

Çukurova Yöresinde Sığırlarda Görülen Granümatöz Pnömonilerin Etiyolojisinin Histopatolojik ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi*

Harun AKILLI¹, Atila YOLDAS², Murat ÖZMEN², Hüseyin TOPÇUOĞLU¹
Nevin TURUT³, Nevin TUZCU³

Geliş tarihi/Received:1.4.2012, Kabul Tarihi/Accepted:5.6.2012

¹Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Patoloji Laboratuvarı, Adana, Türkiye

²Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı, Adana, Türkiye

³Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Bakteriyoloji Laboratuvarı, Adana, Türkiye

Özet

Bu projede, sığırlarda görülen granümatöz pnömoniler (GP) ile son zamanlarda artış eğilimine giren tüberkülozun (Tb), sığırlardaki görülme oranı ve patolojik özellikleri ortaya konularak, söz konusu pnömonileri oluşturan etkenlerin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-time PCR) ile teşhisinin yapılabilirliği araştırıldı. Bu çalışmada Adana bölgesinde faaliyet gösteren mezbahanelere kesim için getirilen 5000 baş sığırın kesim sonrası akciğerlerin ve ilgili lenf düğümlerinin makroskopik muayeneleri yapıldı. Olguların 38'inde (% 0,76) granümatöz pnömoni tespit edildi. Bunların PCR incelenmesinde 23 (%60) tanesinin Tb ve 10 (%38) tanesinin pnömomikozla ilgili olduğu belirlendi. 5 (%2) tanesinde de etkenlere ait DNA amplifikasyonu görülmedi.

Anahtar Kelimeler: Granümatöz pnömoni, Sığır, PCR, Patoloji

Etiology of Granulomatous Pneumonia of Cattle Determine by Histopathological and Molecular Methods in Cukurova District of Turkey

Abstract

The availability of the application of real time PCR for the determination of etiologic factors of the granulomatous pneumonia (GP) and tuberculosis (Tb), which had an increasing incidence recently, has been investigated about the pathologic features and prevalence in cattles. During this investigation, macroscopical post mortem clinical examination of 5000 cattles of lungs and lymph nodes in slaughterhouses in Adana has been carried out and granulomatous pneumonia were determined in 38 (0,76%) cases. Real time PCR investigation of these cases reveals that 23 (60%) cases are related to Tb and 10 (38%) cases are related to pneumomycosis. However, no DNA amplification were determined for five cases using real time PCR.

Key Words: Granulomatous Pneumonia, Cattle, PCR, Patology

Giriş

Bu proje ile Adana bölgesinde kesilen sığırlarda görülen granümatöz pnömonilerin oranları belirlenerek, günümüzde yaygın olarak kullanılmaya başlayan PCR tekniği ile etiyojileri belirlenmeye çalışıldı. Son yıllarda bir çok hastalığın teşhisinde çeşitli araştırmacılar tarafından kullanılan ve yüksek düzeyde duyarlı ve spesifik olduğu saptanan PCR tekniği ile (4,14,29) öncelikle sığır tüberkülozu etkenleri ve diğer mikotik pnömoni etkenlerinin hızlı ve kesin olarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Sığır tüberküloz etkeninin insan tüberkülozuna da sebep olması, bu hastalığın insan topluluklarında eradikasyonu için öncelikle sığır tüberkülozunun kontrol ve eradike edilmesini gerekli kılmaktadır. Dünyada eradikasyon amacıyla yapılan tüm uygulamaların temeli bu hastalığı taşıyan hayvanların belirlenmesi ve itlaf edilmesidir. Tüberkülozun teşhisinde genelde konvensiyonel teknikler kullanılmaktadır. Bunlar bakteriyolojik olarak etkenin enfekte materyalden

izole edilmesi, deri duyarlılık testi serolojik testler ve ölü hayvanlardan alınan dokuların histopatolojik muayenesidir.

Etken izolasyonu en etkili ve kesin yöntemdir. Ancak izolasyonun çoğu zaman aylarca sürmesi, izolasyon için selektif besi yerlerine ihtiyaç duyulması ve etkenin yüksek patojeniteye sahip olması birer dezavantajdır. Daha güvenli olan serolojik testlerin (Aglutinasyon testleri, komplemant fikzasyon, indirekt-hemaglutinasyon, presipitasyon, ELISA) diğer mikobakteri türleriyle çapraz reaksiyon vermesi nedeniyle güvenilir olmadığı belirtilmektedir (3,17,23). Bahsedilen testlerin bir diğer dezavantajı da çok düşük seviyedeki serum antikorlarını tespit edememeleridir (26). Tüberküloz teşhisinde kullanılan bir diğer yöntem PPD deri testidir. Tüberküloz etkeni izole edilmesine rağmen PPD negatif ve patolojik bulguların rastlanmadığı durumlar da rapor edilmiştir (22)

Granümatöz pnömoniler (GP), akciğerde genellikle lokal veya bazen yaygın yerleşimli, değişik büyüklükte

granülomlara neden olan kronik pnömonilerdir. Bunlar arasında en önemlisi şüphesiz tüberküloza (Tb) ilgili olanlarıdır. Bunu aktinobasiloz ile mantarlara bağlı diğer pnömomikozlar takip eder (1,27). Varlığı M.Ö. 5000 yıllarına kadar dayanan, yıllar boyu insanlığın korkulu rüyalarından biri olarak mevcudiyetini sürdüren ve son yıllarda ise yeniden yaygınlaşma eğiliminde olan tüberküloz (11,18,25), sığırlarda genellikle aerojen olarak bulaşır (13,22). Primer lezyon en çok akciğerlerde, özellikle de dorso-kaudal bölgelerinde, tek veya multiple odaklar şeklinde görülür ve daima bölge lenf düğümlerini de etkiler. Enfeksiyon, bronkopnömonide olduğu gibi bronşioler-alveoler bölgelerden başlar ve lobüler yerleşimli, yonca yaprağı görünümünde, multiple odaklar şekillenir (12). Tüberküloz lezyonları bazen de birbirleriyle birleşerek geniş kazeifikasyon nekroz alanları oluştururlar (1,27).

Granülatöz tipte pnömoni tüberkülozdan başka aktinobasiloziste de görülür. Mikotik enfeksiyonlarda granülatöz pnömonilere sebep olurlar. Granülatöz mantar enfeksiyonları arasında aspergilloz, blastomikoz, kriptokokkoz ve koksidioidomikoz sayılabilir. Aktinobasilozisle aerojen enfeksiyonlarda, akciğerde kraniyal loblarda büyümenin yanı sıra yumruk büyüklüğüne varan ve küçük apselerle bezenmiş yumuşak bölgeler görülür. Bunların çevresinde fibröz kapsül bulunur. Hematojen enfeksiyonda ise, multiple miliyer (domuz) veya ceviz büyüklüğünde düğümler meydana gelir. Mikroskopik olarak, ortada ışınal yapıda etkenlerin çevresinde nötrofil lökositler, epiteloid hücreler, dev hücreleri ve lenfositlerden oluşan hücre infiltrasyonları ile bunların çevresinde fibröz kapsül görülür. Mikotik pnömoniler mantarların sebep olduğu pnömoniler olup, hematojen ve solunum yoluyla bulaşır. Mikotik pnömoniler ya fırsatçı (fakültatif patojen) mantar enfeksiyonları, ya da sistemik enfeksiyonlar (obligat patojen mantarlar) sırasında meydana gelirler (1,27). Mantar enfeksiyonları özellikle immunsupresyon ve uzun süreli antibiyotik tedavisinden sonra görülür. Akciğer aspergillozunda miliylerden ceviz büyüklüğüne varan ve büyük olanları belirgin bir fibröz kapsülle çevrili granülomlara rastlanır. *Blastomyces dermatitidis*'in oluşturduğu granülatöz pnömonide makroskopik olarak akciğere serpilmiş halde çok sayıda ve değişen büyüklükte nodüller görülür. Bu nodüller, genellikle sert kıvamlı granülomlar halindeyken, bazen ortalarında irinleşmeye de (piyogranulom) rastlanır. Akciğerdeki bu granülomlara ilaveten genellikle bölgesel lenf düğümlerinde de granülomlara veya kazeifiye odaklara rastlanır. Bu durum, tüberkülozun primer kompleksine benzer. Mikroskopik olarak makrofaj, epiteloid histiyositler, dev hücreler ve az sayıda nötrofil lökositler ile bağ dokudan oluşan granülomlar görülür. Etken, PAS ve methenamine-silver boyama yöntemleriyle ortaya konabilir (1,10,27). *Cryptococcus neoformans*, pnömonisinde makroskopik olarak akciğerlerde çok sayıda, küçük, beyaz renkli ve jelatinöz görünümünde granülomlar vardır. Bu jelatinöz görünümün sebebi, etkenin kapsülündeki mukustur. Mikrosko-

bik olarak çoğunun sitoplazması vakuollü makrofajlar ile lenfosit ve plazma hücrelerinin yanı sıra bol miktarda etkenlere rastlanır. Bazı olgularda epiteloid histiyositler ve dev hücreleri de bulunabilir. Hematoksilen-eozin boyamada etken, boyayı almadığı için bu lezyonların ilk bakışta sabun köpüğü gibi bir görünümü vardır. Etkenin kapsülü, PAS, mucicarmine ve Alcian blue ile iyi boyanır (1,27). *Coccidioides immitis*'in oluşturduğu granülatöz pnömoniyeye akciğer ve bölgesel lenf düğümlerinde rastlanır. Makroskopik olarak akciğerde gri-beyaz renkli, iyi sınırlı granülomlar vardır. Bunların ortasında kazeifikasyon ve bazen irinli erimelere rastlanır. Mikroskopik olarak bu granülomlar, epiteloid histiyositler, dev hücreleri, lenfositler ve nötrofil lökositlerden oluşmuştur. Bu bölgelerde etkenin endosporları (2-5 mikron) veya sporangium'larına (10-70 mikron) rastlanır (1,27). Granülatöz pnömoniyeye sebep olan etkenlerin ve özellikle de Tüberküloz etkeninin kısa ve direk teşhisi bir takım zorlukları içermektedir. Dünyanın çeşitli yerlerinde tüberküloz eradikasyon kampanyalarında intradermal tüberkülin testlerinden faydalanılmıştır. Fakat testin spesifitesi yüksek bulunurken (%98,8), sensitivitesi düşük (%65,6) çıkmıştır. Ayrıca atipik mykobakteriler kros reaksiyonlara da neden olabilir. Deri testlerinin bir diğer dezavantajı da 72 saat lik bir süre sonunda okunabilmesidir (19). Hastalığın mikrobiyolojik teşhisi de kültürlerle yapılabilmektedir. Fakat *M. bovis*'in mikrobiyolojik teşhisi 2-3 ay alabilen oldukça yavaş bir prosedürdür. Bununla birlikte izolatın biyokimyasal identifikasyonu için 2-3 hafta gereklidir. Ayrıca kültürlerin sensitivitesi % 100 değildir. Hatalı negatif kültür sonuçları meydana gelebildiği de bildirilmektedir (19).

Behren ve arkadaşlarının (5) bildirdiğine göre *M. bovis*'in hücre yüzeyinde bir seri önemli zar lipoproteinleri bulunmaktadır. Bu değişken yüzey proteinleri film inhibisyon ve immunofloresan antikor testleri gibi bazı klasik laboratuvar yöntemlerinin duyarlılıklarının azaltabilir. Daha gelişmiş yöntemlerden olan ELISA rutin diyagnostik çalışmalarda önemli bir rolü olmasına rağmen spesifitesi büyük ölçüde kullanılan monoklonal antikora bağlıdır. Çeşitli evcil hayvanlarda (2) yapılan bazı çalışmalarda *M. bovis*'in belirlenmesi amacıyla PCR tekniğinden faydalanılmıştır. Türe özel PCR yönteminin uygulanması tüberkülozun teşhisinde klasik yöntemlerde karşılaşılan problemlerin aşılmasında önemli bir alternatif olarak görülmektedir. (1,27)

Materyal ve Metot

Çalışma materyalini, Adana mezbahanelerinde kesilen değişik yaş ve ırklardan oluşan 5000 baş sığırların, akciğerleri ile mediastinal ve bronşial lenf düğümlerinin muayenesinde bulunan granülatöz lezyonlu dokular oluşturdu. Kesim için getirilen sığırların antemortem muayeneleri yapıp, kesilen sığırların akciğerleri makroskopik olarak muayene edilerek, belirlenen granülatöz lezyonlar önceden hazırlanan akciğer şemaları üzerinde işaretlendi. PCR ve mikrobiyolojik muayeneler için steril kaplara, histopatolojik muayeneler için % 10'luk tamponlu formaline lezyonlu bölgelerden doku parçaları

alınarak tespit edildi. Tespit edilen doku parçaları histopatolojik muayeneler için Luna (20)'ya göre işlenerek 5-6 mikron kalınlığında kesitler alındı. Alınan tüm kesitler Hematoksilen ve Eozin(H.E), Ziehl-Neelsen (ZN), Periodic Acid Schiff (PAS), Brown ve Bren boyama metotlarıyla boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Makroskobik bulgular Canon-400D fotoğraf makinesi, mikroskobik çekimler ise Novel N-800M marka mikroskop kullanılarak yapıldı.

Bakteriyolojik ekimler Collins and Lyne's Microbiological Methods (21) göre yapıldı.

Doku örneklerinden DNA ekstraksiyonu amacıyla HighPure PCR template DNA ekstraksiyon kiti (Roche, Katolog no:11796828001) kullanıldı. DNA izolasyonu için doku örneklerinden 25-50 mg alınarak üzerine 200 µl doku Lysis Buffer ve 40 µl Proteinaz K ilave edildi. Daha sonra 55°C'de 1 saat inkübe edildi. 200 µl Binding Buffer katılarak 70°C'de 10 dakika tekrar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra süspansiyona 100 µl isopropanol eklenerek iyice karıştırıldı. Süspansiyon filtrelü tüplere konularak 8000 rpm 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatat uzaklaştırıldı. Temiz collection tüpün içerisine yerleştirilip 500 µl İnhibitör Removel Buffer ilave edildi ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra iki defa temiz collection tüplerin içerisine yerleştirilip 500 µl Wash Buffer ilave edilerek 800 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. En son aşamada filtrelü tüpler temiz bir eppendorf tüpünün içerisine yerleştirilerek 70 °C ısıtılmış 100 µl Elution Buffer eklenerek 800 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. İzole edilen DNA lar -20 °C de PCR yapılmaya kadar saklandı. DNA miktarı spektrofotometre (ASP-3700) ile 260 ve 280 nm de ölçülerek belirlendi.

Real-time PCR analizlerinde ticari Mycobacterium spp. tespit kiti (Way2Gene; Kat No: WG40-0220-16) kullanıldı. PCR işlemleri kit prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi.

