, SÖDERBERG S, FORSBERG J, BIRGANDER LS, ALLARD A, PERSSON K, JIEDLL E, KUMLIN U, JUTO P, WALDENSTRÖM A, WADELL G. High Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* DNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Cardiovascular Disease and in Middle-Aged Blood Donors, *Journal of Infectious Diseases*, 178: 274-277, 1998.
104. ZAHARAPOULOS P. Demonstration of parasites in *Toxoplasma* lymphadenitis by fine-needle aspiration cytology: report of two cases, *Diagnostic Cytopathology*, 22: 11-15, 2000.
105. O'TOLE D, LI H, MILLER D, WILLIAMS WR, CRAWFORD TB. Chronic and recovered cases of sheep associated malignant catarrhal fever in cattle, *Veterinary Record*, 140: 519-524, 1997.
106. MERWE J, PRYSLIAK T, PEREZ-CASAL J. Invasion of Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cells and Erythrocytes by *Mycoplasma bovis*, *Infection and Immunity*, 78:4570-4578, 2010.
107. CABRERA L, WITTE J, VICTOR B, VERMEIREN L, ZIMIC M, BRANDT J, GEYSEN D. Specific detection and identification of African trypanosomes in bovine peripheral blood by means of a PCR-ELISA assay, *Veterinary Parasitology*, 164: 111-117, 2009.

108.CONDOS R, McCLUNE A, ROM WN, SCHLUGER NW. Peripheral blood based PCR assay to identify patients with active pulmonary tuberculosis. The Lancet, 347: 1082-1085, 1996.



## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının oluŐturulması, gerçekleŐtirilmesi ve tamamlanmasında büyük emeği olan tez danıŐmanım Prof. Dr. M. Müfit KAHRAMAN ve Doç. Dr. M. Özgür ÖZYİĞİT baŐta olmak üzere Prof. Dr. Grsel SÖNMEZ, Yard. Doç. Dr. İ. Taci CANGL, Doç. Dr. Ahmet AKKOÇ, Yard. Doç. Dr. Aylin ALASONYALILAR-DEMİRER ve diğer bütün hocalarıma; mesai arkadaŐlarıma; örneklerin bulunması ve toplanması noktasında iÇ birliği ve değerli yardımlarını sunan Vet. Hek. Hasan SULTANOĞLU' na; çalışmanın PZR aşamasında teknik desteklerini ve laboratuvar imkanlarını sunan DİAGEN firması ve firmanın Selçuk Üniversitesi Teknokent Ar-Ge Laboratuvarı alıŐanları moleküler biyolog Sait ERCEYLAN ve kimyager Hasan ŐAHİN'e; hayatımın ve eğitimimin her aşamasında bana destek olan, özverilerini esirgemeyen aileme sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.



## ÖZGEÇMİŞ

Özalp ilçesinde, 1985 tarihinde doğdum. İlk ve orta öğrenimime çeşitli okullarda devam ederek 2003 yılında Antalya Anadolu Lisesi'nden mezun oldum. Aynı sene Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesinde başladığım eğitimimi 2008 yılı Haziran ayında tamamladım. Aynı sene Eylül ayında Veteriner Patoloji Anabilim Dalında doktora eğitime başlayıp, Wildlife Center of Virginia/Amerika'da 3 ay süreyle çalışmalarda bulunduktan sonra eğitime devam ettim. 2013 Temmuz ayında İsviçre'de, Bern Üniversitesi Veteriner Patoloji Enstitüsü, Yabani Hayvan Hastalıkları Bölümünde başladığım tez çalışması ve European College of Veterinary Pathology Residency eğitime devam etmekteyim. Veteriner Patoloji Eğitiminin yanında atletizm ile ilgilenmekteyim. İngilizce ve Almanca yabancı dillerini kullanmaktayım.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

Yazar Adı Soyadı	Ezgi Akdeşir
Tez Adı	Kanda ve Dokularda <i>Mycobacterium bovis</i> Etkeninin Moleküler ve Sito-Histopatolojik Yöntemlerle Gösterilmesi
Enstitü	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Veteriner Patoloji
Bilim Dalı	Veteriner Patoloji
Tez Türü	Doktora
Tez Danışman(lar)ı	Prof. Dr. M. Müfit KAHRAMAN
Çoğaltma (Fotokopi Çekim) İzni	<input checked="" type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimin sadece içindekiler, özet, kaynakça ve içeriğinin % 10 bölümünün fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin vermiyorum
Yayımlama İzni	<input checked="" type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasının ertelenmesini istiyorum 1 yıl <input type="checkbox"/> 2 yıl <input type="checkbox"/> 3 yıl <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin vermiyorum

Hazırlamış olduğum tezimin yukarıda belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih: 13.05.2016

İmza: