

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOĞAL SIĞIR TÜBERKÜLOZU'NDA AKCİĞER VE İLGİLİ**  
**LENF DÜĞÜMLERİNDEKİ GRANÜLOMLARIN**  
**PATOMORFOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL YAPISI**

**Özgür ÖZÖNER**

**PATOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Sevil ATALAY VURAL**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri**  
**Koordinatörlüğü'nün 19L0239006 proje numarası ile desteklenmiştir**

**ANKARA**  
**2022**

## ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum, “Doğal Sığır Tüberkülozu’nda Akciğer ve İlgili Lenf Düğümlerindeki Granülomların Patomorfolojik ve İmmunohistokimyasal Yapısı” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Özgür ÖZÖNER

Tarih: 04.07.2022

İmza:

## KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Patoloji Anabilim Dalı'nda Özgür ÖZÖNER tarafından hazırlanan “Doğal Sığır Tüberkülozu’nda Akciğer ve İlgili Lenf Düğümlerindeki Granülomların Patomorfolojik ve İmmunohistokimyasal Yapısı” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04.07.2022

Prof. Dr. Rıfki HAZIROĞLU  
Ankara Üniversitesi  
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Mehmet HALIGÜR  
Çukurova Üniversitesi  
Raportör

Prof. Dr. Sevil ATALAY VURAL  
Ankara Üniversitesi  
Üye (Danışman)

Prof. Dr. Aslan KALINBACAK  
Ankara Üniversitesi  
Üye

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN  
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi  
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xii
Çizelgeler	xvi

<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Tarihçe	1
1.2. Sığır Tüberkülozu	3
1.2.1. Sığır Tüberkülozunun Etiyolojisi	3
1.2.2. Sığır Tüberkülozunun Yayılması	6
1.2.3. Sığır Tüberkülozunun Epidemiyolojisi	6
1.2.4. Sığır Tüberkülozunun Bulaşma ve Patogenezi	8
1.2.4.1. Aerojen (Damlacık) Enfeksiyonu	9
1.2.4.2. Alimenter Enfeksiyon	11
1.2.4.3. İntrauterin ve Koital Enfeksiyon	13
1.2.4.4. Klinik Bulgular	14
1.2.4.5. Makroskobik Bulgular	14
1.2.4.6. Mikroskobik Bulgular	15
1.3. Diğer Hayvan Türlerinde <i>Mycobacterium bovis</i>	16
1.3.1. Koyun ve Keçilerde <i>Mycobacterium bovis</i> Enfeksiyonu	16
1.3.2. Domuzlarda <i>Mycobacterium bovis</i> Enfeksiyonu	17
1.3.3. Mandalarda <i>Mycobacterium bovis</i> Enfeksiyonu	17
1.3.4. Develerde <i>Mycobacterium bovis</i> Enfeksiyonu	17
1.3.5. Geyiklerde <i>Mycobacterium bovis</i> Enfeksiyonu	18
1.4. Tüberküloz Hastalığına Karşı Alınan Önlemler	18
1.5. Tüberkülozun Teşhisi	19

1.5.1. Mendel-Mantoux Testi	19
1.5.2. Nekropsi ve Mikroskopik İncelemeler	21
1.5.3. Ziehl-Neelsen Boyaması	21
1.5.4. İmmunohistokimyasal İncelemeler	21
1.5.5. Interferon $\gamma$ Testleri	22
1.5.6. Lenfosit Proliferasyon Testleri	23
1.5.7. Mikrobiyolojik Kùltürler	23
1.5.8. Nùkleik Asit Tanıma Teknikleri	24
1.5.9. <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> Kompleks Enfeksiyonlarının Tanısında Kullanılan Sitokinler	24
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>28</b>
2.1. Materyal	28
2.2. Çalışmada Kullanılan Belirteçler ve Kitler	28
2.3. Yöntem:	29
2.3.1. Makroskopik İncelemeler	29
2.3.2. Histopatolojik İncelemeler	30
2.3.2.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması	30
2.3.2.2. Ziehl Neelsen Boyaması	33
2.3.3. İmmunohistokimyasal İncelemeler	33
2.3.3.1. İmmunoperoksidaz Boyama	33
2.3.3.2. Konfokal Mikroskopi İncelemeleri	35
2.3.4. Morfometrik İncelemeler	36
2.3.5. İstatistiksel İncelemeler	36
<b>3. BULGULAR</b>	<b>37</b>
3.1. Makroskopik Bulgular	37
3.2. Mikroskopik Bulgular	45
3.2.1. Prodùktif Tùberküloz	45
3.2.2. Primer Odak	45
3.2.2.1. Akciğerler	46
3.2.2.2. Mediastinal Lenf Dùğümleri	50

3.2.3. Primer Kompleks	52
3.2.3.1. Akciğerler	52
3.2.3.2. Mediastinal Lenf Düğümleri	59
3.2.4. Tam Olmayan Primer Kompleks	64
3.2.4.1. Akciğerler	64
3.2.4.2. Mediastinal Lenf Düğümleri	67
3.2.5. Eksudatif Lezyonlar	75
3.2.6. Ziehl Neelsen Boyaması Bulguları	75
3.3. İmmunohistokimyasal Bulgular	77
3.3.1. <i>Mycobacterium bovis</i> Antikoru	77
3.3.2. Toll-like Receptor 4 Antikoru	81
3.3.3. CD3 Antikoru	83
3.3.4. CD119 Antikoru	85
3.3.5. Interleukin-4 Antikoru	87
3.3.6. Interleukin-17 Antikoru	88
3.3.7. Lambda Chain Antikoru	90
3.3.8. TNF- $\alpha$ Antikoru	92
3.4. Konfokal Mikroskopi Bulguları	94
3.5. Morfometrik İncelemeler	96
3.5.1. CD3 Antikoru Sayımı	96
3.5.2. CD119 Antikoru Sayımı	97
3.5.3. Interleukin17 Antikor Sayımı	97
3.5.4. Lambda Chain Antikor Sayımı	98
3.5.5. TLR4 Antikoru Sayımı	99
3.5.6. TNF- $\alpha$ Antikor Sayımı	100
3.6. İstatistiksel Bulgular	101
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>104</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>118</b>
<b>ÖZET</b>	<b>122</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>123</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>124</b>
<b>EKLER</b>	<b>138</b>

Ek-1. Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'ndan alınan etik kurul kararı.	138
Ek-2. T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'ndan alınan çalışma izni.	139
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.



## ÖNSÖZ

Sığır tüberkülozu önemli oranda ekonomik kayıplara sebep olan zoonoz bir hastalıktır. Ekonomik kayıplara neden olmasının yanında, diğer memeli hayvanlara ve insanlara bulaşabilmesi nedeniyle önem arz etmektedir. Hastalığın genel bulaşma yolu aerojen olmasına rağmen, daha az sıklıkla enfekte et, süt, ekipmanla, koitusla ve intrauterin bulaşma ile yayılan hastalığın, yapılan eradikasyon çalışmalarıyla bazı ülkelerde önüne geçilmiş olmasına rağmen, özellikle gelişmekte olan ülkelerde büyük bir sağlık sorunudur. Nitekim Dünya Hayvan Sağlığı Organizasyonu tarafından hastalık etkeni olan *Mycobacterium bovis*'in, III. seviye biyogüvenlik gerektiren bir organizma olduğu bildirilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu ve Dünya Hayvan Sağlığı Organizasyonu daimî olarak birlikte hareket ederek dünyada hastalıktan korunma, tedavi ve eradikasyon hakkında ortak bir yol haritası belirlemektedirler. Hatta bu kuruluşlar 2030 yılına kadar tüberküloz hastalığının %80 azaltılmasını planlamaktadırlar. Buna ek olarak 2017 yılında G20 Forumu liderleri hastalıkla ilgili araştırma ve geliştirme ihtiyacı ile antimikrobiyal direncin üstesinden gelmek amaçlarıyla Tek Sağlık yaklaşımı çağrısında bulunmuşlardır. Bu amaçlarla yayınlanan yol haritasında 10 öncelikten biri de bilimsel kanıt temelini geliştirilmesidir. Bilimsel kanıt temelini ana başlıkları altında da teşhisin doğru konulması ve araştırmalarda boşlukları doldurmak konuları bulunmaktadır. Yapılan tez çalışmasında da doğal sığır tüberkülozunda görülen tüberkül yapılarının oluşumunda etkili mekanizmaların makroskobik, histopatolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle ortaya koyulması planlanmaktadır.

Bu çalışmanın yürütülmesinde değerli yardımlarını gördüğüm, çalışma konusunu incelemem için bana veren, çalışmalarım süresince her türlü yardımlarını esirgemeyen, kaynak ve yöntem açısından bana sürekli yol gösteren, bilgilerini benimle paylaşan, bilgi ve önerilerinden yararlandığım ve ilerleyen meslek hayatımda yararlanacağımı düşündüğüm Hocam ve doktora tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Sevil ATALAY VURAL'a, Patoloji Anabilim Dalı Başkanı ve tez izleme komitesinden Prof.

Dr. Rıfıkı HAZIROĞLU'na, tez izleme komitesinden İç Hastalıklar Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Aslan KALINBACAK'a, Anabilim Dalımız öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Osman KUTSAL'a, Dr. Öğr. Üyesi Gözde YÜCEL TENKEKİ'ye, Dr. Öğr. Üyesi Arda Selin TUNÇ'a, Anabilim Dalımız öğretim elemanlarından Dr. Ozan AHLAT'a, Araş. Gör. Oya Burçin DEMİRTAŞ'a, Harran Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim elemanı Dr. Kürşat FİLİKÇİ'ye, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse'dan Dr. Yanad Abou MONSEF'e, Anabilim Dalımız teknisyeni Habibe DÖNMEZ'e ve sekreteri Lale BARAN'a, materyal toplamada ve *M.bovis* antikorunun temininde yardımcı olan Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Patoloji Laboratuvarı personeli Dr. Yavuz ULUSOY'a ve Vet. Hek. Bahadır KILINÇ'a, mali destek sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü ve Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Kurum Koordinasyon Birimi'ne, kadromun bulunduğu Siirt Üniversitesi Rektörlüğü ve Veteriner Fakültesi Dekanlığı'na teşekkür ederim.

Ayrıca benden desteklerin hiçbir zaman esirgemeyen annem Birsen DÖŞLÜOĞLU'na ve değerli eşim Araş. Gör. Merve PEKİNCE ÖZÖNER'e teşekkürlerimi sunarım.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ABC-P	Avidin-Biotin Complex Peroxidase
AraLAM	Ara-binosylated LipoArabinoMannan
AEC	3-Amino-9-EthylCarbazole
AM	ArabinoMannan
APES	3-AminoPropyltriEthoxySilane
BALT	Bronchus-Associated Lymphoid Tissue
BCG	Bacille Calmette-Guérin
bTB	bovine Tuberculosis
CCL	Chemokine (C-C motif) Ligand
CD	Cluster of Differentiation
DAPI	4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole
DC	Dendritic Cell
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FAO	Food and Agriculture Organization
HE	Hematoksilen-Eozin
IF	ImmunoFloresans
IFNGR	InterFeroN-Gamma Receptor
IFN- $\gamma$	InterFeroN-gamma
IL	InterLeukin
LAM	LipoArabinoMannan
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
ManLAM	Man-nose capped LipoArabinoMannan
MHC	Major Histocompatibility Complex
MÖ	Milattan Önce
MBP	Myelin Basic Protein
MTBC	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i> Complex
NK	Natural Killer
KA	Kontrol-Akciğer
KL	Kontrol-Lenf düğümü
LM	Lipomannan
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PKA	Primer Kompleks Akciğer
PKL	Primer Kompleks Lenf düğümü
PPD	Purified Protein Derivative of Tuberculin
POA	Primer Odak Akciğer
POL	Primer Odak Lenf düğümü

<i>sp.</i>	species
TB	Tüberküloz
Th	T helper
TLR	Toll-Like Receptor
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor-alpha
TOPKA	Tam Olmayan Primer Kompleks Akciğer
TOPKL	Tam Olmayan Primer Kompleks Lenf düğümü
WHO	World Health Organization
WOAH	World Organization for Animal Health
ZN	Ziehl-Neelsen



## ŞEKİLLER

Şekil 1.1. <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> 'te bulunan etkenlerin hücre duvarının şematize yapısı	5
Şekil 1.2. Dünya'da sığır tüberkülozunun varlığı	7
Şekil 1.3. Türkiye'de sığır tüberkülozunun varlığı	8
Şekil 1.4. Aerojen ve alimenter enfeksiyonda hastalığın patogenezi	12
Şekil 1.5. Koital ve intrauterin enfeksiyonda hastalığın patogenezi	13
Şekil 2.1. Mikroskobik olarak prodüktif lezyonlar ve evrelendirme kriterleri	32
Şekil 3.1. Makroskobik incelemelerde saptanan prodüktif ve eksudatif lezyonlar	37
Şekil 3.2. Yüzeiden taşkın tüberküller, akciğer	38
Şekil 3.3. Milier ve nodüler tüberküller ve kesit yüzleri, akciğer	39
Şekil 3.4. Yüzeiden taşkın, karnabahar görünümünde tüberküller, akciğer	40
Şekil 3.5. Yüzeiden taşkın tüberküller (beyaz daire) ve birinin kesit yüzü kesit yüzü (beyaz ok), mediastinal lenf düğümü	41
Şekil 3.6. Tüberküllerin kesit yüzü, mediastinal lenf düğümü	41
Şekil 3.7. Tüberkülün kesit yüzünden sızan sarı-yeşil renkli irin, mediastinal lenf düğümü	42
Şekil 3.8. Yüzeiden taşkın tüberküller (beyaz daire) ve konglomere tüberküllerin kesit yüzü (beyaz oklar), akciğer ve mediastinal lenf düğümü	43
Şekil 3.9. İnterkostal kaslarda yüzeiden taşkın tüberküller, toraks	44
Şekil 3.10. I. Evre granülom, primer odak, akciğer, (A) x100, (B) x400, HE	46
Şekil 3.11. II. Evre granülom, Primer odak, akciğer, (A) x50, (B) x200, HE	47
Şekil 3.12. III. Evre granülom, primer odak, akciğer, (A) x100, (B) x400, HE	48
Şekil 3.13. IV. Evre granülom, primer odak, akciğer, (A) x100, (B) x400, HE	49
Şekil 3.14. Lenf foliküllerinde lenfoid hücrelerde azalma, primer odak, mediastinal lenf düğümü, x100, HE	51
Şekil 3.15. I. Evre granülom, primer kompleks, akciğer, x200, HE	52
Şekil 3.16. I. Evre granülomlar, primer kompleks, akciğer, x200, HE	53
Şekil 3.17. II. Evre granülom, primer kompleks, akciğer, x100, HE	54
Şekil 3.18. II. Evre granülom, primer kompleks, akciğer, x200, HE	54

<b>Şekil 3.19.</b> III. Evre granülom, primer kompleks, akciğer, (A) x100, (B) x200, HE	55
<b>Şekil 3.20.</b> III. Evre granülom ve I. Evre granülom (ok), primer kompleks, x100, HE	56
<b>Şekil 3.21.</b> IV. Evre granülom, primer kompleks, akciğer, x50, HE	57
<b>Şekil 3.22.</b> IV. Evre granülom, primer kompleks, akciğer, x200, HE	57
<b>Şekil 3.23.</b> II. Evre granülom, primer kompleks, mediastinal lenf düğümü, x200, HE	59
<b>Şekil 3.24.</b> II. Evre granülom, primer kompleks, mediastinal lenf düğümü, x400, HE	60
<b>Şekil 3.25.</b> III. Evre granülom, primer kompleks, mediastinal lenf düğümü, x50, HE	60
<b>Şekil 3.26.</b> III. Evre granülom, primer kompleks, mediastinal lenf düğümü, x200, HE	61
<b>Şekil 3.27.</b> IV. Evre granülom, primer kompleks, mediastinal lenf düğümü, x50, HE	62
<b>Şekil 3.28.</b> Bronşiyol ve alveol lumenlerinde nötrofil lökosit infiltrasyonu, akciğer, (A) x200, (B) x400, HE	65
<b>Şekil 3.29.</b> II. Evre granülom, tam olmayan primer kompleks, mediastinal lenf düğümü, x100, HE	67
<b>Şekil 3.30.</b> III. Evre granülom, tam olmayan primer kompleks, mediastinal lenf düğümü, x100, HE	68
<b>Şekil 3.31.</b> IV. Evre granülom, tam olmayan primer kompleks, mediastinal lenf düğümü, (A) x100, (B) x200, HE	69
<b>Şekil 3.32.</b> Dev hücresi oluşumları, x400, HE	71
<b>Şekil 3.33.</b> Tüberkül yapısında farklı morfolojik görünümdeki dev hücreleri, x200, HE	72
<b>Şekil 3.34.</b> Tipik Langhans tipi dev hücreleri, x400, HE	72
<b>Şekil 3.35.</b> Sitoplazmasında fagosite edilmiş materyal bulunan (siyah daire 2x yakınlaştırma) Langhans tipi dev hücresi, x200, HE	73
<b>Şekil 3.36.</b> Sitoplazmasında fagosite edilmiş hücre (siyah daire, 2,5x yakınlaştırma) bulunan yabancı cisim dev hücresi, x200, HE	73
<b>Şekil 3.37.</b> Yabancı cisim dev hücreleri (oklar), (A) x200, (B) x400, HE	74

<b>Şekil 3.38.</b> Yabancı cisim dev hücreleri, (A) x100 (daire x2 yakınlaştırma), (B-C) x200, HE., Nekroz alanında bulunan etken immupozitifliği, (D) x1000, ABC-P	74
<b>Şekil 3.39.</b> Tüberküllerde serbest asit-fast etkenler, mediastinal lenf düğümü, x200, ZN	76
<b>Şekil 3.40.</b> Makrofaj sitoplazmasında görülen asit-fast etkenler (x2,5 yakınlaştırma), mediastinal lenf düğümü, x400, ZN	76
<b>Şekil 3.41.</b> Primer odak lenf düğümlerinde makrofaj sitoplazmasında görülen etkenler (A) 400x, (B-D) 1000x, ABC-P	78
<b>Şekil 3.42.</b> Nekrotik alanlarda ve periferinde (oklar); makrofajlarda immunopozitif etkenler (kısa oklar), Mediastinal Lenf düğümü, x100, ABC-P	78
<b>Şekil 3.43.</b> Nekroz alanında serbest etkenler, Akciğer, x1000, ABC-P	79
<b>Şekil 3.44.</b> Dev hücrelerde görülen etken immunopozitiflikleri, mediastinal lenf düğümü, (A) x400, (B) x1000, ABC-P	79
<b>Şekil 3.45.</b> Alveol epitellerinde ve/veya alveol lümenlerde etken immunopozitiflikleri, akciğer, (A-B) x400, ABC-P	80
<b>Şekil 3.46.</b> Bronşiyol epitellerin apikal uçlarında (oklar) ve eksudattaki makrofajlarda etken immunopozitiflikleri, akciğer, x400, ABC-P	81
<b>Şekil 3.47.</b> Damar endotellerinin sitoplazmalarında etken immunopozitiflikleri (oklar), akciğer, x1000, ABC-P	81
<b>Şekil 3.48.</b> Tüberküllerdeki TLR4 immunopozitifliği, mediastinal lenf düğümü, (A-B) x400, ABC-P	82
<b>Şekil 3.49.</b> Bronşiyol epitellerinde TLR4 immunopozitifliği, akciğer, x100, ABC-P	83
<b>Şekil 3.50.</b> Tüberküllerdeki lenfositlerde CD3 immunopozitifliği, (A) x100, (B-C) x400, ABC-P	84
<b>Şekil 3.51.</b> Lenf foliküllerinde CD3 immunopozitifliği, x400, ABC-P	85
<b>Şekil 3.52.</b> Tüberkül yapısında zayıf ve/veya güçlü CD119 immunopozitifliği, (A-B) x400, ABC-P	86
<b>Şekil 3.53.</b> Bronş çevresindeki makrofajlarda CD119 immunopozitifliği, x400, ABC-P	87
<b>Şekil 3.54.</b> Tüberkül yapısında zayıf IL4 immunopozitiflikleri, x400, ABC-P	88
<b>Şekil 3.55.</b> Tüberkül yapısındaki IL17 immunopozitiflikleri, (A-B) x400, ABC-P	89

<b>Şekil 3.56.</b> Tüberkül yapısındaki Lambda chain immunopozitiflikleri, (A-B) x400, ABC-P	91
<b>Şekil 3.57.</b> Lenf foliküllerinde Lambda chain immupozitiflikleri, x400, ABC-P	91
<b>Şekil 3.58.</b> Lenf foliküllerinde TNF- $\alpha$ immunopozitiflikleri, x400, ABC-P	92
<b>Şekil 3.59.</b> Tüberkül yapısında TLR4, CD3, CD119, TNF- $\alpha$ , IL-17, Lambda Chain immunopozitifliklerinin lokalizasyonları, x400, ABC-P	93
<b>Şekil 3.60.</b> Tüberkül yapısındaki hücrelerde CD68 negatifliği ve pozitif kontroldeki immunopozitifliklikler, akciğer, (A) x100, lenf düğümü, (B) x400, ABC-P	94
<b>Şekil 3.61.</b> Makrofaj sitoplazmasında <i>M.bovis</i> (yeşil) ve IL-4 (kırmızı) immunopozitifliği, akciğer, x400, IF	95
<b>Şekil 3.62.</b> Makrofaj sitoplazmasında <i>M.bovis</i> (yeşil) ve IL-17 (kırmızı) immunopozitifliği, akciğer, x400, IF	95
<b>Şekil 3.63.</b> Lezyon tiplerine göre CD3 immunopozitiflik oranı	96
<b>Şekil 3.64.</b> Lezyon tiplerine göre CD119 immunopozitiflik oranı	97
<b>Şekil 3.65.</b> Lezyon tiplerine göre IL17 immunopozitiflik oranı	98
<b>Şekil 3.66.</b> Lezyon tiplerine göre Lambda Chain immunopozitiflik oranı	99
<b>Şekil 3.67.</b> Lezyon tiplerine göre TLR4 immunopozitiflik oranı	100
<b>Şekil 3.68.</b> Lezyon tiplerine göre TNF- $\alpha$ immunopozitiflik oranı	101

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 1.1.</b> <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> 'de bulunan patojenik etkenler ve primer izolasyon kaynakları	4
<b>Çizelge 2.1.</b> Kullanılan antikorlar ve özellikleri	29
<b>Çizelge 2.2.</b> İmmunperoksidaz boyamalarda kullanılan antikorlar ve uygulanan metotlar	34
<b>Çizelge 2.3.</b> Konfokal mikroskopik incelemelerde kullanılan ikili antikor eşleştirilmesi	35
<b>Çizelge 3.1.</b> Evrelerine göre prodüktif lezyonların görülme sıklığı	45
<b>Çizelge 3.2.</b> Primer odakta akciğerde görülen histopatolojik değişiklikler	50
<b>Çizelge 3.3.</b> Primer odakta mediastinal lenf düğümlerinde görülen histopatolojik değişiklikler	51
<b>Çizelge 3.4.</b> Primer komplekste akciğerde görülen histopatolojik değişiklikler	58
<b>Çizelge 3.5.</b> Primer komplekste mediastinal lenf düğümlerinde görülen histopatolojik değişiklikler	63
<b>Çizelge 3.6.</b> Tam olmayan primer komplekste akciğerde görülen histopatolojik değişiklikler	66
<b>Çizelge 3.7.</b> Tam olmayan primer komplekste mediastinal lenf düğümlerinde görülen histopatolojik değişiklikler	70
<b>Çizelge 3.8.</b> Morfometrik incelemelerde elde edilen sonuçlar	101

# 1. GİRİŞ

Sığır tüberkülozu, asit fast özelliği olan *Mycobacterium tuberculosis complex* grubunda yer alan ve özellikle *M. bovis*'in sebep olduğu kronik, enfeksiyöz, zoonoz bir hastalıktır. Dünya çapında çok önemli salgınlara ve ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Bu hastalık kuşlar, kemirgenler, sürüngenler de dahil olmak üzere birçok evcil ve yabani hayvanlarda görülmektedir (Haligur ve ark., 2007; Mitchell, 2012; O'Reilly ve Daborn., 1995; Reavill ve Schmidt, 2012; Shivaprasad ve Palmieri, 2012 ve Thoen, 2018).

## 1.1. Tarihçe

Tüberküloz antik çağlardan beri bilinen zoonotik bir hastalıktır (Lawn ve Zumla, 2011). Milattan önce 4000'lerde insan iskelet kalıntılarında, MÖ 3000 ile 2400 yılları arasında Mısır mumyalarının omurga kemiklerinde, 17.000 yıl öncesine ait bizon kalıntılarında hastalık etkenine rastlanmıştır (Rothschild ve ark., 2001 ve Zink ve ark., 2003).

Araştırmalarda, hem insanlarda hem de hayvanlarda MTBC genlerinin bulunması nedeniyle, Tüberkülozun sığırlardan mı insanlara, yoksa insanlardan mı sığırlara geçtiği saptanamamıştır (Pearce-Duvel, 2006). Aynı zamanda bazı araştırmacılar (Pearce-Duvel, 2006) insan ve hayvan tüberkülozu ve etkeninin ortak bir atadan gelip gelmediğinin bilinmediğine dikkat çekerken, bazıları da hayvanlarda hastalık yapan etkenin, Neolitik Dönemden bile önce insanları enfekte edebildiğini ve bunların ortak bir atadan geldiklerini belirtmişlerdir (Comas ve Gagneux, 2009).

Akciğerlerde görülen tüberküller, hastalığa ait karakteristik bulgular olarak bildirilmesine rağmen, hastalıkta pek çok sistemin etkilenmesi ve buna göre farklı semptomların görülmesi nedeniyle; 1820'lere kadar tüm bu semptomlar, tek bir hastalığa ait olarak kabul görmemiştir (Trail, 1970). Sonrasında ise J. L. Schönlein tarafından hastalığın adı "Tuberculose" olarak koyulmuştur (Jay ve ark., 2018 ve Schönlein, 1832). Fransızca olan bu kelimenin kökeni ise Latince küçük şişlik, yumru anlamına gelen "tuber"den gelmektedir. Aynı kökenden gelen "Tuberculum" kelime sonuna anormal ya da hastalıklı durumu belirten "-osis" son eki getirilerek Tüberküloz halini almıştır (McCarthy, 2001).

Hastalık etkeninin bugün ki bildiğimiz basil olarak tanımlanması ise 24 Mart 1882'de Robert Koch tarafından yapılmıştır. Koch'un Tüberküloz basilini tanımladığı 24 Mart günü, her yıl "Dünya Tüberküloz Günü" olarak kutlanmaktadır. Robert Koch, 1905 yılında yapmış olduğu bu tanımlamadan dolayı, Nobel Ödülünü almıştır (Anonim, 1905). Bazı araştırmacılar (Comas ve Gagneux, 2009 ve Pearce-Duvel, 2006), insan ve sığır tüberkülozunun benzer olduğu görüşünü ileri sürerken Koch, bu görüşü kabul etmemiştir. Bu da sütün enfeksiyon kaynağı olarak tanınmasını geciktirmiştir (Waddington, 2004).

Koch 1890 yılında *M. tuberculosis*'in üretildiği kültürleri kaynatıp "tüberkülin" adını verdiği ekstraktı hazırlamış ve ilaç olarak kullanıma sunmuştur (Dacso, 1990). Zaman içinde de hastalıkta tarama testi olarak kullanılmaya başlamıştır (Waddington, 2004).

Albert Calmette ve Camille Guérin ise 1906'da, zayıflatılmış sığır suşunun aşı gibi kullanılmasını sağlayarak hastalığa karşı bağışıklık kazanılmasında ilk gerçek başarıyı elde etmişlerdir (Bonah, 2005). Bu aşıya basil Calmette – Guérin adı verilmiştir. BCG aşısı ilk kez 1921'de Fransa'da insanlarda kullanılmış, ABD, Büyük Britanya ve Almanya'da II. Dünya Savaşı'ndan sonra yaygın kabul görmüştür (Bonah, 2005 ve Comstock, 1994).

Anadolu’da hastalıkla ilgili mücadeleye ait belgeler, Osmanlı Devleti’nde ilk kez 1898 yılında “Cemiyeti Tıbbiye-i Şahane” tarafından sunulmasına rağmen dönemin sosyo-ekonomik zorluklarından dolayı, gerekli önlemler alınmamıştır (Unat, 1979). Trablusgarp Savaşı, Balkan Savaşları ve 1. Dünya Savaşı’nda vakalarda artış görülmüş, 1918’de “Osmanlı Tüberküloz ile Mücadele Derneği” kurulmuş, ancak kurulmasından kısa bir süre sonra İstanbul’un işgal edilmesiyle faaliyetlerini durdurmuştur (Frik, 1981). Türkiye Cumhuriyeti’nin kurulmasından sonra ise gerekli kaynaklar olmaması nedeniyle hastalığa karşı mücadelede sivil toplum kuruluşları ön plana çıkmıştır ki, bunlardan ilki 1923’te İzmir’de Dr. Behçet Uz tarafından kurulan “Verem Mücadele Cemiyeti”dir. BCG aşısının kullanılmaya başlaması ise 1932’te Sağlık Bakanlığı tarafından aşının üretilmesiyle olmuştur (Aksu ve Toprak, 2012 ve Erzin, 1950).

## **1.2. Sığır Tüberkülozu**

### **1.2.1. Sığır Tüberkülozunun Etiyolojisi**

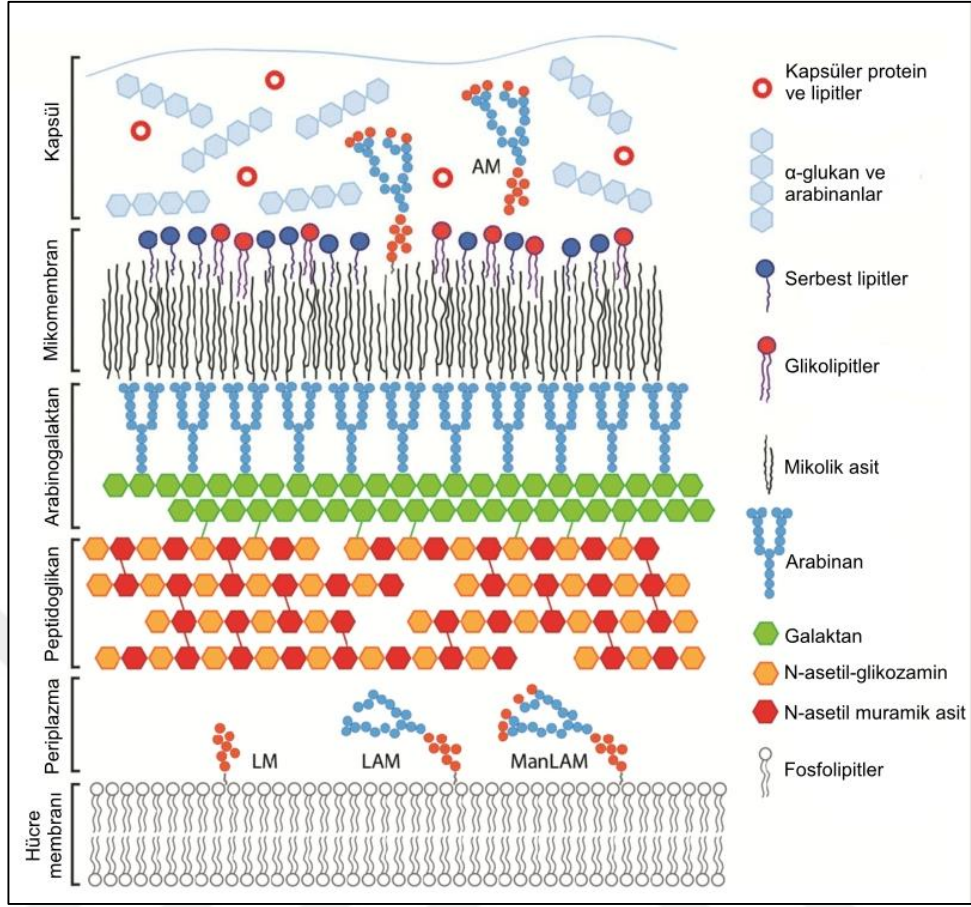
*Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis complex*’inde bulunan insan ve sığırlar dahil, memeli hayvanlarda bulaşıcı Tüberküloz hastalığını oluşturan bir etkidir (Gao ve ark., 2022 ve Nebreda ve ark., 2016). MTBC yapı olarak birbirine benzeyen, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis BCG*, *M. canetti* ve *M. caprae comb. nov., sp. nov.* bakterilerini içeren bir komplekstir (Aranaz ve ark, 2003; Behr ve Small, 1999; Nebreda ve ark., 2016 ve van Soolingen ve ark., 1997) (Çizelge 1.1). MTBC bakterileri nükleotid seviyesinde %99,9 benzerdir ve aynı 16S rRNA sekansını içerirler (Brosch ve ark., 2002). *M. bovis*, gram (+), asit fast, çubuk şeklinde, 4 µm boyutlarında konak ile ilişkili, 37 °C optimum yaşam sıcaklığına sahip mezofilik, aerobik bir bakteridir (Garnier ve ark., 2003 ve Quinn ve ark., 2011). *M. bovis*, çevrede, binalarda, ulaşım araçlarında, merada ve toprakta uzun süre yaşayabilen güçlü bir patojendir. Etkenin toprakta 2 seneye kadar, inek dışkısında ise

değişik mevsimlerde (kışın 5 aya, sonbaharda 4 aya, yazın 2 aya kadar) uzun süre yaşayabildiği bildirilmiştir (Ayele ve ark., 2004 ve Wray, 1975).

**Çizelge 1.1.** *Mycobacterium tuberculosis complex*'de bulunan patojenik etkenler ve primer izolasyon kaynakları (Nebreda ve ark., 2016).

Etken	Primer kaynak
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	İnsan
<i>Mycobacterium africanum</i>	İnsan (Batı Afrika)
<i>Mycobacterium canettii</i>	İnsan (Afrika'nın Boynuzu)
<i>Mycobacterium bovis</i>	Sığır ve diğer hayvanlar
<i>Mycobacterium bovis BCG</i>	Aşı
<i>Mycobacterium microti</i>	Tarla faresi ve diğer küçük kemirgenler
<i>Mycobacterium caprae</i>	Keçi, sığır ve diğer hayvanlar (Avrupa)
<i>Mycobacterium pinnipedii</i>	Fok balığı

MTBC'inde yer alan etkenlerin genel yapısı 6 katmandan oluşmaktadır. Bunlar hücre membranı, periplazma, peptidoglikan, arabinogalaktan, mikobakteriyel dış membran (mikomembran) ve kapsülden ibarettir (Şekil 1.1). Hücre membranı fosfolipitlerden oluşmaktadır. Periplazma, hücre membranı ve peptidoglikan katman arasında bulunan bölümdür. Peptidoglikan katman N-asetil-glikozamin ve N-asetil muramik asit içerir. Arabinan ve galaktanın bağlanmasından oluşan katman arabinogalaktan katman olarak bilinirken, mikolik asit, serbest lipit ve glikolipit bulunan katman ise mikomembran olarak bilinir. Kapsülde de serbest protein ve lipitler bulunur. Tüm tabakalarda ayrıca mevcut yapılara ek olarak lipoarabinomannan bulunur. LAM hücre duvarında bulunan lipoglikan yapıda, majör bir virülans faktörüdür. Aynı zamanda, konak direncini ve kazanılmış bağışıklığı zayıflatarak, etkenin hayatta kalmasını sağlamaktadır. Etken yapısında yer alan LAM'lar nedeniyle (ManLAM, LAM, AraLAM) kolaylıkla fagosite edilememektedir. Nitekim ManLAM bir taraftan makrofajları inhibe ederken, nötrofilleri aktive etmektedir. AraLAM ise kemokin ve IL (özellikle IL8) yapımını uyarmaktadır (Raffetseder, 2016).



**Şekil 1.1.** *Mycobacterium tuberculosis complex*'te bulunan etkenlerin hücre duvarının şematize yapısı (Raffetseder, 2016).

Mikolik asitten oluşan mikomembran, mikobakteriyel dış membran olarak bilinmektedir. Bu yapı MTBC'lerin karakteristik mumsu tabakasını oluşturmaktadır (Hett ve Rubin; 2008 ve Kieser ve Rubin, 2014). Mikomembranda ayrıca glikolipit, dimikoserozat, dimikolitrehaloz, sulfolipit ve fosfatidilinositol mannozidler bulunur. Bu yapı bakterilerin teşhisinde kullanılan boyaların emilmesini engelleyerek, mikobakteriyel etkenlere asit-fast etki vermektedir. Bu özellik karbol fuksinin etkenin hücre duvarı tarafından emilmesini ve asidik çözücülerden etkilenmemesini sağlamaktadır (Garnier ve ark., 2003 ve Quinn ve ark., 2011).