PCR'ın tüm aşamalarında Pozitif kontrol olarak kit içerisinde gelen standartlar kullanıldı. ve negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

PCR Reaksiyon Hacmi;

DNase free Water	: 7,4 µl
FastStart mix	: 2 µl
Mycobacterium genus Primer	: 4 µl
Mg+2	: 1.6 µl
Templeyt	: 5 µl
Toplam Hacim	: 20 µl

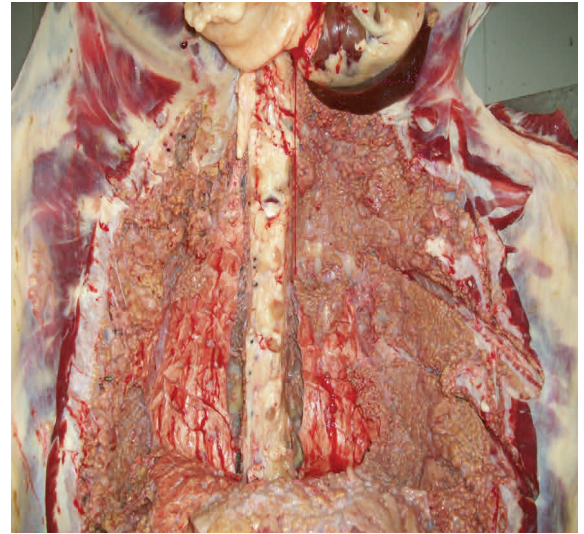
Mycobacterium spp nükleik asitlerinin amplifikasyonları Real Time PCR cihazı (Roche LightCycler 2.0) kullanılarak 95°C 10 dakika inkübasyon takiben 95°C 5 saniye, 64°C'de 5 saniye ve 72°C 40 saniye olacak şekilde 45 döngülük inkübasyon ile gerçekleştirildi.

Mantarın Real-time PCR analizlerinde ticari Fungi tespit kiti (Way2Gene; Kat No: WG40-0270-16) kullanıldı. PCR işlemleri kit prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi. Doku örneklerinden DNA ekstraksiyonu amacıyla, ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep kiti (Kat no: D6005) kulla-

nıldı. Pozitif kontrol olarak kit içerisinde gelen standartlar kullanıldı. *Fungi* ssp nükleik asitlerinin amplifikasyonları Real Time PCR cihazı (Roche LightCycler 2.0) kullanılarak 95°C 10 dakika inkübasyonu takiben 95°C 5 saniye, 55°C'de 10 saniye ve 72°C 20 saniye olacak şekilde 45 döngülük inkübasyon ile gerçekleştirildi.

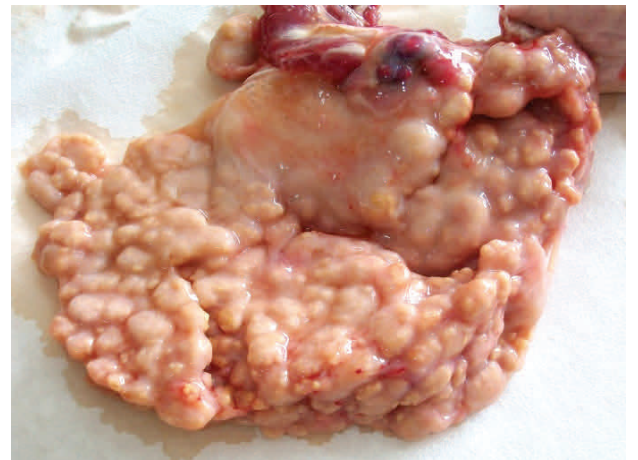
Bulgular

Çalışmada 5000 sığır akciğeri üzerinde yapılan incelemede 38 sığırdan muhtelif pnömoni bulguları olduğu görüldü. Bu olguların 29'unda granümatöz pnömoni, 9 olguda da değişik pnömoni lezyonları birlikte granümatöz pnömoni bulguları tespit edildi. Granümatöz lezyonların çoğu olguda akciğer loplarnın dorsal yüzüne yerleşmiş olduğu görüldü. Akciğer lezyonlarının kapladığı saha vakadan vakaya değiş-



Resim.1: Göğüs boşluğu ve akciğerlerde saptanan yaygın granümatöz lezyonlar

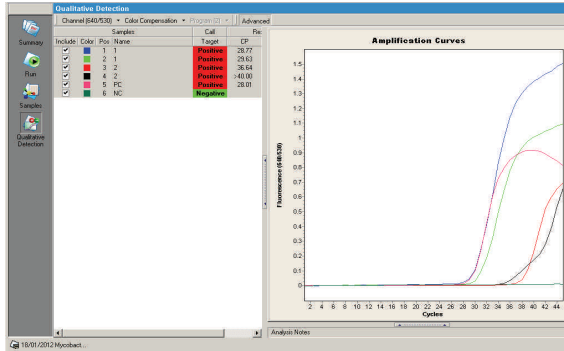
mekle birlikte, polmu dexter'de yoğun, polmu sinister'de ise kısmen az olduğu ve daha çok polmu dexter ve polmu sinister'in caudal loplarna yerleşmiş olduğu görüldü (Resim:1). Bu olgularda akciğer loblarına serpilmiş halde çok sayıda ve değişen büyüklükte nodüller izlendi. Bu nodüller,



Resim. 2: Akciğer kaudal lobunda değişik büyüklükteki protrakatif ve konglomere granülomlar

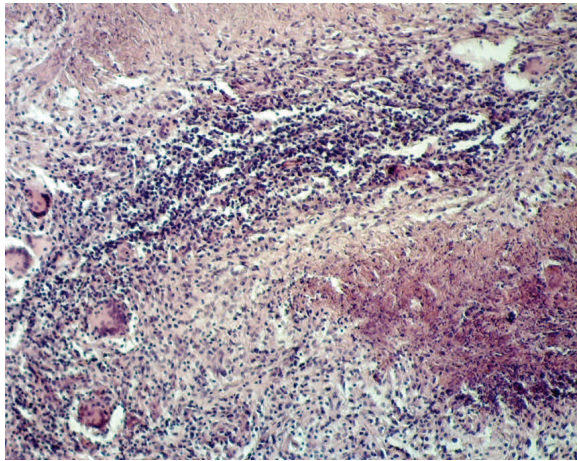
	Patoloji	Real Time PCR	Mikrobiyoloji
Tüberküloz	12	23	-
Mantar enfeksiyonu	5	10	3
Aktinobasillozis	2	-	-
Diğer	3	-	-

Tablo:1 Patoloji, Real Time PCR, Mikrobiyoloji sonuçları



Resim.3: Real time PCR'da tüberküloza ait amplifikasyon

genellikle sert kıvamlı kazeifiye granülomlar halindeyken, bazen ortalarında irinleşmeye de rastlandı. Görünüm itibarıyla



Resim. 4: Akciğer. Tipik bir tüberkülda, ortada kireçlenme, kazeifikasyon nekrozu, çevrede epitelioid, mononükleer ve Langhans tipi dev hücreleri. H.E x20

mercimek büyüklüğünde bazende, birleşerek yaklaşık 1- 4 cm çapında sağlam dokudan belirgin olarak ayrılmış odaklar meydana getirdikleri tespit edildi. Akciğerdeki bu granülomlara ek olarak bazı olgularda mediastinal veya bronşial lenf düğümlerinde de granülomlar, milier veya 4-10 mm çapında değişik sayıda kazeifiye odaklar belirlendi. Bazı olgularda ise lenf düğümlerinin oldukça büyüdüğü, ortasının tamamen kireçlen

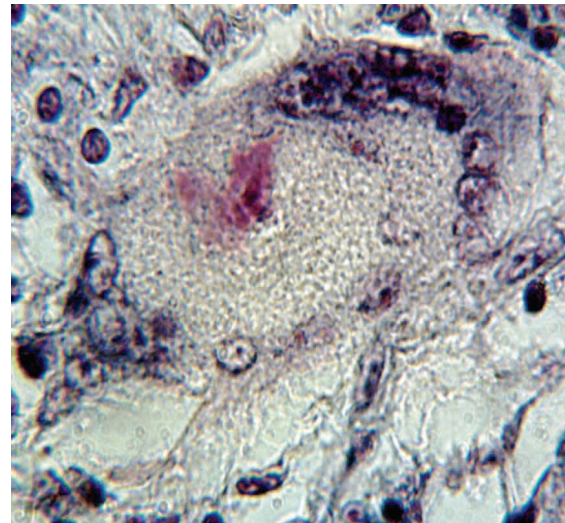
diği ve lenfoid odakların gözden kaybolmuş olduğu tespit edildi. Kimi numunelerde bronş ve bronşiol boşluklarının irinli-nekrotik bir kitle ile dolduğu ve bu yüzden tıkanıklık, volvüler genişleme ve duvarlarının şekil bozukluğuna uğradığı görüldü. Bazen bu yapıların çevresinde de granülomlar olduğu gözlemlendi (Resim: 2). Akciğer de granülom gözlenen vakaların çoğunda parietal pleurada farklı büyüklükte granümatöz odaklar görüldü.

Mikroskopik muayenelerde GP belirlenen 38 akciğerin (Resim:4) Ziehl Neelsen boyamalarında 12 tanesinde ARB (+) boyanan basillere rastlandı (Resim:5). Yine yapılan mantar boyamalarında 5 akciğerde mantar hifaları tespit edildi. Hazırlanan kesitlerinin Brown Bren boyamalarında makroskopik olarak GP belirlenen akciğerlerin 14 tanesinde Gr(+) boyanma alanları belirlenirken, aktinobasillozis olarak değerlendirilen olguların 2 tanesinde de gram pozitif boyanma alanları belirlendi (Tablo 1).

Aktinobasillozis olarak belirlenen akciğerlerden hazırlanan H.E boyalı preparatların mikroskopik incelemesinde, ortada yer alan ışınal yapıdaki etkenlerin çevresinde nötrofil lökositler, epitelioid hücreler, dev hücreleri ve lenfositlerden oluşan hücre infiltrasyonları ile bunların çevresinde fibröz kapsülün bulunduğu belirlendi. Yine pnömomikoz olarak teşhis edilen akciğerlerde mikroskopik olarak, epitelioid histiyositler, dev hücreleri, lenfositler ve nötrofil lökositlerden oluşan ve ortalarında irin bulunan granülomlar belirlendi.