### 1.2.2. Sığır Tüberkülozunun Yayılması

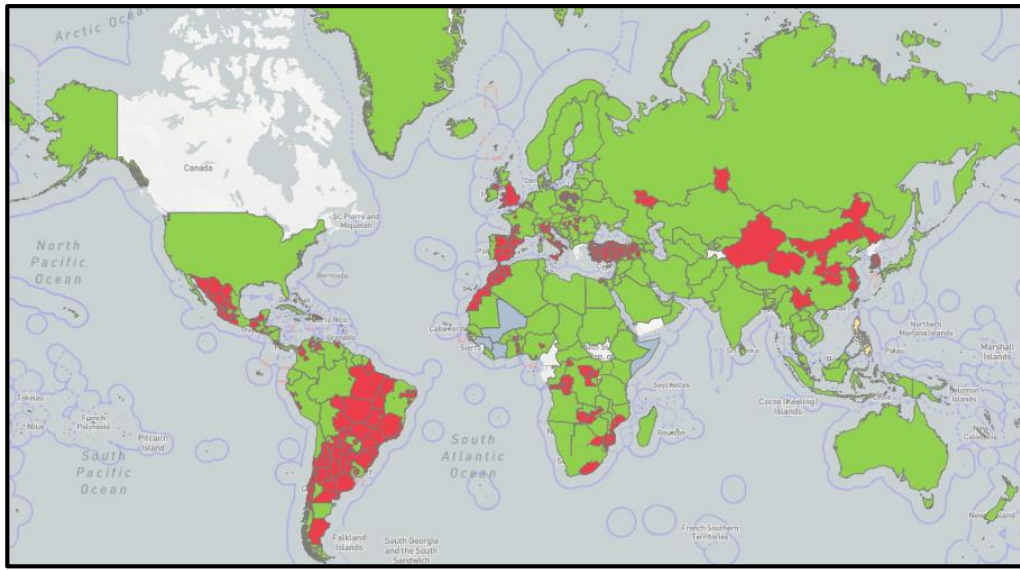
Sığır tüberkülozu, sığırlar arasında zayıf yayılıma sahip olmasına rağmen hastalığın kronik seyretmesi ve geç farkedilmesi nedeniyle yayılma potansiyeli yüksek bir hastalıktır. Bu nedenlere bağlı olarak hastalığın yayılımı da karmaşıktır. Hastalığın enfeksiyon riski ve bireysel hayvanlarda seyri yaş, ırk, konak genetiği gibi durumlarla değişebilmektedir. (Allen ve ark., 2010; Bermingham ve ark., 2014; Brooks-Pollock ve ark., 2013 ve Downs ve ark., 2016). Sığırlarda bulaşma yolu genellikle horizontal olmasına rağmen enfekte olan tüm hayvanlar enfeksiyonu bulaştırmaz (Cousins, 2001). *M. bovis* çevreye dayanıklı bir bakteri olmasına rağmen (Ayele ve ark., 2004 ve Wray, 1975), bulaşmanın genellikle hasta hayvanlar tarafından salınan bakteri içeren damlacıklar sayesinde olmaktadır. Bulaşma özellikle sütçü sığırlarda, sağım esnasında ve kış aylarındaki yakın temas nedeniyle daha kolay şekillenmektedir. Buzağılarda, kedilerde ve domuzlarda bulaşma genellikle enfekte sütün alınmasıyla görülür. Bazı ülkelerde merada yetiştirilen sığırlarda bulaşma kaynağı olarak yabancı hayvanlar (Avrupa'da porsuk; Yeni Zelanda'da fırça kuyruklu keseli sıçan; Afrika'da Cape buffalo ve diğer ruminantlar) görülmektedir. Yabancı ya da çiftlikte yetiştirilen geyikler de hastalığa duyarlı olduklarından enfeksiyon kaynağı olarak kabul edilmektedir. Buna karşın yabancı domuzlarda enfeksiyon genellikle sindirim kanalında görüldüğünden ve lezyonlar az sayıda bakteri içerdiğinden bulaşma için düşük risk kaynağı olarak kabul edilmektedir (Corner, 2006 ve Quinn ve ark., 2011).

### 1.2.3. Sığır Tüberkülozunun Epidemiyolojisi

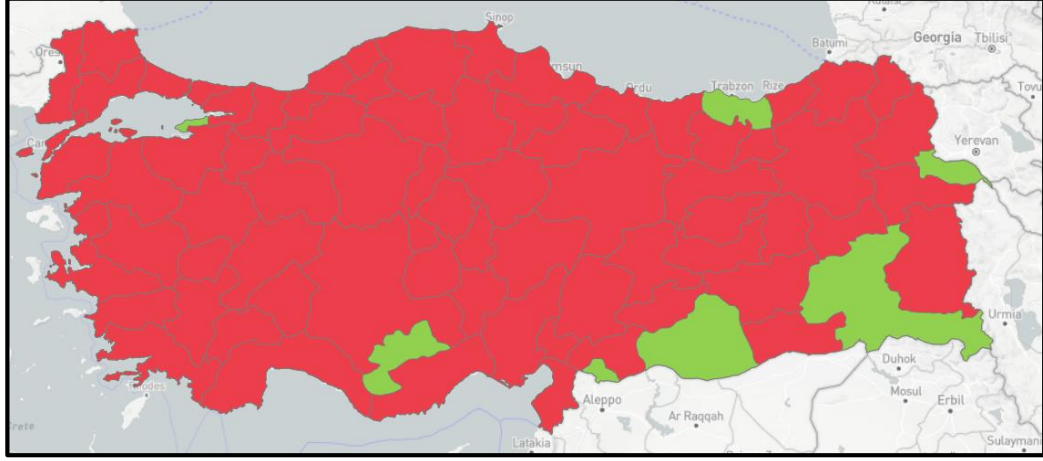
Sığır tüberkülozu Dünya'da yaygın görülen hastalıklardan birisidir. WOAHH-WAHIS veritabanında kayıtlı olan 187 ülkede en son kayıt altına alınmış olan Temmuz-Aralık 2018 tarihine göre; hastalık evcil hayvan popülasyonlarında 72 ülkede bildirilmiş, 108 ülkede bildirilmemiş, 6 ülke içinse herhangi bir bilgi sunulmamıştır

(Şekil 1.2). Yabani hayvanlarda ise hastalık 21 ülkede bildirilmiş, 95 ülkede bildirilmemiş, 63 ülkede herhangi bir bilgi sunulmamıştır.

Ülkemizde yine WOAHA-WAHIS'e göre ise evcil hayvan popülasyonlarında 70 ilde hastalık bildirilmiş, 11 ilde (Batman, Bitlis, Hakkâri, Iğdır, Karaman, Kilis, Siirt, Şanlıurfa, Şırnak, Trabzon, Yalova) hastalık bildirilmemiştir (Şekil 1.3). Yabani hayvanlarla ilgili herhangi bir bilgi sunulmamıştır (WOAH, 2018).



**Şekil 1.2.** Dünya'da sığır tüberkülozunun varlığı. (■ Hastalık bildirilmedi; ■ Hastalık Bildirildi; ■ Veri Yok; ■ Hastalık Yok).



**Şekil 1.3.** Türkiye’de sığır tüberkülozunun varlığı (■ Hastalık Bildirilmedi; ■ Hastalık Bildirildi).

#### 1.2.4. Sığır Tüberkülozunun Bulaşma ve Patogenezi

Sığırlarda hastalığın bulaşması horizontal ve vertikal yolla olmaktadır. Horizontal bulaşmada daha çok alimenter, aerojen, venereal ve intrauterin yol, enfekte sperm ve suni tohumlama ekipmanı; vertikal bulaşmada ise daha çok herediter ve konjenital olaylar etkilidir. Bu bulaşma yollarından öncelikle horizontal yol, bunlardan da bilhassa aerojen yolla damlacıklar aracılığıyla yayılım en önemlisidir. Bunu enfekte hayvanın eti, sütü, et ve süt ürünleri ile enfekte suyun tüketilmesi izlemektedir. İntrauterin ve koitusla bulaşma nadirdir. Yabani ya da çiftlikte yetiştirilen geyiklerde hastalığa duyarlı olduklarından enfeksiyon kaynağı olarak kabul edilmektedir. Buna karşın yabani domuzlarda enfeksiyon genellikle sindirim kanalında görüldüğünden ve lezyonlar düşük sayıda bakteri içerdiğinden bulaşma için düşük risk kaynağı olarak kabul edilmektedir (Corner, 2006 ve Quinn ve ark., 2011). Bulaşmada yaş, ırk, konak genetiği vb. predispoze faktörler göz ardı edilmemelidir.

#### 1.2.4.1. Aerojen (Damlacık) Enfeksiyonu

*M. bovis* çevreye dayanıklı bir bakteridir ve bulaşma genellikle hasta hayvanlar tarafından çıkarılan bakteri içeren damlacıklar sayesinde olmaktadır. Hayvanın aksırık, öksürük ile saçtığı etkenler süratle sağlıklı hayvanlar arasında yayılır (Bates, 1980 ve Ratcliffe, 1952). Aerojen yolla alınan bu etkenler tonsillerde, retrofaringeal bölgede bölgesel lenf düğümlerinde replike olurlar ve akciğerlere geçerler.

Bazı araştırmacılar tonsillerde lokalize olan lezyonların şekillendiğine dikkat çekerlerken, bazıları da herhangi bir lezyon şekillenmese bile, tonsillerden etken izole ve identifiye edildiğini belirtmişlerdir (Cassidy ve ark., 1999).

Etken, akciğere geldikten sonra alveoler makrofajlarca fagosite edilmektedir. Alveoler makrofajlarda ya tamamen parçalanmakta ya da çoğalmaktadır. Etken hücre duvarında bulunan LAM nedeniyle kolaylıkla fagosite edilemez.

Eğer etken makrofajlarca yok edilemezse, geldiği yerde ilk lezyon şekillenmeye başlar. Aslında “primer odak” olarak tanımlanan bu lezyonlar sitokinlerin aracılığıyla oluşan hipersensitivite reaksiyonu şeklinde gelişir. Primer odakta akciğerin ilk etkilenen organ olduğu düşünülse de lezyonların daha yaygın olarak torakal boşlukta, özellikle bronşiyal ve mediastinal lenf düğümlerinde görülmüş olması bu organların da hastalıkta ilk önce etkilenen organlardan olduğunu düşündürmektedir (Stamp, 1948). Akciğerlerde, yaygın purulentten kazeöze kadar değişen bir yangı olabileceği gibi tüberküllerle karakterize prodüktif yangı da şekillenebilir. Bu lezyonların farklı şekillenmesinde en önemli şart, etken patojenitesi ve konak immunitesine aittir. Çünkü etken patojenitesi yüksek, konak immunitesi düşükse daha çok eksudatif/kazeöz karakterde lezyonlar oluşurken; etken patojenitesi düşük, konağın immunitesi yüksekse de tüberkül ile karakterize prodüktif lezyonlar oluşmaktadır (Hunter, 2011).

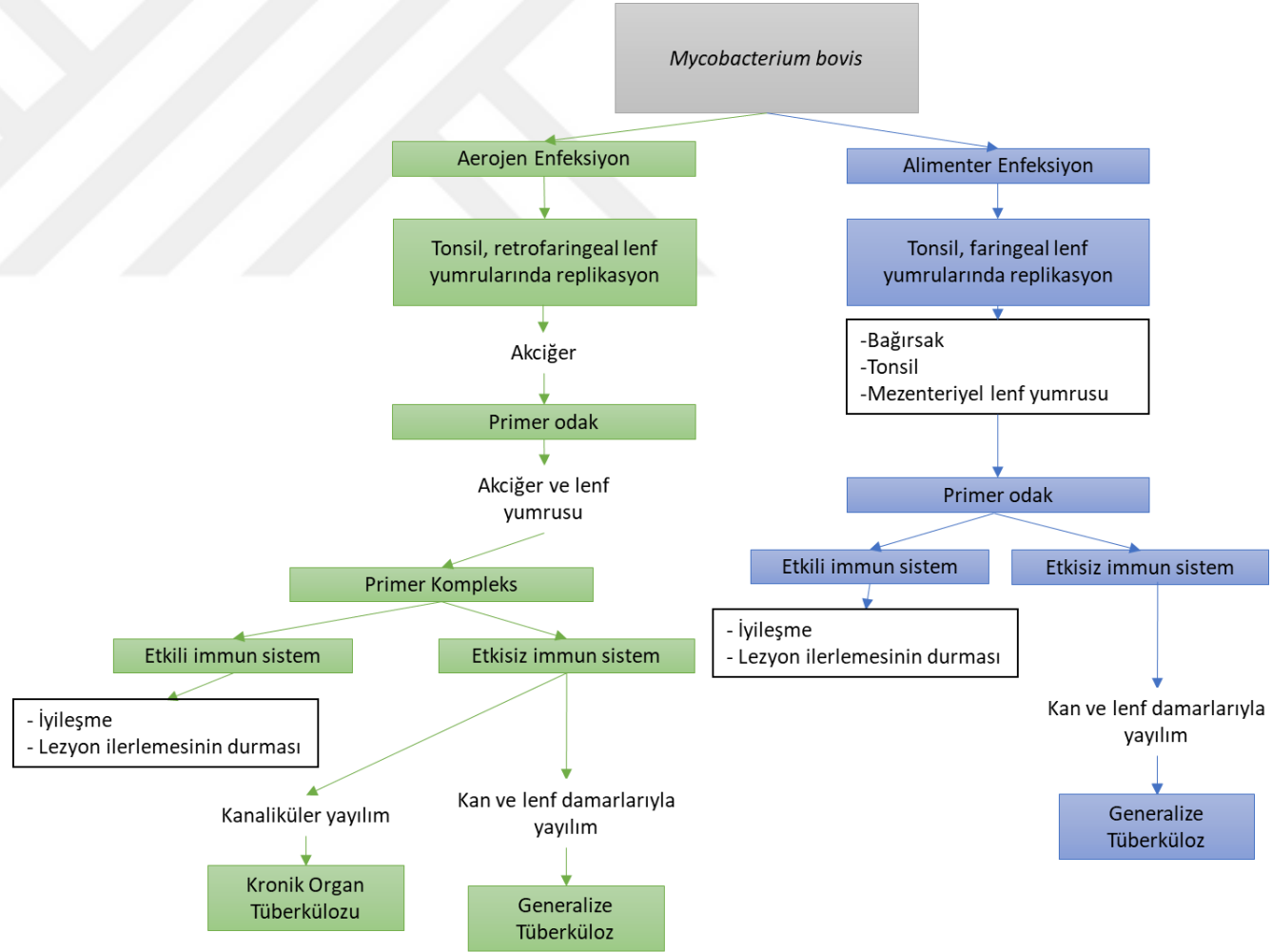
Primer odakla birlikte, bölgesel lenf düğümlerinde de lezyonların şekillenmesi ise “primer kompleks” olarak tanımlanır (Dungworth, 1985). Akciğer ve lenf düğümlerinde nodüler lezyonların görülmesi primer kompleks ya da Ghon kompleksi olarak isimlendirilmiştir (Ghon, 1912). Sığırlarda primer kompleks konakçı etkin immun sisteme sahip ise tamamen iyileşebilir ya da olduğu gibi kalır (Domingo ve ark., 2014). Ancak, enfekte olan hayvanda immun sistem baskılanmışsa ya da immun cevap etkisiz kalırsa, primer enfeksiyon başlangıç döneminde generalize enfeksiyona dönüşebilir (erken generalizasyon). Re-enfeksiyon ya da post-primer safhada hematojen ya da lenfatik yayılmayla oluşan generalizasyon ‘geç generalizasyon’ olarak bilinmektedir. Konağın immun sistemi yetersiz kalırsa da etkenler kan ve/veya lenf damarları aracılığıyla özellikle kronik olgularda kanallar aracılığıyla yayılarak yakın (plöra) ve/veya uzak organlarda da (periton, karaciğer, böbrek, dalak, iskelet, meme bezleri, üreme yolu ve merkezi sinir sistemi) lezyonlar oluşturabilir (Domingo ve ark., 2014).

Kronik enfeksiyonlarda, farklı zamanlarda bakteriyeminin olması nedeniyle prodüktif lezyonların boyutları milierden nodülere kadar değişmektedir. Eğer hastalık iyileşirse, enfeksiyon sonrası herhangi bir anda re-enfeksiyon ya da süper enfeksiyon da şekillenebilir. Bronşiyoler ya da bronşiyel kanallarla yayılan etken sonucu multikofal kazeöz nekrozun görüldüğü daha sonra da kavernöz lezyonların olduğu kronik organ tüberkülozu görülür. Bunlara bronş ve trakeada ülserler eşlik eder. Lezyonların kireçlenmesi bu aşamada belirgin değildir. Serozal yüzeylere, özellikle plöra, perikard ya da peritona generalizasyon sonrasında, inciye benzetilen 5-10 mm arasında değişen çaplara sahip çok sayıda tüberkül oluşabilir. Serozal yüzeylere bu şekilde yayılım, lenf kanalları yoluyla ya da etkilenen organlarda erozyona uğrayan granümatöz lezyonların kavitasyon alanlarına lokal uzanımıyla meydana gelebilir. Serozal generalizasyon sığırlarda yaygındır, ancak diğer evcil ruminant türlerinde nadiren görülmektedir (Domingo ve ark., 2014).

#### 1.2.4.2. Alimenter Enfeksiyon

Hasta hayvanların etleri, sütleri ve bunlardan hazırlanan ürünler, kontamine su ve kullanılan kaplar enfeksiyon kaynaklarıdır. Özellikle buzağılarda, kedilerde (Haligur ve ark., 2007) ve domuzlarda bulaşma genellikle enfekte sütün alınmasıyla görülür. Alimenter yolla alınan etken nazofaringeal ve/veya faringeal mukozaya, bölge lenf düğümlerine, nadiren tonsillere ve bağırsaklara ve özellikle mezenteriyel lenf düğümüne gelerek primer odağı şekillendirirler (Terefe, 2014). Buradan da yeniden kan ve/veya lenf damarları aracılığıyla tüm organizmaya yayılarak generalize enfeksiyon oluştururlar (Neill ve ark., 1994).

Aerojen ve alimenter yolla bulaşmada hastalığın patogenezi Şekil 1.4'de verilmiştir.

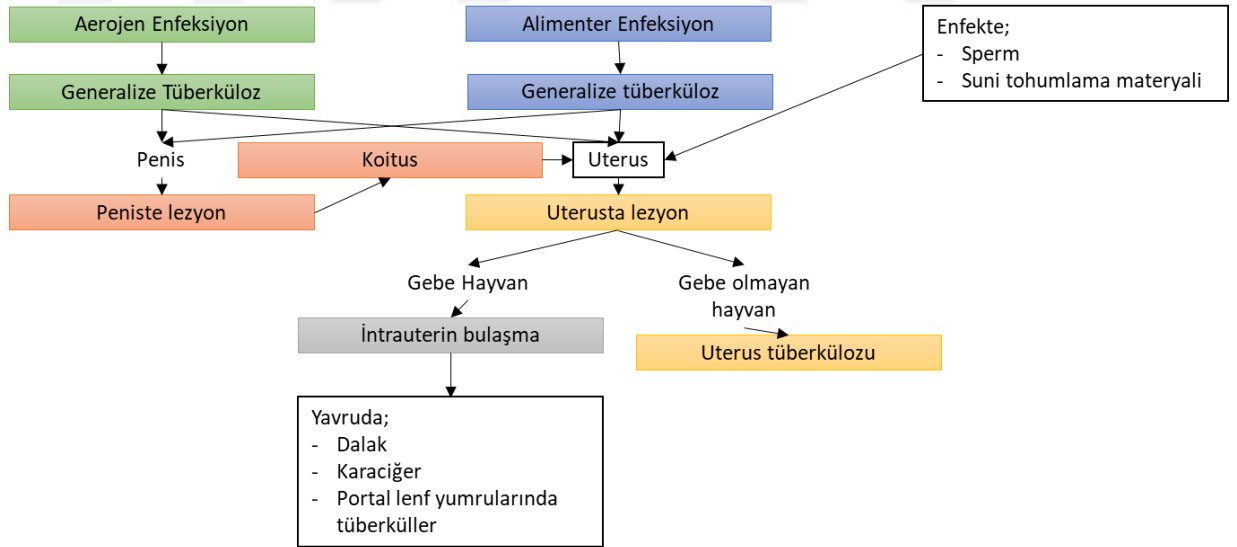


Şekil 1.4. Aerojen ve alimenter enfeksiyonda hastalığın patogenezi.