Real time incelemesinde, mezbahalarda kesilen 5000 sığırdan 38 adet GP tespit edilen vakaların akciğer ve lenf yumrularından hazırlanan ekstratlardan 23'ünde (%60)' Tb, 10'nunda (%38)' pnömomikozu ait amplifikasyon görüldü. 5 (%2) numunede ise herhangi bir amplifikasyon tespit edilmedi (Resim: 3).

Yapılan bakteriyolojik ekimlerde tüberküloz'a ve aktinobasilloz'a ait üreme olmamıştır. Ancak yapılan mikrobiyolojik ekimlerde 3 adet mantar, üretilmiştir.



Resim. 5: Akciğer dokusu kesiti, tüberküloz basilleri. Ziehl-Neelsen boyama (X100)

Tartışma ve Sonuç

Adana mezbahanelerinde farklı yaş ve türde kesilen sığırların akciğerlerin %0,74'de granüloma ait bulgular görülmüştür. Bulunan oran, Ortatalı ve ark (21)'nin Konya yöresinde yaptıkları çalışmadan elde ettikleri sonuçtan düşük olup, kesilen sığırların %1,30'nda GP' ye ait bulgular olduğunu bildirmişlerdir. Bu oranların yüksek olması GP'in solunum sistemi hastalıklarında önemli olduğu bildirimlerini (1,27) desteklemektedir.

GP neden olan hastalıkların başında tüberkülozun olduğu bunun yanında aktinomikoz ile mantarlarında GP oluşumunda önemli yer tuttukları bildirilmektedir (1,27). Ortatalı ve ark (22) Konya yöresinde yaptıkları çalışmada GP tespit ettikleri vakaların, 45 (% 85)'inin Tb, 6 (% 11.3)'inin aktinobasiloz ve 2 (% 3.7)'inin pnömomikoza ilgili olduğunu belirtmişlerdir. Adana yöresinde yapılan çalışmada GP tespit edilen vakaların % 60'ı tüberküloz, % 05,4'ü Aktinobasiloz, % 38'i mantar olarak belirlendi.

Yapılan çalışmada Adana yöresinde incelenen akciğerlerin % 0.4' ü tüberküloz yönünden pozitif bulunmuştur. Tüberküloz hayvan ve insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen, akciğer, diğer organ ve dokularda kazeöz kazeökalserez karakterde tüberküllerin oluşması ile beliren kronik, bulaşıcı ve zoonotik bakteriyel bir hastalıktır. Etkeni mycobacterium genusuna bağlı bakterilerdir. *Mycobacterium tuberculosis* insan, *Mycobacterium bovis* sığır ve *Mycobacterium avium* kanatlı kökenli tüberkülozun başlıca etkenleridir (30). Tüberküloz OIE (Office Internationaldes Epizooties) göre B listesinde yer almaktadır. Tüberküloz evcil hayvanlarda en sık sığırlarda görülmekle birlikte domuz, köpek, kedi, kanatlılar ve doğal yaşamda birçok yabani hayvanda görülebilir. M. bovis insanlara aerosol yolla veya kontamine süt ve/veya süt ürünlerinin tüketimi yoluyla bulaşabilmektedir. Ayrıca pulmoner tüberkülozlu insanlar etkenleri sağlıklı sığırlara bulaştırabilmektedirler. Gelişmekte olan ülkelerde insanlarda M. bovis kaynaklı Tb vakaları, insan Tb vakalarının %10'unu oluşturmaktadır (8). OIE verilerine göre Türkiye Tb hastalığının görüldüğü ülkeler arasında yer almaktadır. Bulunan %0,4 lük tüberküloz oranı bölge ve ülke hayvancılık yetiştirme sistemleri ve kesim şartları açısından değerlendirildiğinde halk sağlığını da ilgilendiren önemli bir konu olduğunu ortaya çıkmaktadır.

Türkiye'de sığır Tb'u ile ilgili çalışmalar 1900'lü yılların başında başlamıştır ve hastalığın insidensi hakkında sağlıklı bir veri bulunmamaktadır (24,31). Kayseri bölgesinde BACTEC radyometrik metodu kullanarak yapılan çalışmada, M. bovis'i saptamada bu testin hızlı ve duyarlı bir tanı yöntemi olduğu belirtilmiş ve bu bölgede sığır Tb'unun prevalansı %1.49 olarak saptanmıştır (15). Van bölgesindeki hayvanlardan alınan burun akıntısı ve süt örneklerinin PCR yöntemi ile incelenmesi sonucu, burun akıntısı örneklerinin 3 tanesinde, süt örneklerinin ise 1 tanesinde pozitiflik bulunmuştur (24). Ünver ve ark (28) klasik PCR ile yaptıkları çalışmada Kars yöresinde M. bovis spesifik DNA'nın % 6.6 gibi büyük bir