Araştırcılar alimenter enfeksiyonun oluşunu için önemli miktarda hastalık etkeninin alınmasına dikkat çekmişlerdir (Francis, 1958; Francis, 1971; Griffin ve Dolan, 1995 ve Wells ve ark., 1948).

### 1.2.4.3. İntrauterin ve Koital Enfeksiyon

Bulaşma ya generalize enfeksiyonda kan yolu ile etkenin genital sisteme ulaşması veya hasta erkek hayvan ya da enfekte suni tohumlama materyalinin, sperminin kullanımı ile gerçekleşmektedir. Lezyonlar daha çok vulva-vaginada, uterusu, nadiren penistedir. Abortus ve interfiliteye neden olmasının yanında intrauterin yolla umbilikal kord aracılığıyla fötüs enfekte olabilir (Vural ve Tunca, 2001). İntrauterin bulaşma görülen yeni doğanlarda lezyonlar genellikle karaciğer, portal lenf düğümleri ve dalakta (Şekil 1.5) görülmektedir (Erer ve Özdemir, 2021).



Şekil 1.5. Koital ve intrauterin enfeksiyonda hastalığın patogenezi.

#### **1.2.4.4. Klinik Bulgular**

Sığır tüberkülozu klinik olarak genellikle asemptomatik seyreder. Hastalığın genel bulguları arasında progresif zayıflama, tekrarlayan dalgalı ateş, değişen derecelerde iştah kaybı ve anoreksi bulunur. Lokalize tüberkülozda ise hastalığın bulunduğu yere göre klinik semptomlar değişiklik göstermektedir.

Solunum sisteminin etkilendiği durumlarda; kronik solunum hastalığı formunda sabah saatlerinde, soğuk havalarda ve egzersiz sonrası kötüleşen nemli öksürük, ilerlediği durumlarda dispne, taşipne ve hiperpne ile seyreder. Akciğerdeki granümatöz lezyonlar nedeniyle oskültasyon ve perküsyonda matite tespit edilebilir. Genital form yaygın olmayan bir form olmasına rağmen metritis ve abort nedenidir. Erkek hayvanlarda kronik induratif orşitis görülebilir. Meme etkilendiğinde kronik induratif mastitis, hipertrofi ve supramammar lenf düğümlerinde büyüme gözlenir. Sindirim sistemi etkilendiğinde ise disfaji ve diare, aralıklı olarak da konstipasyon görülebilir (Petrovski, 2015). Yüzeysel lenf düğümlerinin büyümesi tanıda yararlı bir işaret olabilir. Yüzeysel olmayan etkilenen lenf düğümleri her zaman palpe edilmeyebilir. Ancak solunum yollarında, farenskte tıkanma ve daralmalara neden olarak nefes darlığı, bağırsaklarda tıkanma ve daralmalara neden olarak ruminal timpaniye neden olabilirler (Thoen, 2018).

#### **1.2.4.5. Makroskobik Bulgular**

Morfolojik olarak prodüktif ve eksudatif olmak üzere 2 tip değişiklik görülür. Bunlardan prodüktif lezyonlarda tipik tüberkül olarak bilinen, değişik boyutlarda, tamamı ya da bir bölümü bağ dokusundan kapsülle sarılmış, merkezinde değişen derecelerde mineralizasyon görülen nekrotik alan bulunan, sarı-boz renkli sınırlı yangısal granümatöz nodüllerdir (Aranday-Cortés ve ark., 2012; Domingo ve ark.,

2014 ve Özmen ve ark., 2005). Kesit atıldığında tüberküllerin içerisinde bıçağa sıvanan sarı-boz renkteki peynirimsi bir materyal görülmektedir ve içeriğindeki mineraller nedeniyle çıtırtı sesi duyulmaktadır. Granülomatöz nodüllerin lokalizasyonu hastalığın seyri ile değişmektedir. Yetişkin sığırlarda lezyonlar genellikle solunum sisteminde akciğer paransiminde ve torakal kavitedeki bölgesel lenf düğümlerinde sınırlı olarak görülmektedir (Ghon, 1912).

Primer lezyon genellikle akciğer loblarının birinde dorsal bölgelerde lokalize olur. Bu lezyon daha sonradan kapsülleşir ve mineralize olur. Primer lezyon ilerleyerek akciğer ve plörada çok sayıda küçük boyutlu milier nodül oluşumlarına neden olabilir (primer generalizasyon). Bu lezyonlar büyüyerek, gelişim ve çevre dokularıyla ilişkileriyle asiner, kavernöz ve eroziv form olarak üçe ayrılırlar. Asiner formda primer pulmoner lobulleri etkileyen çok sayıda küçük sarımsı nodüller görülür. Kavernöz formda lezyon nedeniyle bronşlar dilate olur ve tüberkül yapısı parçalanarak peynirimsi materyal bronş lumenine boşalır. Eroziv formda ise etken havayolu ve trake epitelinde eroziv lezyonlar oluşturur (Salguero ve ark., 2017).

Tüberkül yapıları baş ve boyun çevresindeki lenf düğümlerinde (parotid, medial ve lateral retrofarengeal ve submandılar) da görülebilir (Ameni ve ark., 2018; Aranday-Cortés ve ark., 2013; Dean ve ark. 2014 ve Salguero ve ark., 2017). Buzağılarda enfeksiyon genellikle sindirim yoluyla olduğundan, mezenterik lenf düğümleri ve diğer organlarda da tüberkül yapıları görülebilir (Terefe, 2014).

#### **1.2.4.6. Mikroskopik Bulgular**

Tüberküllerin merkezinde yer yer kalsifiye kazeöz nekroz alanları ile epitelooid makrofajlar ve Langhans tipi dev hücreler ve lenfosit, makrofaj ve plazma hücreleri gibi mononükleer hücreler ile, en dışta fibröz kapsül görülür (Vural ve Alçigir, 2010).

Kazeo-nekrotik alanlar ve bunları çevreleyen mononükleer hücreler arasında sağlam ve/veya nekrotik nötrofil lökositler görülebilir. Sığır tüberkülozunda şekillenen tüberkül oluşumunda birçok etken rol oynamaktadır. Primer kompleksin oluşumu sonrası dendritik hücrelerin T lenfositleri uyarması sonrası T lenfositler olgunlaşır (Cooper, 2009). Dolaşımında bulunan aktive edilmiş patojen spesifik T lenfositleri, makrofajların aktive edilmesi ve yeni şekillenen tüberkülda etken çoğalmasının baskılanması için kritik öneme sahiptir (North ve Jung, 2004). Aktive edilmiş T lenfositlerin varlığında, merkezde *Mycobacterium sp.* içeren makrofajların etrafında lenfositlerin bulunduğu tüberkül yapıları oluşur. Tüberkül yapılarının daha önceden enfeksiyonun engellenmesi için oluştuğu düşünülse de aslında bunların sürekli hücre kaybı, kaybedilen hücrelerin yenilenmesi, dokuda oluşan değişimler ile daha dinamik bir süreç sonucu oluştuğu bildirilmiştir (Ehlers ve Schaible, 2013).

### **1.3. Diğer Hayvan Türlerinde *Mycobacterium bovis***

*M. bovis* sığırlar dışında genellikle insan ve bütün omurgalı hayvanları enfekte edebilmektedir (Garnier ve ark., 2003 ve Thoen, 2018). Oluşan enfeksiyon genellikle bTB'nin endemik olduğu bölgelerde sığırlarla teması olan hayvanlarda görülmektedir. Lezyonların gelişebildiği hayvanların başında koyun, keçi, domuz, manda ve develer gelmektedir.

#### **1.3.1. Koyun ve Keçilerde *Mycobacterium bovis* Enfeksiyonu**

Koyun ve keçilerde enfeksiyon *M. bovis*'le enfekte sığır sürüleriyle temas sonrası görülebilmektedir (Malone ve ark., 2003). Genellikle solunum ya da sindirim yoluyla bulaşan etken, sığırlardaki lezyonlara benzer olarak çoğunlukla mineralize merkeze sahip etrafı bağ doku ile çevrilmiş granülomatöz odaklara sebep olur. Klinik semptom olarak keçilerde kilo kaybı ve kuru öksürük görülürken, koyunlarda

genellikle klinik semptomla rastlanmaz. Domingo ve ark. (2014), keçilerde görülen lezyonları akciğerde likefaktif nekroz ve eksudatla dolu kaviteasyon lezyonları şeklinde tanımlamıştır.

### **1.3.2. Domuzlarda *Mycobacterium bovis* Enfeksiyonu**

Domuzlarda tüberküloz hastalığının etkeni genellikle *M. avium complex* olmasına rağmen (Perez de Val ve ark., 2014) *M. bovis* sonucu oluşan tüberküloz lezyonları da görülebilmektedir. Hastalığın domuzlara bulaşması bTB'nin endemik olduğu bölgelerde görülmektedir (Broughan ve ark., 2013). Oluşan lezyonlar 4 cm çap büyüklüğünü geçmeyen sığırlara benzer tüberkül yapıları olarak bildirilmiştir (Bailey ve ark., 2013).

### **1.3.3. Mandalarda *Mycobacterium bovis* Enfeksiyonu**

Mandalarda *M. bovis* tarafından oluşturulan enfeksiyonun patogenezi ve görülen lezyonlar bTB ile benzerlik göstermektedir. Bu nedenle bTB'unun diğer bir kaynağının mandalar olabileceği bildirilmiştir (Khattak ve ark., 2016).

### **1.3.4. Develerde *Mycobacterium bovis* Enfeksiyonu**

Deve tüberkülozunda en yaygın etken *M. bovis* olarak bildirilmiştir (Kinne ve ark., 2006 ve Wernery ve ark., 2007). Develerde hastalığın erken dönemlerinde semptom görülmezken, hastalığın ilerlediği olgularda iştahsızlık ve kilo kaybı dikkati çekmiştir (Narnaware ve ark., 2015). Oluşan makroskopik lezyonlar bTB ile benzerlik

gösterirken, mikroskobik olarak az sayıda dev hücre görülmektedir (Bush ve ark. 1990). Genellikle akciğer ve mediastinal lenf düğümlerinde lezyonlar görülürken, retrofarengeal ve mezenterik lenf düğümlerinde, böbrek, karaciğer, dalak, kalp ve perikardium, mezenteriyum, trake, pankreas ve periferik lenf düğümlerinde de lezyonlara rastlanabilmektedir (Bush ve ark., 1990 ve Narnaware ve ark., 2015).

### **1.3.5. Geyiklerde *Mycobacterium bovis* Enfeksiyonu**

Geyiklerde *M. bovis* tarafından oluşturulan enfeksiyonlarda lenf düğümlerinde apseler yaygın olarak görülmektedir. Lenf düğümlerinin yanında fibrinöz plöritisle birlikte plörada apselere rastlanmıştır. Ayrıca aort, diyafram, dalak, rumen, omurilik ve bacak eklemleri, deri altı ve meme dokusunda benzer lezyonlar görülmüştür. İç organ ve lenf düğümlerinde granümatöz yangı yerine apse şeklinde lezyonların görülmesi, geyiklerin hastalığa daha duyarlı olduğunu düşündürmektedir (Zanella ve ark., 2008).

### **1.4. Tüberküloz Hastalığına Karşı Alınan Önlemler**

Hastalığın gittikçe yaygınlaşması hastalık üzerine araştırmaları arttırmıştır. Hatta İngiltere’de 1913’te Tıbbi Araştırma Konseyi kurulmuş ve yapılan ilk çalışmalar tüberküloz hakkında olmuştur (Hannaway, 2008). Aynı zamanda hastalığın bulaşıcılığı kabul görüp, ölüm oranları artmaya başladıktan sonra 1880’lerde İngiltere’de ihbar edilebilir bir hastalık olarak kabul edilmiştir. Tüberküloz’u tamamen ortadan kaldırma umutları, 1980’lerde ilaca dirençli suşların artmasıyla sona ermiştir. Daha sonra tüberkülozun yaygınlaşmaya başlaması, hastalığın 1993 yılında WHO tarafından ilk defa acil sağlık sorunu ilan edilmesiyle sonuçlanmıştır. Son zamanlarda ise insanlarda *M. bovis* enfeksiyonu acil sağlık sorunu olarak bildirilmiştir. 2017 yılında, WHO, WOA, FAO ve Uluslararası Tüberküloz ve Akciğer Hastalığına Karşı Birliği, bTB

için ilk Yol Haritası'nı yayınlayarak, bTB'nu belirgin bir küresel sağlık sorunu olarak kabul etmiştir. Hastalık önemli bir tehdit olarak kalmasına rağmen sanitasyon, aşılama ve diğer halk sağlığı önlemlerindeki iyileşmeler, streptomisin ve diğer antibiyotiklerin üretilmesinden önce bile tüberküloz oranlarını önemli ölçüde azaltmayı başarmıştır (Persson, 2010). Streptomisin geliştirilmeden önce Tüberküloz için bilinen tek tedavi, enfekte olmuş bir akciğerin söndürülerek "dinlendirilmesi" ve tüberküloz lezyonların iyileşmesine izin verilmesi gibi tedavi denemeleridir (Shields, 2009). Streptomisin antibiyotiğinin 1946'da gelişimi Tüberküloz'un etkili olarak tedavisini mümkün kılmıştır.

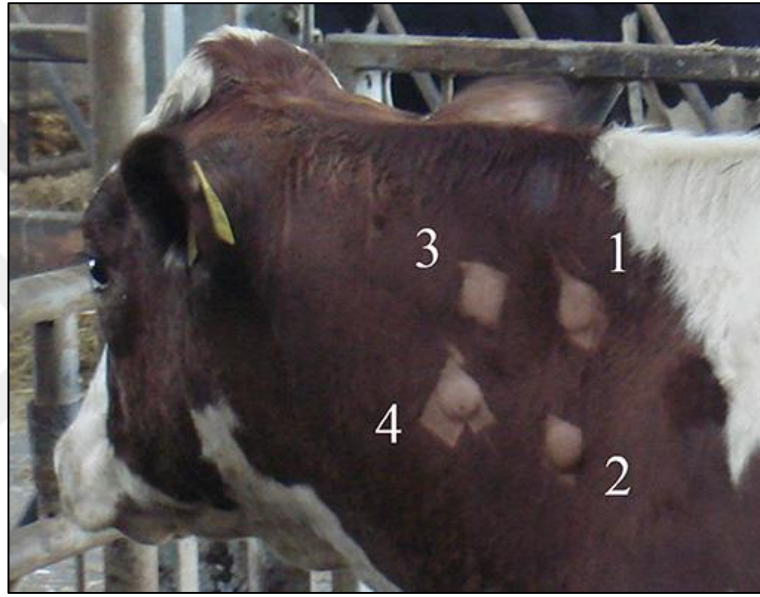
## **1.5. Tüberkülozun Teşhisi**

### **1.5.1. Mendel-Mantoux Testi**

Mendel–Mantoux testi (tüberkülin sensitivite testi) Tüberküloz'un tespiti için kullanılmaktadır. Sığır tüberkülozu yönetmeliğine göre bu test için PPD mammalian ve PPD avian tüberkülinler uygulanır ve karşılaştırmalı olarak değerlendirilir. PPD mammalian ve PPD avian tüberkülinler bir aylıktan itibaren her yaştaki sığıra 0,1 ml intradermal olarak enjekte edilir. Gebe ineklere doğumdan 15 gün öncesine kadar veya doğumdan 15 gün sonra uygulanır. En iyi uygulama yeri boynun iki tarafındaki orta kısımdır. Başa yakın kısmın çok duyarlı, omuza yakın kısmın ise az duyarlı olması nedeniyle reaksiyonlar yanıltıcı olabilir. Bu sebeple boynun orta kısmında ve boynun alt, üst kenarlarından bir el genişliği uzaklığında ortalama 12 x 6 cm boyutlarındaki bölgenin derisi zedelenmeyecek şekilde kılları kırılır. El ile deride bir kıvrım yapılarak her iki tüberkülinin uygulama yerindeki derinin normal kalınlıkları kompasla ayrı ayrı ölçülerek çizelgedeki yerlerine yazılır. PPD avian tüberkülin kırılan yerin üst kısmına, PPD mammalian tüberkülin ise alt kısmına enjekte edilir. İki tüberkülinin enjeksiyon yeri arasında yaklaşık olarak 8 cm. kadar bir aralık olmalıdır (Şekil 1.5). Daha sonraki testler boynun kullanılmayan tarafına yapılacağı için ilk testin yapıldığı

boyun tarafı da reaksiyon çizelgesine yazılır. Uygulamadan sonra test 72 saat sonrasında okunur. Öncelikle genel muayene yapılması sonrası deri kalınlıkları kompasla ölçülür (Duignan ve ark., 2019). Deri kalınlıklarına göre;

- 1) 3 mm'ye kadar olursa reaksiyon NEGATİF
- 2) 3-4 mm arasında reaksiyon ŞÜPHELİ
- 3) 4 mm ve üzeri ise POZİTİF sonuç olarak değerlendirilir (Anonim, 1978).



Şekil 1.5. Sığırlarda PPD uygulama yerleri (Duignan ve ark., 2019).

Çok yaygın kullanılmasına rağmen, bu testler birçok sorunu da beraberinde getirmektedir. Testlerde kullanılan PPD, patojenik ve atipik mikobakterilerin 200'den fazla antijeninin içermektedir (Chaparas ve ark., 1970). Bu testin sensitivitesi PPD mammalian ve PPD avian için sırasıyla, %80,4-88,4 ve %75, spesifitesi de sırasıyla %96 ve %98 olarak bildirilmiştir (Whipple ve ark., 1995). Testlerin uygulanması için yetenekli veteriner hekimler ve hayvanın zaptırapta alınması gerekmektedir. Antikor titreleri bTB'de geç sürelerde yükseldiği için sığırlarda tüberküloz izleme programlarına uygun olmadığı düşünülmektedir.

### **1.5.2. Nekropsi ve Mikroskopik İncelemeler**

Nekropsi sırasında makroskopik bulguların varlığı ve sonrasında yapılan bakteriyolojik ve mikroskopik incelemeler tüberküloz teşhisi için uygun olabilmektedir. Mikroskopik incelemede tüberküllerin yapısı HE boyaması ile incelenebilmektedir (Liebana ve ark., 2008). Dokuda görülen karakteristik histolojik lezyonlarla (kazeöz nekroz, kireçlenme, epitelooid hücreler, Langhans tipi dev hücreler ve makrofajlar) teşhis konulabilmektedir.

### **1.5.3. Ziehl-Neelsen Boyaması**

Ziehl-Neelsen boyaması, ilk olarak Paul Ehrlich tarafından tanıtılan asit-fast bir boyadır. Bu boyama aside dirençli organizmaları, özellikle mikobakterileri tanımlamak için kullanılan bakteriyolojik bir boyadır. Boyama prosedürü 19. yüzyılın sonlarına doğru modifiye eden Franz Ziehl ve Friedrich Neelsen'in ismini almıştır. Temel olarak karbol fuksin, asit alkol ve metilen mavisi kullanılmasıyla yapılan bir boyama yöntemidir. İlk olarak karbol fuksin bütün dokuları kırmızı renge boyar, asit alkolle muamele sonrası asit-fast bakteriler lipit tabakaları nedeniyle boyayı tutar. Metilen mavisiyle arka plan boyaması yapıldıktan sonra kesitler mikroskopta incelenir. Hasar gören etkenleri boyamadığından duyarlılığı düşüktür (Humphrey ve Weiner, 1987).

### **1.5.4. İmmunohistokimyasal İncelemeler**

İmmunohistokimyasal incelemeler etkenin belirlenmesi için kullanılabilir. Etkene ait antijen doku içinde ve doku dışında bu yöntemle tespit edilebilmektedir (Humphrey ve Weiner, 1987). Bununla birlikte immunohistokimyasal

olarak çeşitli antikorların kullanılması hastalığın gelişimi için önemli detaylar vermektedir.

### 1.5.5. Interferon $\gamma$ Testleri

Teşhiste kullanılan PPD testlerinin pratik uygulanmasında ve sonuç alınmasında çeşitli sorunlar nedeniyle hastalığa karşı verilen immunolojik tepkilerin ölçülmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmektedir. Bu amaçla ABD’de PPD testleriyle birlikte in vitro IFN- $\gamma$  testleri sığır, keçi ve buffalo gibi hayvanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (O’Brien ve ark., 2009; Palmer ve ark., 2000; Palmer ve ark., 2001 ve Palmer ve ark., 2004).

IFN- $\gamma$  testlerinde, lenfokin IFN- $\gamma$ ’nın salınımı tam-kan kültür sistemleriyle ölçülmektedir. Bu test, PPD-tüberkülin spesifik antijeniyle 16-24 saatlik inkübasyon periyodu sırasında lenfositlerden IFN- $\gamma$  salınımının ölçülmesine dayanır (Rothel ve ark., 1990). Bu testte avian ve mammalian PPD uyarımı sonrası IFN- $\gamma$  seviyelerine bakılmaktadır. Bu amaçla tam-kan alınmakta ve alınan numunenin laboratuvara bir günü geçmeyecek şekilde en kısa sürede iletilmesi gerekmektedir (Coad ve ark., 2007 ve Ryan ve ark., 2000). Testin doğruluğu konusunda, özellikle nonspesifitenin yaygın olduğu yerlerde, doğruluyla ilgili bazı endişeler ortaya çıkmıştır. Ancak, IFN- $\gamma$  testinin erken enfeksiyonları tespit etme kapasitesi nedeniyle, PPD testiyle paralel olarak kullanılması, çevrede bulunan hayvanların enfeksiyon ve kontaminasyon kaynağı olmadan tespit edilmesine imkan sağlamaktadır (Gormley ve ark., 2006).

### 1.5.6. Lenfosit Proliferasyon Testleri

Teşhiste yardımcı bir testtir. Bu test PPD mammalian ve PPD avian'a karşı periferel kan lenfositlerinin reaktivitesini karşılaştırılmak için kullanılmaktadır. Tam kandan (Buddle ve ark., 2001) veya periferel kan örneklerinden pürifiye edilmiş lenfositlerle test yapılabilmektedir (Griffin ve Buchan, 1994). Bu tip testlerde hayvanın maruz kalabileceği non-patojenik mikobakteri türleriyle ilişkili çapraz reaksiyon veren antijenlerin ya da non-spesifik lenfosit reaksiyonların elimine edilmesi için çaba harcanmaktadır. Yapılan testin bilimsel değeri olmasına rağmen, pahalı olması, uzun inkübasyon süreleri, radyoaktif nükleotit kullanımı, lojistik sorunları ve laboratuarda uygulanması zor olduğundan rutin olarak kullanılmamaktadır. Alınan tam kanın ya da pürifiye edilmiş lenfositlerin, testin doğruluğu için kısa sürede işleme alınması gerekmektedir. Bu test yaban ve hayvanat bahçesinde bulunan hayvanlarda hastalık teşhisinde kullanışlı olabilmektedir. Griffin ve ark. (1994) tarafından yapılan bir çalışmada, lenfosit proliferasyon testi ve ELISA'yı içeren kan testlerinin geyiklerde *M. bovis* enfeksiyonun teşhisi için yüksek sensitive ve spesifiteye sahip olduğu gösterilmiştir.

### 1.5.7. Mikrobiyolojik Kültürler

Taze dokudan yapılan testlerdir. Dokuda yapılırken ilk aşamada dokuların homojenize edilip, asit (%5 oksalik asit), alkali (%2-4 sodyum hidroksit) ya da bir deterjanla (%0,375-0,75 HPC) dekontamine edilmesi gerekmektedir. Doku ve dekontaminasyon için kullanılan sıvılardan oluşan süspansiyon daha sonra santrifüje edilerek, çıkan süpernatant atılarak, sediment kültür için kullanılır. Yapılan kültürün doğruluğu için, tüberkülinle pozitif hayvanlardan ya da interferon testinin pozitif olduğu hayvanlardan kafa ve toraks bölgesindeki lenf düğümlerinde örnek alınmalıdır. Primer izolasyon için sediment yumurta bazlı katı kültüre inoküle edilir. Agar ya da kan bazlı kültürler de kullanılabilir (Cousins ve ark., 1998). Kültürler 37 °C'de

en az 8 hafta (tercihen 10-12 hafta) inkübe edilmelidir. Genellikle büyüme 3-6 haftada görünür hale gelebilmektedir. Kültürün kurumasını önlemek için sıkıca kapatılmalıdır. Makroskopik olarak büyüme görüldüğünde, sürme preparatları hazırlanarak Ziehl-Neelsen boyamasıyla preparat kontrol edilir. Asit-fast etkenler görülerek tanı konulmaktadır (Alt-Khaled ve Enarson, 2003).

### **1.5.8. Nükleik Asit Tanıma Teknikleri**

*M. tuberculosis* kompleks isolatlarının hızlı identifikasyonunda PCR, Gen Probe TB Complex gibi yöntemler ve MPB70 ve 38 kDa antijeni gibi proteinler kullanılabilir. PCR yöntemi, insanlardan ve hayvanlardan alınan tükürük örneklerinde teşhis için yaygın olarak tercih edilmektedir. Son zamanlarda tespit edilen ya da taze dokulardan da teşhis için ticari olarak bulunan kitler değerlendirilmeye alınmıştır. Ancak mevcut yöntemlerle, dondurulmuş ya da borik asitle tespit edilmiş dokularda tatmin edici olmayan sonuçlar elde edilmiştir (Noordhoek ve ark., 1996). Etkenin az sayıda olması sonucu ortaya çıkan yanlış-pozitif ya da yanlış-negatif sonuçlar testin güvenilirliğini azaltmaktadır. Ancak, *M. bovis*'in genomu sekanslanması PCR deneylerinin geliştirilmesi için imkân sağlamaktadır (Garnier ve ark., 2003).

### **1.5.9. *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks Enfeksiyonlarının Tanısında Kullanılan Sitokinler**

Tüberkülozda hem doğal hem de kazanılmış direnç mekanizmaları savunmada önemlidir. Konak, etkene karşı pro ve anti-inflamatuvar sitokin ve kemokin ağıyla cevap verir. İmmün sistem, doğal ve sonradan kazanılmış immünite olmak üzere iki ana bölümde incelenir. Günümüzde tüm hayvan ve bitkilerde mevcut olan doğal immünite, patojenlerin tanınması için Toll-like Receptors ailesini kullanır. TLR-2, DC

myeloid öncü hücrelerinin antijen sunan hücrelere dönüşümdeki rolüyle Tüberküloz'a karşı önemli bir rol oynamaktadır. Bunun yanında LAM'a karşı TLR-2 yoluyla lipid-reaktif T hücreleri üretilmektedir (Bourne, 2018 ve Humphrey ve Weiner, 1987). TLR4 ise TLR ailesine ait bir transmembran proteindir. TLR4 aktivasyonu sonrası NF- $\kappa$ B hücre içi sinyal yolu aktive olarak, doğal bağışıklık sistemini aktive etmekten sorumlu olan yangısal sitokin üretimi uyarılır (Miossec ve ark., 2009). B lenfositlerden salgılanan TLR4'ün bilinen bir diğer özelliği de *M. bovis* etkenin duvarında bulunan lipoarabinomannan maddesiyle benzerlik gösteren lipopolisakkariti tanınmasıdır (Brubaker ve ark., 2015 ve Vaure ve Liu, 2014).

Interferonlar, organizmada bakteri, virüs, tümör, parazit gibi yabancı etkenlere karşı yanıt olarak konak hücreler tarafından üretilen ve salınan protein grubudur (De Andrea ve ark., 2002). IFN, organizmada patojene karşı savunmanın uyarılması için immun sistem hücreleri arasındaki iletişimi kuran sitokinlerdendir (Parkin ve Cohen, 2001). Tüberküloz'a karşı da oluşan etkinin temeli T lenfositlerden tarafından IFN- $\gamma$  salgılanarak makrofajların aktif edilmesidir (Flynn ve Chan, 2001). CD119, makrofajlarda yüzey reseptörü olan IFNGR1 geni tarafından kodlanan bir proteindir (Aguet ve ark., 1988; Anonim, 2020 ve Novick ve ark., 1987). Makrofajlarda bulunan heterodimerik gamma interferon reseptörü olan IFN- $\gamma$ R1'i kodlar (Anonim, 2020). CD119'da oluşan mutasyonlar mikobakteriyel enfeksiyonlara karşı duyarlılığı arttırmaktadır (Gross, 2017). Tüberküllerin çevresinde bulunan makrofaj ve lenfositlerle tüberküloza karşı etki sağlanmaktadır. Mikobakteriyel etkenlere karşı T lenfositlerin hazırlanması ise DC'ler tarafından yapılmaktadır. DC'ler tarafından antijenlerin alınması ve sonrası bölge lenf düğümlerine ulaşmasıyla MHC-I ya da MHC-II proteinleriyle T lenfosit matürasyonu uyarılmaktadır (Tailleux ve ark., 2003).

Interlökinler lökositlerden ve/veya diğer vücut hücrelerinden salgılanan bir grup sitokindir (Brocker ve ark., 2010). IL-15 ve IL-18, IFN-  $\gamma$ 'nın NK hücreleri ile tüberküloz enfeksiyonuna karşı CD8 T hücrelerinin regülasyonunda önemli bir rol aldığı bildirilmiştir. Ayrıca NK hücreleri tüberküloza karşı immun etkileri olan diğer bir hücre olan  $\gamma\delta$  T hücrelerinin de fonksiyonunu da artırır (Zhang ve ark., 2006).  $\gamma\delta$

T hücrelerinin sitotoksik etkileri ile mikobakteriyel etkenleri parçalayabilir (Nicod, 2007). Monosit ya da makrofajlar direkt olarak mikobakteriyel etkenleri öldüremez ya da gelişimlerini etkileyemez. Aktivasyonları için IL2, IFN- $\gamma$  ya da TNF- $\alpha$  gibi lenfositlerce salgılanan sitokinlere ihtiyaç duymaktadır (Pollock ve ark., 2001). İmmun sistemde sinyal molekülü olan bir IL2, mikrobiyal enfeksiyonlara karşı, organizmaya ait olan ve olmayan yapıların tanınmasında rol oynar. Th1 hücrelerinden salgılanarak lenfosit ve nötrofil lökosit aktivitelerinin düzenlenmesini sağlar (Liao ve ark., 2011). IL2 salgılanmasının latent enfeksiyonlar ve hastalığın çeşitli süreçlerinde biyomarker olarak kullanılması önerilmiştir (O'Brien ve ark., 2009; Palmer ve ark., 2000; Palmer ve ark., 2001; Palmer ve ark., 2004 ve Vordermeier ve ark., 2016). Interferon- $\gamma$  makrofajları aktifleştirerek TNF, toksik oksijen türleri, nitrik asit sentetaz üretimini uyarmaktadır. Sistemik yangılara etkiyen ve akut faz reaksiyonlarını oluşturan TNF- $\alpha$ , aktive olmuş makrofajlar, CD4+ lenfositler, NK hücreleri, nötrofil lökositler, mast hücreleri, eozinofiller ve nöronlar tarafından salgılanır (Chu, 2013). TNF- $\alpha$ , granülom oluşumunda bölgeye mononükleer hücreleri çekerek önemli bir rol oynar (Lukacs ve ark., 1994). IL4 ise farklılaşmamış Th hücrelerinin Th2 hücrelerine farklılaşmasını sağlayan bir sitokindir. Farklılaşan Th2 hücrelerinden IL4 salgılanmaya devam eder (Sokol ve ark., 2008). IL4'ün aktive T ve B lenfositleri proliferasyonu, B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşması gibi biyolojik rolleri vardır. Humoral ve kazanılmış immunitede kilit bir düzenleyicidir (Hershey ve ark., 1997). T helper 17 hücrelerinden salgılanan IL17 ise kemokinlerin indüksiyonunu sağlayarak yangı bölgesine makrofaj ve nötrofil lökositlerin çekilmesini sağlar (Miossec ve ark., 2009). Tüberkülozda IL17 sitokini hem koruyucu hem de zararlı yangısal reaksiyonların başlatılmasında önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle bTB enfeksiyonunda, enfeksiyon ve immün cevapla korumanın biyomarkeri olarak önerilmiştir (Waters ve ark., 2016).

CD3 immunohistokimya T hücresi markeri olarak kullanılmaktadır. Makrofajlar mikobakteriyel etkenlerle enfekte olduğunda IL-12 ve IL-18 salgılanarak CD4, CD8 ve natural killer T hücrelerini aktive ederek IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  salgılanmasını uyarır. CD3, tüberküloza karşı savunma mekanizmasında rol alan hem CD8 hem de CD4 T helper hücrelerinin aktivasyonunda rol oynamaktadır (Leong ve ark., 2003). Lenf düğümlerinde matürasyon sonrası CD4 ve CD8 T hücreleri kazanılmış

bağışıklıkta önemli rol oynar. Tüberküloz etkenine ve bunları fagosite eden makrofajlara karşı CD4 ve CD8 T lenfositlerin sitotoksik etkileri bulunmaktadır. CD8 T hücreleri CCL5 kemokini salgılayarak etkenle enfekte makrofajları etkiler (Rouramir ve ark., 2005).

NK hücreleri de etkene karşı bakteri parçalayıcı etkiler gösterir. Bu hücreler direkt olarak yabancı antijenlerin varlığında aktive olarak bakteriyel, viral ve parazitik patojenlere karşı immun düzenleyici sitokin salgırlar (Gerosa ve ark., 2002).

İmmunoglobulin hafif zinciri olan lambda zinciri ve B lenfositlerin yapısında bulunan polipeptit alt birimleridir (Katzmann ve ark., 2002). B hücrelerinin tüberküloz hastalığındaki etkinliği tam olarak bilinmemekle birlikte, tüberkül yapılarında gözlenmiştir (Palmer ve ark., 2022).

Yapılan çalışmada, doğal sığır tüberkülozunda oluşan tüberküllerin yapısının, patomorfolojik ve immunohistokimyasal olarak detaylı araştırılması amaçlanmıştır.

Elde edilen sonuçlarla konağın savunma sistemine ilgili yorumlarda bulunabilecektir. Elde edilen sonuçların immunité tipi hakkında da bazı yorumlara ve tedavi yöntemlerine katkı sağlayacağı şüphesizdir. Sonrasında yapılacak ya da yapacağımız çalışmalara da ışık tutacağı düşünülmektedir.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

Çalışmanın materyalini; İç Anadolu Bölgesi'nde bulunan özellikle Ankara ve çevre illerin mezbahalarında, bTB hastalığı nedeniyle kesime gelen ve lezyon görülen 100 adet hayvanın akciğer ve mediastinal lenf düğümleri oluşturdu. Ayrıca farklı dönemlerde kesilen sağlıklı 5 adet besi sığırının akciğer ve mediastinal lenf düğümleri kontrol grubu olarak alındı.

Sunulan çalışma, Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 15.09.2018 gün ve 2018-177-108 sayılı kararı kapsamında gerçekleştirildi.

Yapılan çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 16.09.2019 tarihli 19L0239006 kodlu Doktora Projesi ve Ankara Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Kurum Koordinasyon Birimi tarafından desteklendi.

### 2.2. Çalışmada Kullanılan Belirteçler ve Kitleler

İmmunohistokimyasal incelemelerde belirteç olarak *Mycobacterium bovis*, CD3, CD68, CD119, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-17, Lambda Chain ve TLR4 antikorlarından yararlanıldı (Çizelge 2.1). Çalışmada immunohistokimya kiti olarak da UltraVision Quanto Detection System (Thermo Scientific, Astmoor, England) kullanıldı.

**Çizelge 2.1.** Kullanılan antikorlar ve özellikleri.

Antikorlar	Klon	Marka ve Katalog No
<i>M. bovis</i>	Polyclonal	ThermoFisher – BS-4622R
CD3	Polyclonal	Biorbyt – orb348965
CD68	M0718	Dako - M0718
CD119	BB1E-2	NovusBio – NB100-64793
TNF- $\alpha$	Polyclonal	Biorbyt – orb11495
IL-2	Polyclonal	MyBioSource – MBS2027352
IL-4	701214	R&D Systems – 2469-L
IL-17	Bo-IL-17A	NovusBio – NBP2-60988
Lambda Chain	Polyclonal	Biogenex – Ar049-5r
TLR4	Polyclonal	Biorbyt – orb137214

## 2.3. Yöntem:

### 2.3.1. Makroskobik İncelemeler

Öncelikle lezyonların akciğer ve mediastinal lenf düğümlerindeki lokalizasyonları, dağılımı, kıvam, renk ve kesit yüzleri detaylı olarak incelendi. İnceleme sonucunda lezyonlar morfolojik özelliklerine göre prodüktif ve eksudatif tüberküloz olarak gruplandırıldı ve gerek görülenler resimlendi. Prodüktif lezyonlar buldukları organlara göre de primer odak, primer kompleks ve tam olmayan primer kompleks şeklinde kategorize edildi. Sonrasında lezyonlu alanlardan alınan örnekler ve kontrol doku örnekleri fikzasyon amacıyla %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda (pH=7,2-7,4) 24 saat bekletildi. Lezyonlu bölümlerden yapılan kesitler rutin doku takibine alındı.