oranda gözlemediğini vurgulamışlardır. Yine Kars bölgesinde yapılan farklı bir çalışmada bu oranın %0.9 olduğu bildirilmiştir. (29). Bu farklılığın PCR tekniğinin tüberküloz teşhisinde ki başarısına bağlı olduğu ifade edilmiştir (28). Yardımcı ve ark (32) Real Time PCR optimize çalışmasında ekstrasyon aşamasının önemini vurgulayarak, lenf düğümlerinden alınan örneklerde real time PCR tekniğini başarı ile uygulamışlardır. Bu çalışmada otuzsekiz GP olgusunda tüberküloz yönünden yapılan mikrobiyolojik kültürde etkene rastlanmamıştır. Tüberkülozun teşhisinde altın standart kültürdür. Ancak bu yöntem oldukça uzun zaman almaktadır. İdentifikasyon için biyokimyasal testlere ihtiyaç duyulmakta ve laboratuvar şartlarında biyolojik tehlike oluş turmaktadır. Sığır tüberkülozlu dokular çok az etken içerirler, bunun yanında etken kazeifiye olmuş lenf yumruları ya da daha ileri durumlarda akciğer ve diğer organlarda kazeifiye ya da kalsifiye bir tabaka ile kontrol altında tutulmaktadır (29). Allerjik ve serolitik testler ise sensitivite ve spesifisite ile ilgili problemleri beraberlerinde getirmektedirler (9,30). PCR yönteminin uygulanmasının klasik yöntemlerde karşılaşılan problemlerin aşılmasında alternatif bir yöntem olabileceği, hızlı ve güvenilir sonuçlar alındığı için epidemiyolojik çalışmalarda ve hastalığın kontrolünde önemli bir yer tuttuğu kanısındayız. Yapılan çalışmada bulunan tüberküloz oranı ile farklı bölgeler ve yıllarda bulunan oranlar karşılaştırıldığında düşük olduğu görülmektedir. Bu da tüberküloz eğitimlerinin ve eradikasyon çalışmalarının bir sonucu olabilir

Aktinobasilozun etkeni Gram negatif özellikteki bakteri olup, nadiren akciğerlerde de granümatöz lezyonlara neden olduğu bildirilmiştir (16). Makroskobik olarak sülfür granüllerinin bulunması, sarımsı renkte piyojenik yapısı nedeniyle farklılık gösterebilecek farklı tekniklerde bakılmasının gerektiği vurgulanmıştır (21). Makroskobik olarak 38 GP vakasının, histopatolojik boyamalarında aktinobasilozdan şüphelenilen 2 vakada gram boyamada kırmızı renkte etkenin görülmesi ve bu vakaların Real time PCR tekniğinde tüberküloz ve mantara ait etkene özgü sipesifik DNA'ların ampliyasyonu olmaması, real time PCR ayırıcı teşhiste önemli olduğunu göstermiştir.

Araştırmada çalışılan 38 GP olgusunda histolojik boyama ve PCR tekniğinde 10 (%) adet mantar olgusu tespit edilmiştir. Bazı yazarlar (21,27) sığırlarda mikotik pnömoneilerin önemsenecek düzeyde olmadığını bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada bu oranın yüksek olduğu, tespit edilmiştir. Bazı mantarların zoonoz, akut bazılarının kronik organ hastalıkları yaptıkları, diğer bazılarının zehirlenmelere, bir kısmının da neoplastik değişimlere yol açtığı bilinmektedir. Mantar enfeksiyonlarının yüksek oranda görülmesi hayvan sağlığı açısından önemle üzerinde durulması gereken bir nokta olarak görülmekle birlikte konunun, gün geçtikçe büyük bir önem kazanacağı kanısındayız

Bu çalışmada GP benzeri lezyon gösteripte Tüberküloz aktinobasiloz ve mantar yönünden PCR neagatif bulunan 3 vakada, yazarların bildirdiği gibi (28) GP dokularının

piyojen başka mikroorganizmalar içermesi ihtimali düşünülmektedir.

Teşekkür

Çalışmanın yürütülme aşamasında gösterdikleri katkıdan dolayı Adana Veteriner Kontrol Enstitü Müdürlüğü Çalışanları ile Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne teşekkür deriz.

Kaynaklar

1.Alibaşoğlu, M. ve Yeşildere, T. (1988) Veteriner Sistemik Patoloji. Cilt i, 207-262.

2.Aranaz, A, Liebana, E., Pickering, X. Novoa, C., Mateos, A, Dominguez, L. (1996) Use of Polymerase Chain Reaction in the diagnosis of tuberculosis in cats and dogs. Veterinary Record, 138, 276-280.

3.Auer, L. A (1987) Assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of cattle infected with Mycobacterium bovis. Australian Veterinary Journal. 64, 172-176.

4.Bascunana, C. R, Belak, K. (1996) Detection and identification of mycobacteria in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested PCR and restriction enzyme analysis. J. Clin. Microbiol, 34, 2351-2355.

5.Behrens, A, Poumarat, F., Le Grand, D., Heller, M. and Rosengarten, R (1996) Microbiology 142, 2463.

6.Beytut E(2001): Kars ili ve yöresinde sığırlarda tüberküloz insidensi ve lezyonların lokalizasyonu üzerine patolojik incelemeler. Kafkas Üniversitesi Vet. Fak. Derg. 7 (1):15- Controversy. J. Comp. Path. 99, 357-399.