### 2.3.2. Histopatolojik İncelemeler

Tespit edilen dokular rutin doku takip cihazına (Leica TP1020) alınarak parafinde bloklandı (ThermoElectron Corp. Shandon Histocentre 3). Her bir bloktan 5 µm kalınlığında (Leica RM2255) kesitler hazırlandı.

#### 2.3.2.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması

Alınan kesitler deparafinizasyon ve rehidrasyon aşamalarından sonra Harris'in HE yöntemiyle boyanarak (Leica ST5020); otomatik kapatma makinesinde (Leica CV5030) lamel ile kapatıldı. Hazırlanan kesitlerin mikroskopik incelenmesinde prodüktif lezyonlar Johnson ve ark. (2006) ve Wango ve ark. (2005)'nin belirttiği kriterlere göre sınıflandırıldı.

Buna göre (Şekil 2.1):

**I. Evre (Epiteloid tüberkül):** Çok sayıda epiteloid makrofaj kümeleri, lenfositler ve nötrofil lökositlerden ibarettir. Langhans tipi dev hücreleri görülebilir. Kapsül ve nekroz yoktur.

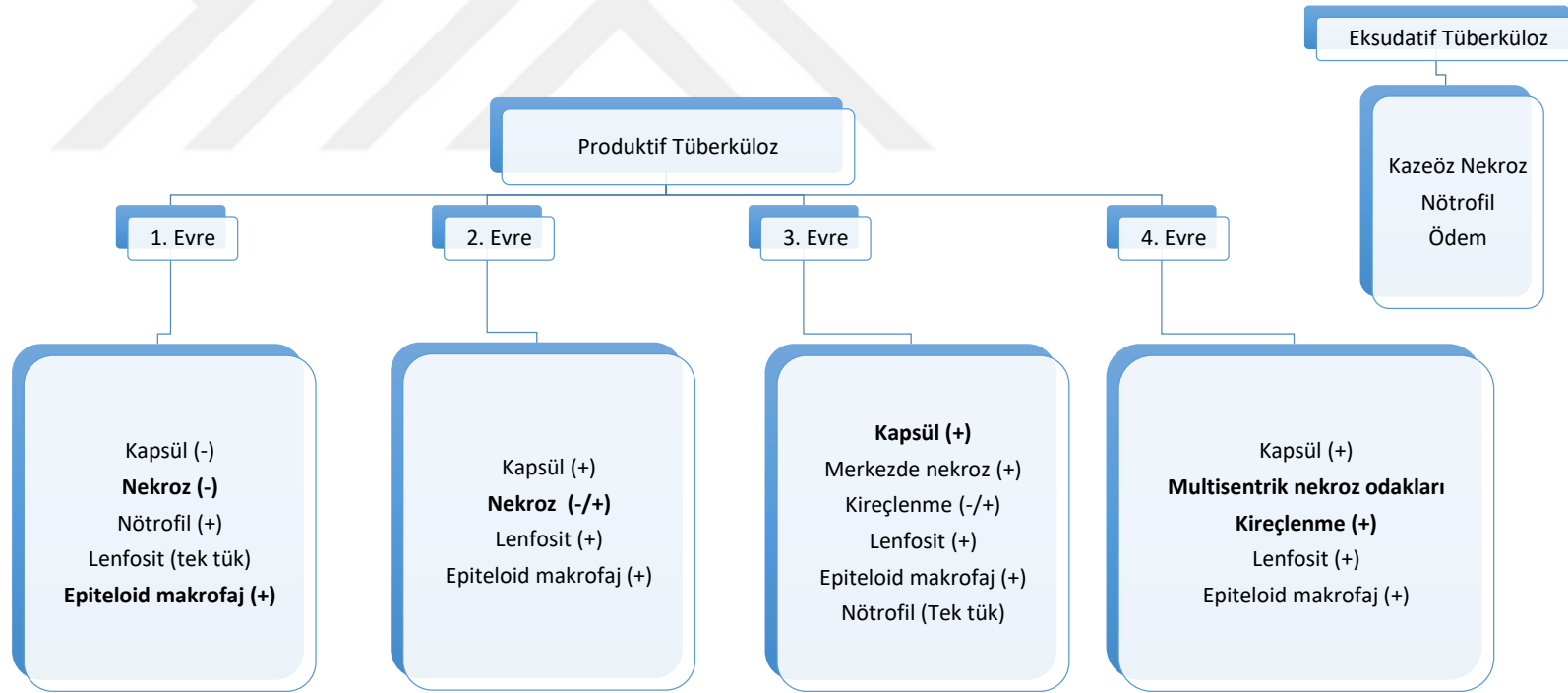
**II. Evre:** Kısmen veya tamamen ince bağ doku kapsülü ile çevrili, yoğun olarak epiteloid makrofajlardan oluşur. Sıklıkla lenfosit, nötrofil lökosit infiltrasyonlarıyla birlikte Langhans tipi dev hücreleri ve kanamalar görülebilir. Küçük bir alanda nekroz eşlik edebilir.

**III. Evre:** Granülomun merkezinde kazeöz nekroz, kireçlenme; nekrozun etrafında epiteloid makrofajlar, Langhans tipi dev hücreler, lenfositlerle karışmış

makrofajlar ve tek tük nötrofil lökositler görülebilir. Tüm bu yapıları en dışta fibröz bir kapsül sınırlar.

**IV. Evre:** Etrafı kalın bağ dokusuyla çevrili, geniş ve düzensiz, yer yer kalsifiye multisentrik nekroz odaklarına sahip granülomlardır. Nekrozun etrafında 3. Evrede olduğu gibi epiteloid makrofajlar ve Langhans tipi dev hücreleri görülür. Bağ dokusuna yakın alanlarda lenfosit kümeleri vardır.





Şekil 2.1. Mikroskopik olarak produktif lezyonlar ve evrelendirme kriterleri (Johnson ve ark., 2006 ve Wangoo ve ark., 2005).

### 2.3.2.2. Ziehl Neelsen Boyaması

Histopatolojik incelemeler için hazırlanan bloklardan alınan kesitlerde ZN boyaması yapıldı. Bu amaçla ateşten geçirilen kesitlerde deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemleri sonrası Carbol Fuchsin solüsyonuyla 30 dakika boyandı. Akarsuda yıkama sonra fazla boyanın uzaklaştırılması amacıyla %1'lik asit alkolle kontrollü şekilde işlem gördü. Tekrar akarsuda yıkama sonrası 30 saniye metilen mavisinde boyanan dokular, dehidrasyon ve temizleme işlemleri sonrası entellanla kapatıldı (Vasanthakumari ve ark, 1986).

### 2.3.3. İmmunohistokimyasal İncelemeler

#### 2.3.3.1. İmmunoperoksidaz Boyama

Bu boyamada, kit prosedürü yer yer modifiye edilmek suretiyle Avidin Biotin Kompleks Peroksidaz (Avidin Biotin Complex Peroxidase) yöntemi kullanıldı. Bu amaçla histopatolojik incelemeler için hazırlanmış olan parafin bloklardan adhezivli (APES) lamlara alınan doku kesitlerine deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemleri sonrası, oda sıcaklığında endojen peroksidaz aktivitesinin önlenmesi amacıyla %3'lük hidrojen peroksit-metanol karışımında (20 dakika) tutuldu. Daha sonra primer antikorlara (*M. bovis*, CD3, CD68, CD119, TNF- $\alpha$ , IL2, IL4, IL17, Lambda Chain, TLR4) uygun antijen retrieval yöntemi (Citrate Buffer ve EDTA buffer'la 100 °C'de 20 dakika kaynatılma sonrası, 20 dakika oda sıcaklığı) uygulandı (Çizelge 2.2). Non-spesifik bağlanmaları engellemek için protein blocking serumunda 10 dakika 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Nem kamarasına alınan kesitler üzerine primer antikorlar damlatılarak inkübasyon gerçekleştirildi. Takiben biyotinize antikor ve strepavidin-peroksidaz ile 37 °C'de 15 dakika inkübasyon yapıldı. Daha sonra AEC solüsyonunda 10 dakika 37 °C'de inkübasyon yapıldıktan sonra, Mayer'in Hematoksilende 3

dakika bekletildi. Akar çeşme suyunda 3 dakika yıkandıktan sonra gliser jel ile kapatıldı. Protein blocking adımı hariç belirtilen tüm aşamalar arasında dokular PBS (pH: 7,4, 2x5 dk) ile yıkandı.

Negatif kontrol için primer antikor yerine fare ve sıçan serumuyla (Çizelge 2.2) inkübasyon gerçekleştirildi. Pozitif kontrol amacıyla sığır mediastinal lenf düğümü kullanıldı. Görüntüleme sonucu hedef hücrelerdeki boyamalar immunpozitifliğin yaygın ve yoğun boyanma özelliğine göre x40 objektifte güçlü veya zayıf olarak belirtildi.

Tüm boyamalar (HE, ZN, IP) ışık mikroskobu altında (Leica DM4000) değerlendirilerek, gerekli görülenler ise fotoğraflandı (Leica DF-280).

**Çizelge 2.2.** İmmunperoksidaz boyamalarda kullanılan antikorlar ve uygulanan metotlar.

Antikor	Klon	Sulandırma Oranı	Antijen Retrieval	İnkübasyon Süresi
<i>M. bovis</i>	Polyclonal	1:100	Citrate buffer	1 saat (37 °C)
CD3	Polyclonal	1:100	Citrate buffer	Gece boyu (4 °C)
CD68	M0718	1:100	EDTA Buffer	Gece boyu (4 °C)
CD119	BB1E-2	1:200	EDTA buffer	Gece boyu (4 °C)
TNF- $\alpha$	Polyclonal	1:200	Citrate Buffer	Gece boyu (4 °C)
IL-2	Polyclonal	1:200	Citrate Buffer	Gece boyu (4 °C)
IL-4	701214	8 ng/ml	Citrate Buffer	Gece boyu (4 °C)
IL-17	Bo-IL-17A	1:400	Citrate buffer	Gece boyu (4 °C)
Lambda Chain	Polyclonal	Ready-to-Use	Citrate buffer	Gece boyu (4 °C)
TLR4	Polyclonal	1:200	Citrate buffer	Gece boyu (4 °C)
Rabbit IgG	Monoclonal	1:100	Citrate/EDTA buffer	1 saat (37 °C) Gece boyu (4 °C)
Mouse IgG	Monoclonal	1:100	Citrate/EDTA buffer	1 saat (37 °C) Gece boyu (4 °C)

### 2.3.3.2. Konfokal Mikroskopi İncelemeleri

Konfokal mikroskopta yapılan incelemeler için IF boyama yöntemi uygun görüldü. Histopatolojik incelemelerde “primer kompleks” tanısı konulmuş hayvanlardan seçilen dokulardan (akciğer ve mediastinal lenf düğümü [n:10]) histokimyasal incelemeler için hazırlanmış olan parafin bloklardan adezivli (APES) lamlara 10 µm kalınlığında kesit alındı. Daha sonra tüm preparatlar IF yöntemi ile boyandı. Bu amaçla alınan kesitlerde deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemleri sonrası, antigen retrieval (Citrate Buffer, pH 6, 20 dakika kaynatma ve 20 dakika oda sıcaklığında soğutma) uygulandı. Daha sonra protein blokaj serumunda inkübe edilerek (37 °C, 10 dakika) primer antikorda (*M. bovis*, TNF- $\alpha$ , CD3) Çizelge 2.2’de belirtilen süre ve sıcaklıklarda inkübasyon sonrası Mouse anti-rabbit IgG CFL 488 damlatılarak inkübasyon (37 °C, 1 saat) uygulandı. Primer antikor inkübasyonu sonrası görüntülenecek sekonder antikor için tekrar protein blocking serumunda inkübasyon sonrası (37 °C, 10 dakika) sekonder antikora (IL-4 ve IL-17) Çizelge 2.2’de belirtilen uygun süre ve sıcaklıklarda inkübasyon uygulanarak, Goat anti-mouse IgG CFL 594 serumunda inkübe (37 °C, 1 saat) edildi. Sonrasında DAPI’de 1 saat oda ısısında inkübe edildi ve su bazlı kapatıcı ile preparatlar kapatılarak farklı dalga boylarında (Çizelge 2.3) konfokal mikroskopta (Carl Zeiss LSM 880) incelendi. Protein blocking adımı hariç belirtilen tüm aşamalar arasında dokular PBS (pH: 7,4, 2x5 dakika) ile yıkandı.

**Çizelge 2.3.** Konfokal mikroskobik incelemelerde kullanılan ikili antikor eşleştirilmesi.

Primer antikor	Sekunder Antikor	İncelenen Dalga Boyları
<i>M. bovis</i>	IL-4	488-594
<i>M. bovis</i>	IL-17	488-594
TNF- $\alpha$	IL-4	488-594
CD3	IL-4	488-594

### 2.3.4. Morfometrik İncelemeler

Morfometrik incelemeler için ışık mikroskobunda x40'luk objektif ile LAS 4.13 (Leica) programında 3648x2376 pixel çözünürlüğünde çekilen resimlerde pozitif renk skalası manuel belirlenerek 1000 pixel üstü alanlar pozitif olarak kabul edildi. Analizde elde edilen değerlere sonrasında  $\pm$  standart hata oranları eklenerek kantitatif olarak değerlendirildi.

### 2.3.5. İstatistiksel İncelemeler

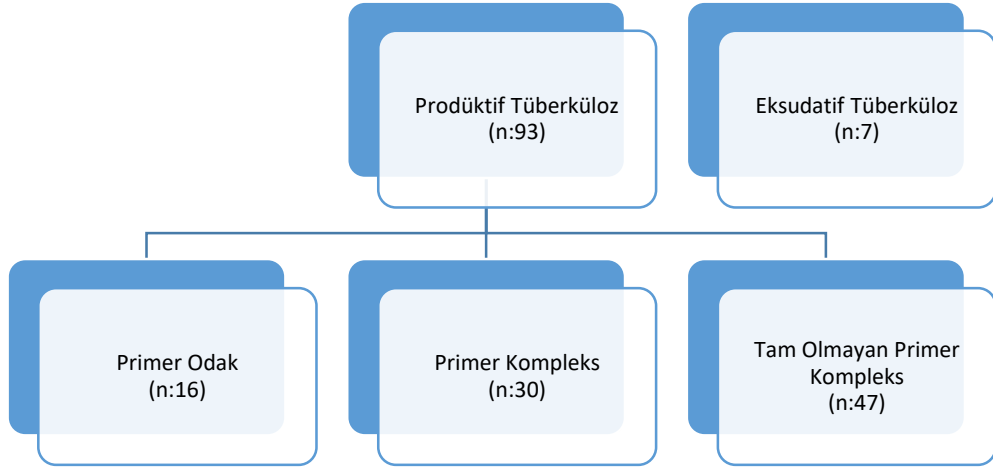
Morfometrik incelemelerde elde edilen değerlerde grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis Testi (Ostertagová ve ark, 2014), gruplar içi çoklu karşılaştırmalarda ise post-hoc Dunn testinden yararlanıldı (SPSS 12.0, IBM).

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Makroskopik Bulgular

Yapılan incelemeler sonrası akciğer ve/veya mediastinal lenf düğümlerinde görülen lezyonlar morfolojik olarak prodüktif (n:93) ve eksudatif (n:7) lezyonlar olmak üzere 2 grupta değerlendirildi (Şekil 3.1). Prodüktif lezyonlara hem akciğer hem de mediastinal lenf düğümünde (primer kompleks, n:30), sadece akciğer (primer odak, n:16) veya mediastinal lenf düğümünde (tam olmayan primer kompleks, n:47) rastlandı.

Eksudatif lezyonlara ilgili değişiklikler ise akciğer ve lenf düğümlerinde gözlemlendi.

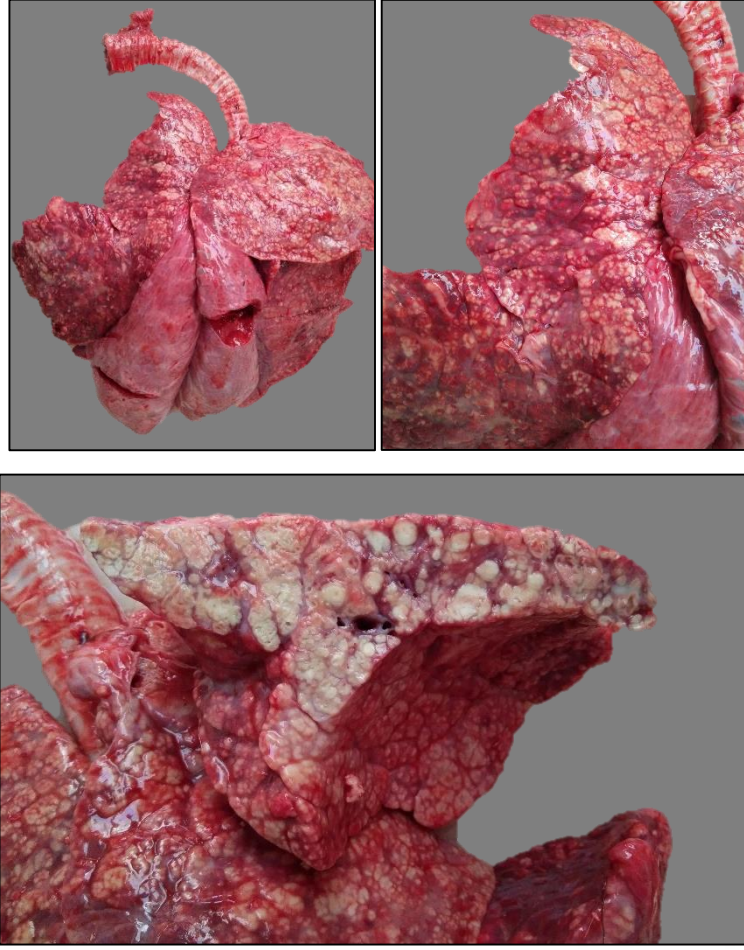


Şekil 3.1. Makroskopik incelemelerde saptanan prodüktif ve eksudatif lezyonlar.