7.Collins C.H, Lyne P.M, GrungeJ.M, FalkinhomJ.O, (2004) Collins and Lyne's Microbiological Methods. 8 ed. Oxford Press London.

8.Cosivi O, Grange JM, Da Born CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huzermeyer HF, de Kantor I, Melsin FX (1998) Zoonotic tuberculosis due to Mycobacterium bovis in developing countries. Emerg Infect Dis, 4, 59-70.

9.De la Rua-Domenech R, Goodchild A T, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS (2006) Antemortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. Res Vet Sci, 81, 190-210.

10.Diker, F. (1989a). Bursa yöresinde çeşitli ırk sığırlarda görülen tüberküloz lezyonlarının organlara dağılışı ve histolojik yapıları. Pendik Hayv. Hast. Merk. Araşt. Enst. Derg., XX 47 (2),78-94.

11.Diker, F. (1989b). Tüberkülozun dünü ve bugünü. Vet.Hek.Dern.Derg., 59 (3-4), 32-36.

12.Dungworth, D.L. (1985). The Respiratory System. In "Pathology of Domestic Animals" Ed by K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy and N. Palmer, Vol. 2, 3rd ed, 413-556, Academic Press, London.

13.Francis, J. (1972). Route of infection in tuberculosis. Aust.Vet.J., 48, 578.

14.Glennon, M., Jager, B., Dowdall, D., Maher, M., Dawson, M., Quigley, F., Costello, E, Smith, T. (1997) PCR-based fingerprinting of Mycobacterium bovis isolates. Vet Microbiol, 1997, 54, 235-245.

15.Gümüşsoy K.S., Atasever A, Aydın F, (2007). Prevalence of tuberculosis in cattle in Turkey. Medycyna Wet. 63(3): 305-308.

16.Gyles. C.L and Thoen, C.Q. (1993). Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 2nd ed, 331

pp. Iowa State University Press. Ames

17. Hanna, J. ve ark (1992) Molecular Epidemiology of M. bovis in Texas and Mexico. Journal of Clinical Microbiology, 34, 2066-2071.

18.Köküöz A., (1996). 1995 Dünya Sağlık Raporu'ndan. TÜBİTAK Bilim ve Teknik Derg., 29, 36-37.

19.Liebana E, Aranaz, A, Mateos, AVilafranca, M.Gomez,E et al (1995) Simple and Rapid Detection of M. tuberculosis Complex Organism in Bovine Tissue Samples by PCR Journal of Clinical Microbiology, Jan, 33-36.

20.Luna, L.G. (1968). Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed, McGraw-Hill Book Company, New York.

21.Ortatah, M.,Çiftçi M.K., Tuzcu M.,(1998) Sığırlarda Tüberküloz ve Diğer Granülatöz pnömoniler Üzerinde Patolojik İncelemeler Vet. Bil. Derg14,2:139-150. Pathology. pp.391-441, The Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.

22.Pritchard, D.G. (1988) A century of bovine tuberculosis 1888-1988: Conquest and reaction. Vet Microbiol, 43, 1995.

23.Rothel, J. S., Jones, S. L., Corner, L. A, Cox, J. C., and Wood, P. R (1992) The gamma interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. Australian Veterinary Journal. 69,1-4.

24.Solmaz H., İlhan Z., Aksakal A., ve ark. (2006) Van Bölgesinde Sığır tüberkülozunun polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile saptanması. VI. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı).. Side-Antalya.) (26-28 Eylül 2006)

25.Thoen, C.O. (1988) Tuberculosis. JAVMA, 193 (9), 1045-1048.

26.Tizard, i. (1982) Serologic assays. , B. J., Collins, D. M., de Lisle, G. W. (1995) Detection of Mycobacterium bovis in tissues by polymerase chain reaction. JAVMA. 181, 1162-1165

27.Urman, H.K. (1983) Evcil Hayvanların Özel Patolojik Anatomisi. Cilt i, A.Ü. Vet. Fak.Yay. Basımevi, Ankara.

28.Ünver A., Atabay İ.H., Güneş V., Çitil M., Erdoğan H.M., (2007). Kars Yöresinde Sığır Tüberkülozunun Yaygınlığının PCR ile belirlenmesi Kafkas Üniv Vet Fak Derg 13 (1): 27-31.

29.Wards BJ, Collins DM, de Lisle GW (1995) Detection of Mycobacterium bovis in tissues by polymerase chain reaction. Vet Microbiol, 43, 227-240.

30.Waters WR, Thacker TC , Greenwald R, Esfandiari J , Lyashchenko KP (2006) Effects of different tuberculin skin-testing regimens on gamma interferon and antibody responses in cattle experimentally infected with Mycobacterium bovis. Clin Vaccine Immunol, 13, 387-394.

31.Yardımcı H. Tüberküloz. www.tvhb.org.tr/bilimsel/

32.Yardımcı H., Ünal C.B., (Kökü) Ataseven L., Sareyyüpoğlu B., (2007) Sığır tüberkülozunun PCR ile tanısı ve Mycobacterium bovis'in spoligotiplendirme yöntemi ile genotiplendirilmesi Ankara Üniv Vet Fak Derg, 54, 183-189.