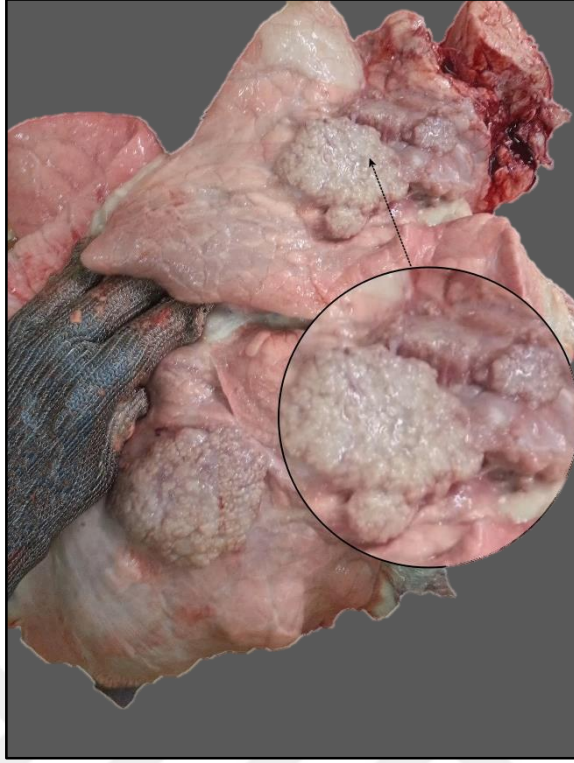
Akciğerlerin özellikle kraniyal loblarında bilateral olarak en küçüğü 2 milimetre, en büyüğü 3 santimetre boyutlarında, yüzeyden taşkın (Şekil 3.2), sarımsı/boz-beyaz renkte, çoğunlukla sert kıvamda, belirgin sınırlı tüberküller (prodüktif tip) gözlendi (Şekil 3.3). Bu tüberküllerin bazıları yüzeyden taşkın karnabahar görünümündeydi (Şekil 3.4) Lezyonların etrafında akciğer dokusunda belirgin çıtırtı sesi duyuldu. Bazı olguların bir kısmında (n:7) yer yer loblar arasında yapışmalar, plörada matlaşma ve kalınlaşmalar saptandı. Lezyonların kesit yüzünde merkezi sarı-yeşil renkte, koyu kıvamlı bıçağa bulaşan irin (n:22), bazı olgularda da sarımsı renkte kolaylıkla parçalanabilir kazeifiye (n:40) yapıdaydı.



**Şekil 3.2.** Yüzeyden taşkın tüberküller, akciğer.

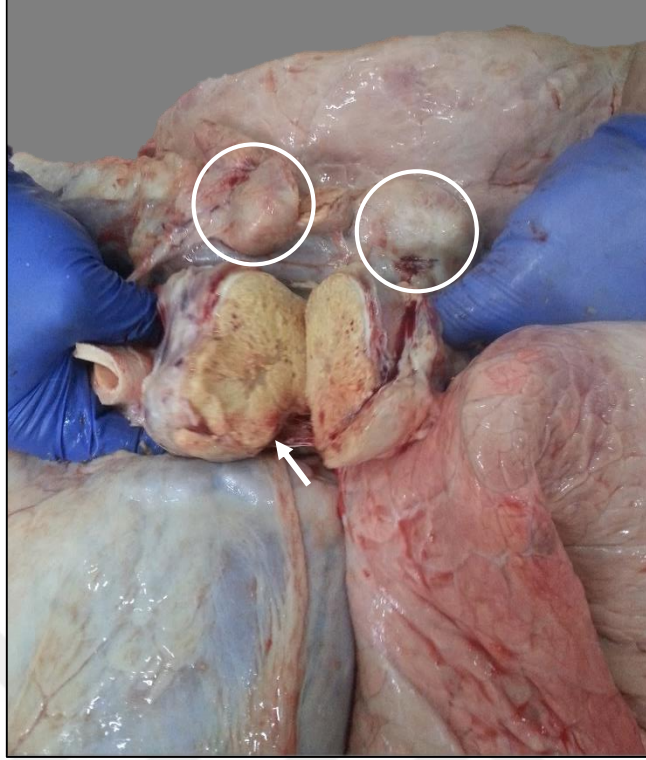


Şekil 3.3. Milier ve nodüler tüberküller ve kesit yüzleri, akciğer.

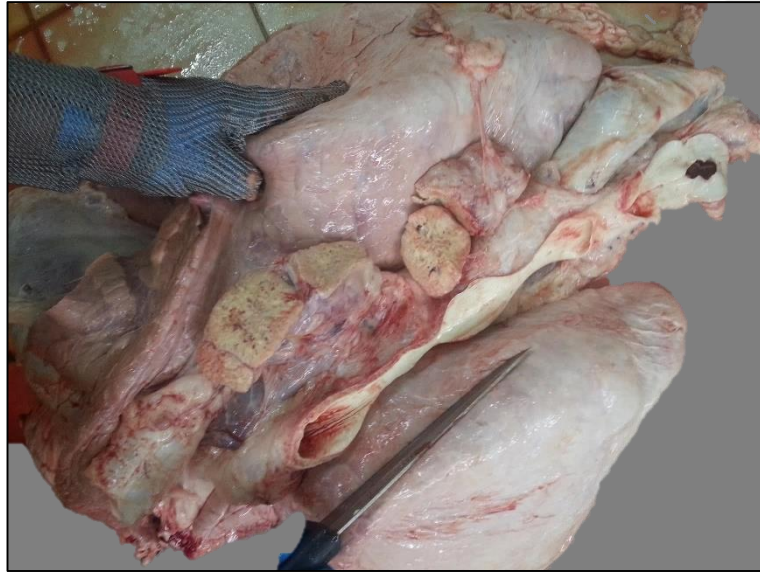


**Şekil 3.4.** Yüzeiden taşkın, karnabahar görünümünde tüberküller, akciğer.

Mediastinal lenf düğümleri birkaç katı büyümüşü. Yaygın şekilde en küçüğü 4 milimetre en büyüğü, 4 santimetre olan yüzeiden taşkın, sarımsı/boz-beyaz renkte çoğunlukla sert kıvamlı, tüberküller (Şekil 3.5) gözlendi. Bu lezyonlara kesit atarken yer yer çıtırtı sesi duyuluyordu. Lezyonların merkezi sarı-boz renkte yaygın kazeifiyeydi (Şekil 3.6) ve bıçağa sıvanıyordu (n:77). Bazılarında beyaz renkli granüller dikkati çekti (n:67). Bazılarında ise bu alanlar sarı-yeşil renkli akışkan, bastırılınca boşluklardan fişkırın irin (Şekil 3.7) içerdiği saptandı (n:24).



**Şekil 3.5.** Yüzeiden taşkın tüberküller (beyaz daire) ve birinin kesit yüzü kesit yüzü (beyaz ok), mediastinal lenf düğümü.

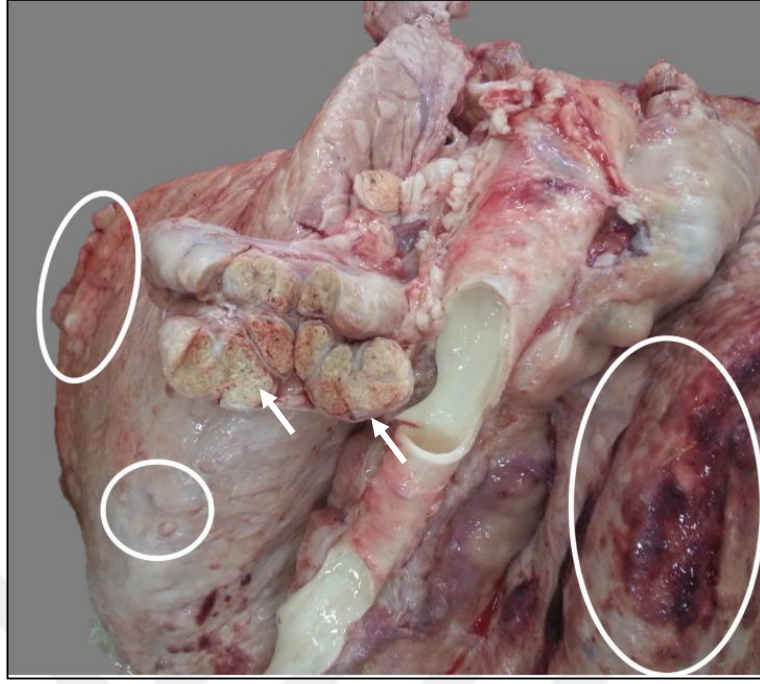


**Şekil 3.6.** Tüberküllerin kesit yüzü, mediastinal lenf düğümü.



**Şekil 3.7.** Tüberkülün kesit yüzünden sızan sarı-yeşil renkli irin, mediastinal lenf düğümü.

Bazı olgularda, akciğer ve mediastinal lenf düğümlerinde konglomere tüberküller gözlemlendi. Bunlar çoğunlukla yüzeyle taşkın ve/veya organlara gömülü vaziyetteydi (Şekil 3.8). Kesit yüzlerinde bağ dokusu ile sınırlandırılmış çok sayıda yine kendi içinde değişen kalınlıkta bağ dokusunun sınırlandırdığı tüberküller görüldü ve bunların bazı bölümleri kısmen kireç partikülleri içermekteydi.



**Şekil 3.8.** Yüzeyden taşkın tüberküller (beyaz daire) ve konglomere tüberküllerin kesit yüzü (beyaz oklar), akciğer ve mediastinal lenf düğümü.

Olguların bir kısmında, torakal boşlukta interkostal kaslarda en küçüğü 1 santimetre, en büyüğü 3 santimetre olan yüzeyden taşkın, sarımsı/boz-beyaz renkte çoğunlukla sert kıvamlı yüzeyden taşkın tüberküller (Şekil 3.9) gözlemlendi.



**Şekil 3.9.** İnterkostal kaslarda yüzeyden taşkın tüberküller, toraks.

Eksudatif lezyonlarda bilateral kranial loblarına yaygın boz-beyaz renkte genellikle yumuşak kıvamlı, düzensiz kenarlı kazeifiye alanlar gözlendi. Kesit yüzlerinden köpüklü ve bulanık sarı-yeşil renkte eksudat sızılmaktaydı. Mediastinal lenf düğümleri ise şişkin görünümde, kesit yüzü koyu renkli ve nemliydi.

Kontrol hayvanı olarak seçilen 5 hayvanda ise akciğer ve mediastinal lenf düğümlerinde makroskopik incelemelerde herhangi bir lezyona rastlanmadı.

## 3.2. Mikroskopik Bulgular

### 3.2.1. Prodüktif Tüberküloz

Makroskopik ve mikroskopik incelemeler sonrasında saptanan tüberküllerin yapısı mikroskopik olarak incelenerek, Johnson ve ark. (2006) ve Wangoo ve ark. (2005) kriterleri dikkate alınarak evrelendirilerek elde edilen veriler Çizelge 3.1’de özetlendi. Yapılan evrelendirmelerde her bir kesitte baskın olan evre baz alınarak sonuç verildi.

**Çizelge 3.1.** Evrelerine göre prodüktif lezyonların görülme sıklığı.

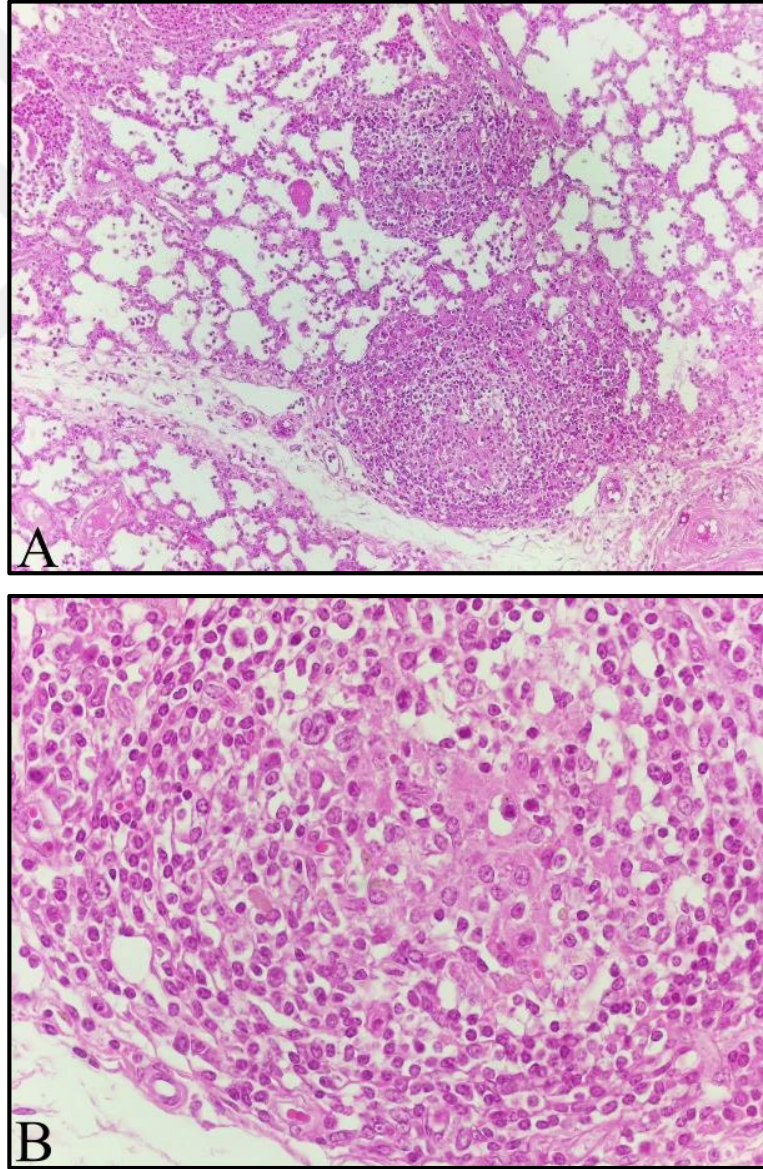
		1. Evre	2. Evre	3. Evre	4. Evre	Toplam
<b>Primer Odak</b>	Akciğer	2	3	5	6	16
	Akciğer	4	4	8	14	30
<b>Primer Kompleks</b>	Lenf Düğümü	-	1	2	27	30
<b>Tam Olmayan Primer Kompleks</b>	Lenf Düğümü	-	5	10	32	47
<b>Toplam</b>		6	13	25	79	

### 3.2.2. Primer Odak

Akciğerlerde farklı evrelerde (Çizelge 3.1) tüberküllerin yapıları tespit edilirken mediastinal lenf düğümlerinde nonspesifik değişiklikler görüldü.

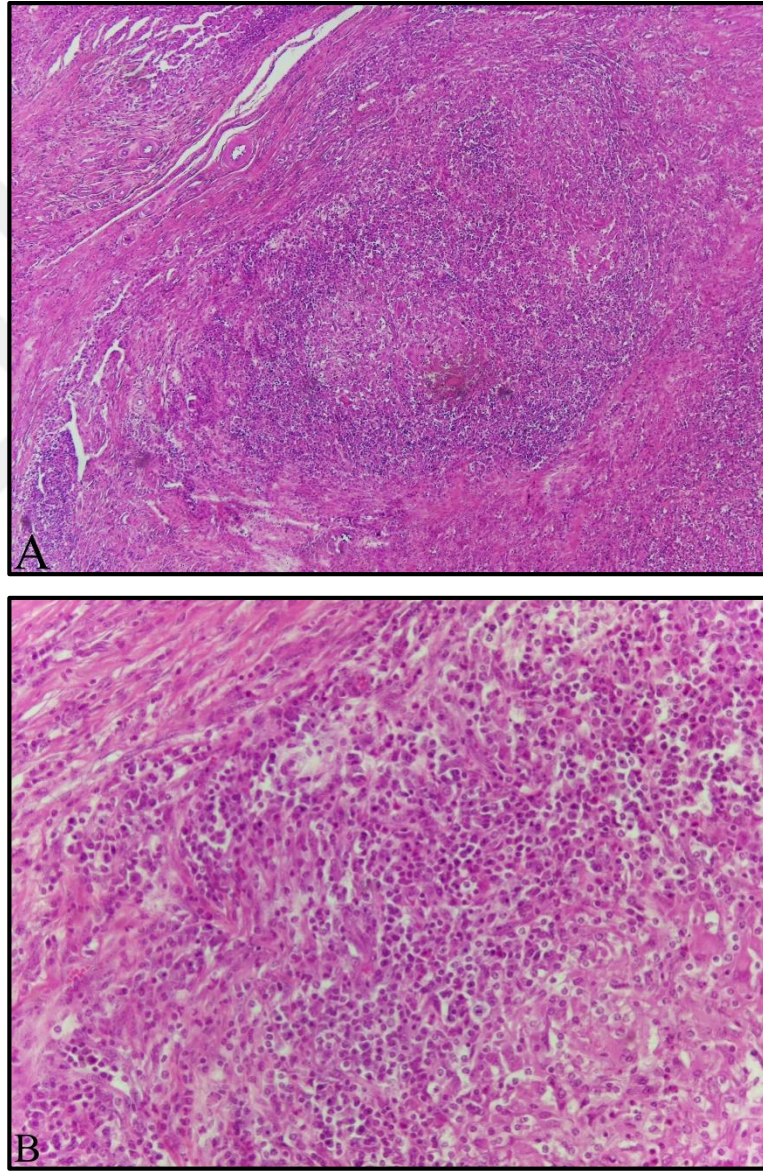
### 3.2.2.1. Akciğerler

**1. Evre granülomlar:** Merkezde çok sayıda epitelooid makrofajlar ve az sayıda lenfosit (Şekil 3.10) görüldü. Bunlara yoğun nötrofil lökosit infiltrasyonu (n:1) eşlik ettiği gözlemlendi. Tüberküllerin periferinde yer alan bronş, bronşiyol ve alveol lümenlerinde yoğun nötrofil lökosit infiltrasyonu ile homojen ödem (n:1); farklı bir olguda interalveoler alanlarda, damar, bronş ve bronşiyol çevrelerinde lenfosit ve makrofajlardan oluşan mononükleer hücre infiltrasyonları dikkati çekti.



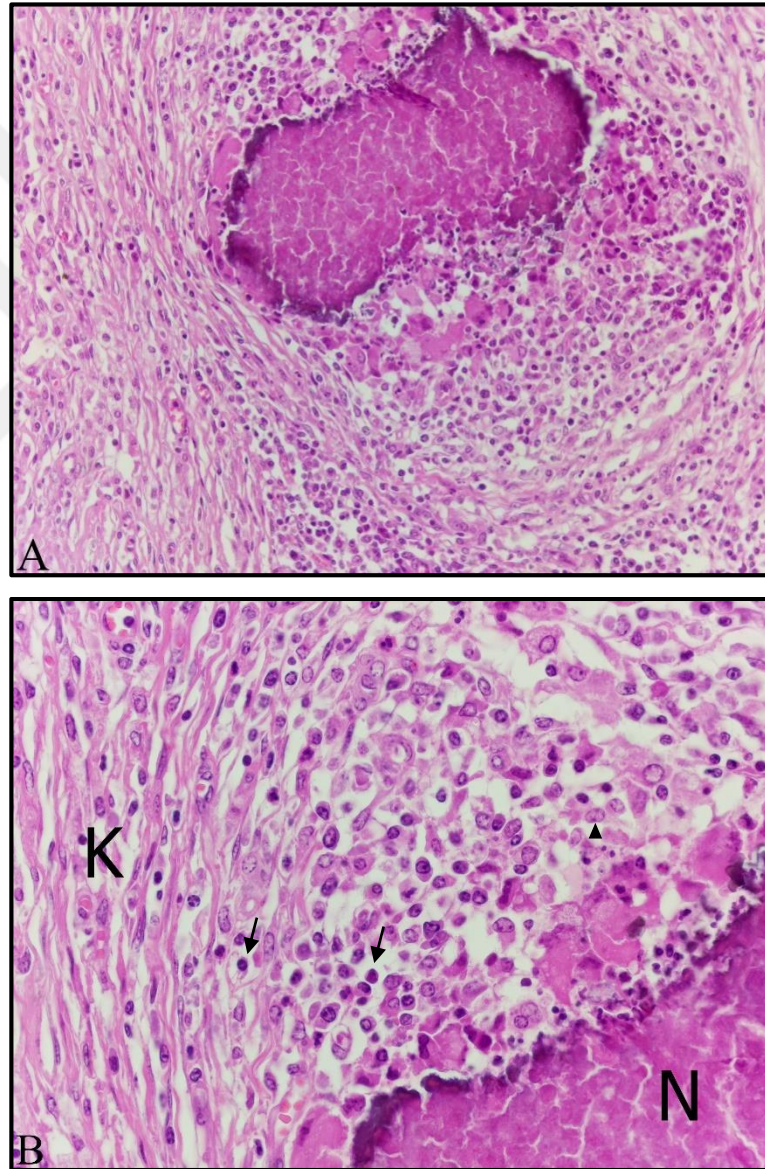
Şekil 3.10. I. Evre granülom, primer odak, akciğer, (A) x100, (B) x400, HE.

**II. Evre granülomlar:** Tüberküllerin merkezinde piknotik çekirdeklerinde yer aldığı kazeifiye alanlar, bunların etrafında nötrofil lökositler (Şekil 3.11) belirgindi. Ek olarak, epitelioid makrofaj (n:2), lenfosit ve makrofajlardan oluşan mononükleer hücre infiltrasyonları (n:2), ile Langhans tipi dev hücreler (n:2) vardı. Bunların etrafı fibrosit, fibroblast ve kollajen ipliklerden oluşan ince bir bağ dokudan kapsülle çevriliydi.



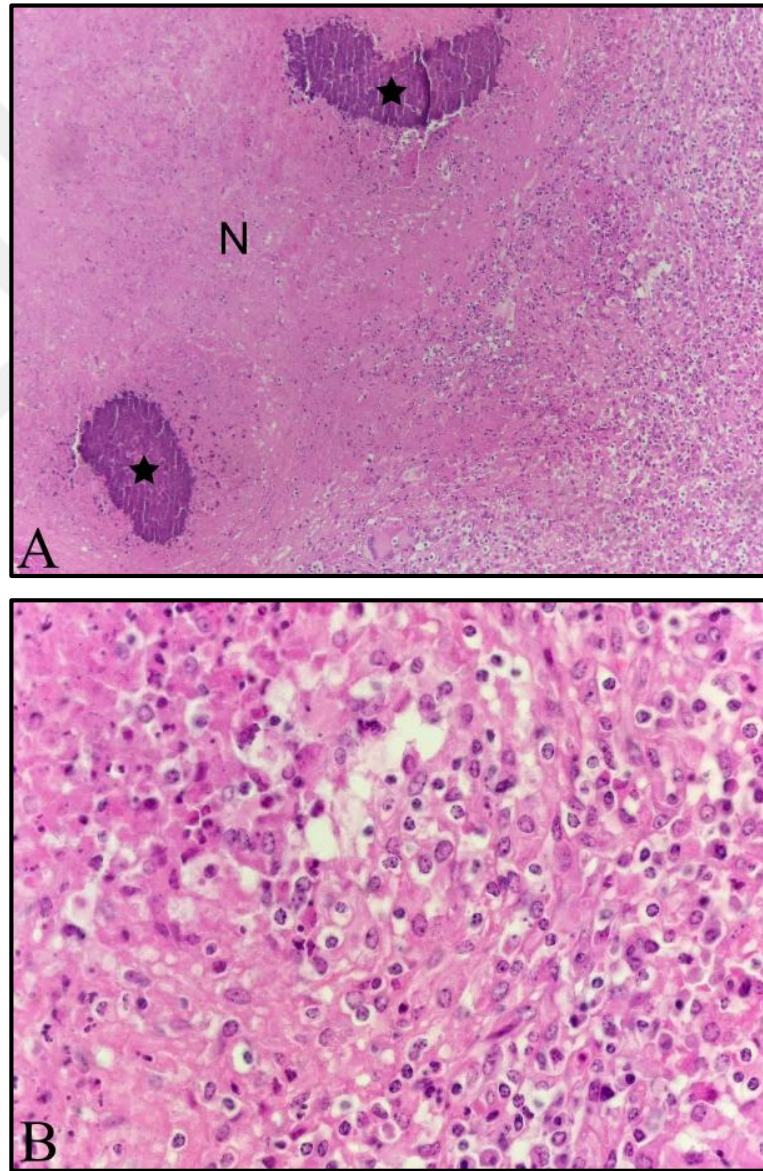
Şekil 3.11. II. Evre granülom, Primer odak, akciğer, (A) x50, (B) x200, HE.

**III. Evre granülomlar:** Merkezde piknotik hücreler, kazeifikasyon nekrozu ve kireçlenme (n:4) içeren; çevresinde epitelioid makrofaj, Langhans tipi dev hücre, makrofaj ve lenfositlerden oluşan mononükleer hücreler ve tek tük nötrofil lökosit infiltrasyonları görülen (n:3) ve etrafı fibrosit, fibroblast ve kollajen ipliklerinden oluşan ince (n:3) ve/veya kalın (n:3) bağ dokusundan kapsülle çevrili tipik tüberküller (Şekil 3.12) gözlemlendi. Ayrıca bir olguda bronş, bronşiyol ve alveol lumenlerinde yoğun nötrofil lökosit infiltrasyonları dikkati çekti.



**Şekil 3.12.** III. Evre granülom, primer odak, akciğer, (A) x100, (B) x400, HE [N: Nekroz alanı; K: Kapsül; Lenfosit (oklar); Makrofaj (ok başı)].

**IV. Evre granülomlar:** Birden çok odağa sahip geniş kazeifikasyon nekrozu, kireçlenme, piknotik hücreler içermektedir. Bunların çevresinde epitelioid makrofaj, Langhans tipi dev hücresi, çoğunluğu lenfosit ve makrofajlardan oluşan mononükleer hücreler (Şekil 3.13), az sayıda nötrofil lökosit (n:1), çevresi fibrosit, fibroblast ve kollajen ipliklerden oluşan kalın bir bağ dokusu ile çevrili düzensiz tüberkül yapıları gözlemlenir. Ayrıca bir olguda interalveoler alanlarda, bronş, bronşiyol ve damarların çevresinde çoğunluğu lenfositlerden oluşan mononükleer hücre infiltrasyonları görüldü. Başka bir olguda ise alveol lümenlerinde homojen ödem sıvısı görüldü.



**Şekil 3.13.** IV. Evre granülom, primer odak, akciğer, (A) x100, (B) x400, HE [N: Nekroz, Yıldız: Kireçlenme].

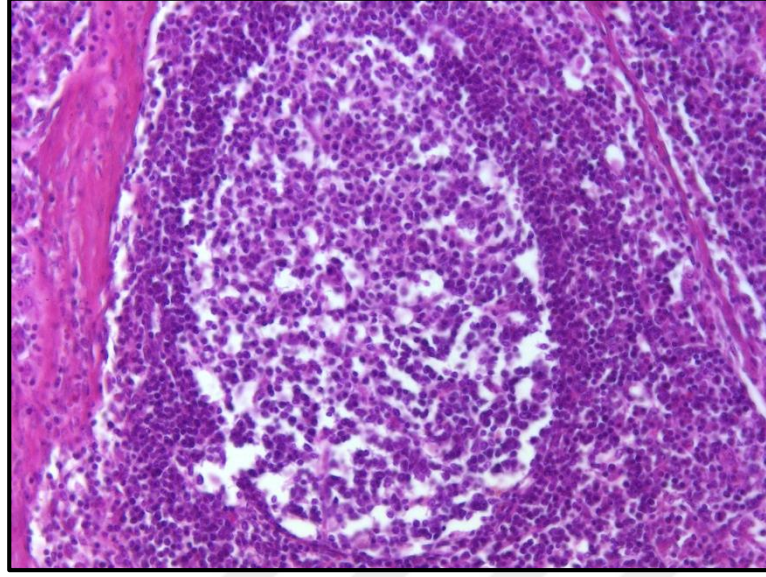
Primer odakta akciğerde görülen evrelere göre lezyonlar ayrıntılı olarak Çizelge 3.2'de özetlendi.

**Çizelge 3.2.** Primer odakta akciğerde görülen histopatolojik değişiklikler.

No	Nekroz	Kireç	Nötrofil	MNHİ	Epiteloid Makrofaj	Dev hücresi	Kapsül	Evre
POA-1	-	-	+	+	+	-	-	1
POA-2	-	-	-	+	+	-	-	1
POA-3	+	-	+	+	-	-	İnce	2
POA-4	+	-	+	-	+	+	İnce	2
POA-5	+	-	+	+	+	+	İnce	2
POA-6	+	-	+	+	+	+	Kalın	3
POA-7	+	+	-	+	+	+	İnce	3
POA-8	+	+	+	+	+	+	İnce	3
POA-9	+	+	+	+	+	+	İnce	3
POA-10	+	+	-	+	+	+	Kalın	3
POA-11	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
POA-12	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
POA-13	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
POA-14	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
POA-15	+	+	+	+	+	+	Kalın	4
POA-16	+	+	-	+	+	+	Kalın	4

### 3.2.2.2. Mediastinal Lenf Düğümleri

Mediastinal lenf düğümlerinde lenfoid hücrelerin azaldığı, retiküler çatının açığa çıktığı (Şekil 3.14), yer yer lenfoid foliküllerin düzensizleştiği (n:6), genişlemiş sinüslerde dökülmüş endotel hücreler, nötrofil lökosit (n:1), çoğunluğu lenfosit ve plazma hücrelerinden oluşan mononükleer hücre infiltrasyonları (n:5) gözlemlendi (Çizelge 3.3).



**Şekil 3.14.** Lenf foliküllerinde lenfoid hücrelerde azalma, primer odak, mediastinal lenf düğümü, x100, HE.

**Çizelge 3.3.** Primer odakta mediastinal lenf düğümlerinde görülen histopatolojik değişiklikler.

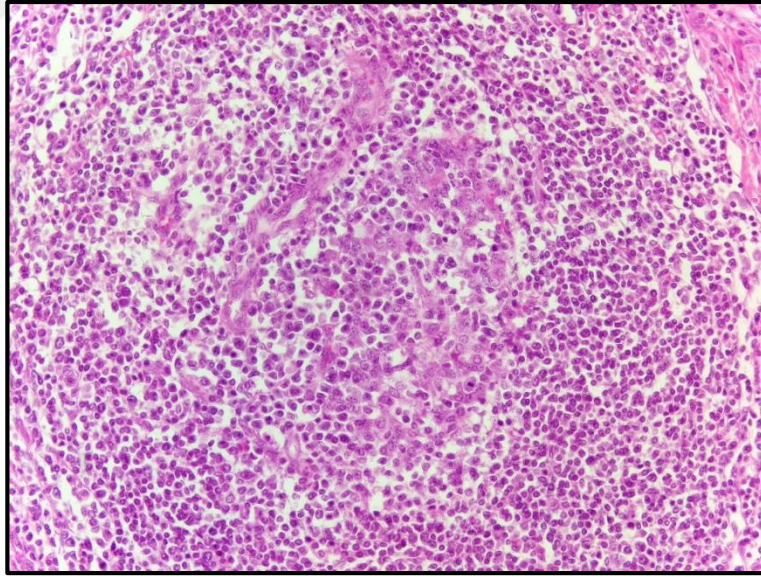
No	Nekroz	Kireç	Nötrofil	MNHİ	Epiteloid Makrofaj	Dev hücresi	Kapsül	Evre
POL-1	-	-	+	-	-	-	-	-
POL-2	-	-	-	+	-	-	-	-
POL-3	-	-	-	+	-	-	-	-
POL-4	-	-	-	+	-	-	-	-
POL-5	-	-	-	+	-	-	-	-
POL-6	-	-	-	+	-	-	-	-
POL-7	-	-	-	-	-	-	-	-
POL-8	-	-	-	-	-	-	-	-
POL-9	-	-	-	-	-	-	-	-
POL-10	-	-	-	-	-	-	-	-
POL-11	-	-	-	-	-	-	-	-
POL-12	-	-	-	-	-	-	-	-
POL-13	-	-	-	-	-	-	-	-
POL-14	-	-	-	-	-	-	-	-
POL-15	-	-	-	-	-	-	-	-
POL-16	-	-	-	-	-	-	-	-

### 3.2.3. Primer Kompleks

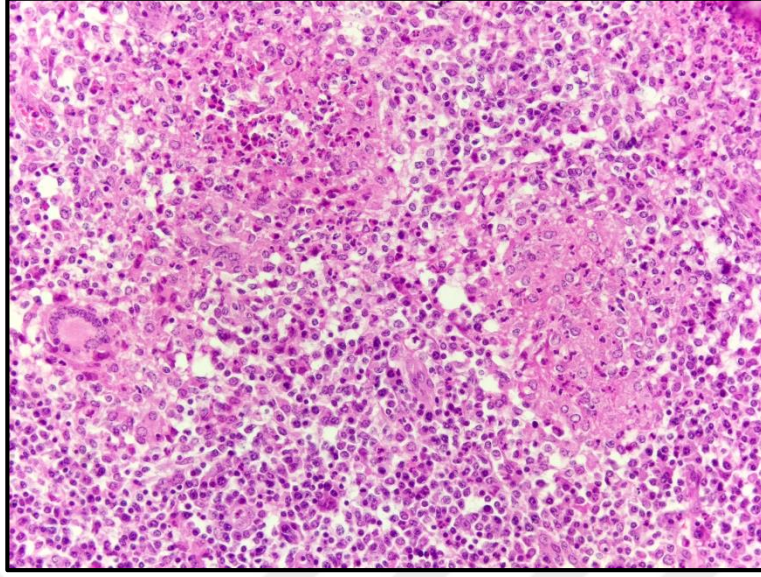
Hem akciğer hem de mediastinal lenf düğümlerinde değişik evrelerde granülomlar tespit edildi (Çizelge 3.1). Ancak akciğerlerde hemen hemen her evreye ait granülomlar var iken mediastinal lenf düğümlerinde I. evre hariç diğer tüm evrelerdeki granüomlara belirgin bir şekilde rastlandı.

#### 3.2.3.1. Akciğerler

**I. Evre granülomlar:** Merkezde çok sayıda epitelooid makrofajlar (Şekil 3.15), ve bunlara eşlik eden yoğun nötrofil lökosit infiltrasyonu (n:2) ile az sayıda lenfositler ile birlikte (n:2) tek tük Langhans tipi dev hücreleri (Şekil 3.16) (n:1) gözlemlendi.

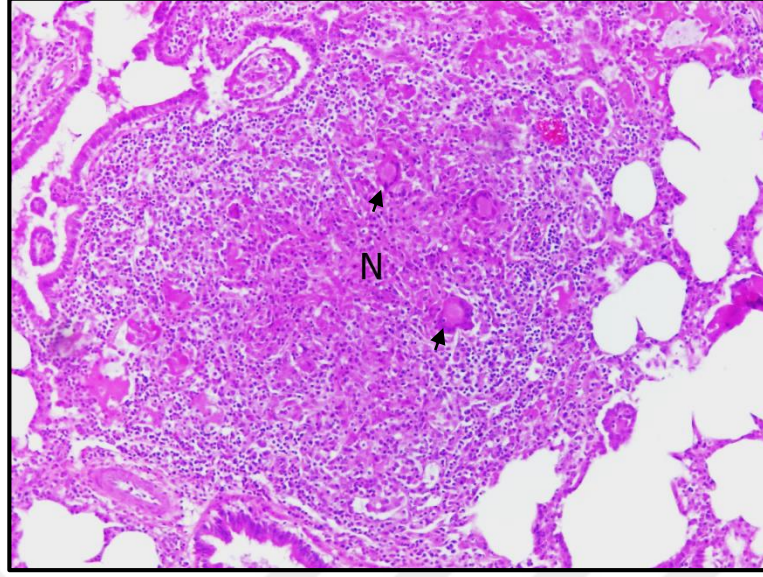


Şekil 3.15. I. Evre granülom, primer kompleks, akciğer, x200, HE.

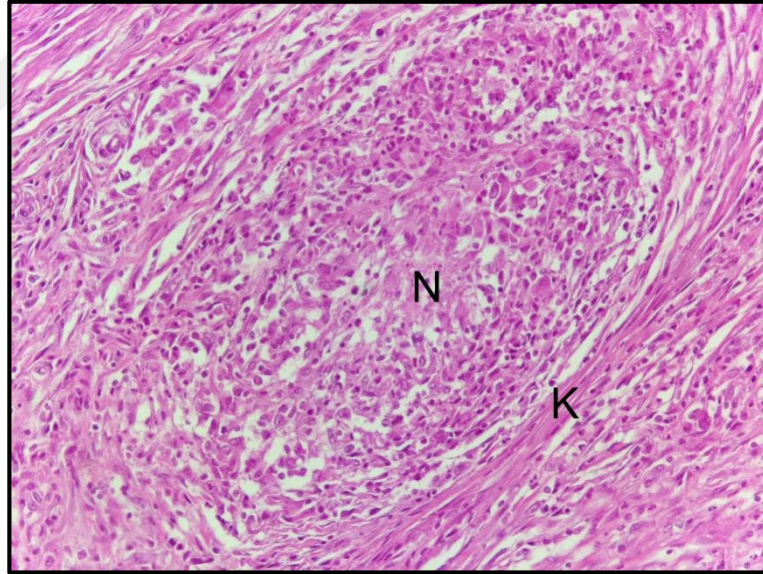


**Şekil 3.16.** I. Evre granülomlar, primer kompleks, akciğer, x200, HE.

**II. Evre granülomlar:** Tüberküllerin merkezinde yer yer piknotik çekirdeklerin eşlik ettiği belirgin kazeifiye alanlar, bunların etrafında nötrofil lökosit, epitelooid makrofaj, lenfosit ve makrofajlardan oluşan mononükleer hücre infiltrasyonları, Langhans tipi dev hücreleri (Şekil 3.17) vardı. Tüberküllerin etrafı ise fibrosit, fibroblast ve kollajen ipliklerden oluşan ince bağ dokudan kapsülle (n:2) çevriliydi (Şekil 3.18).



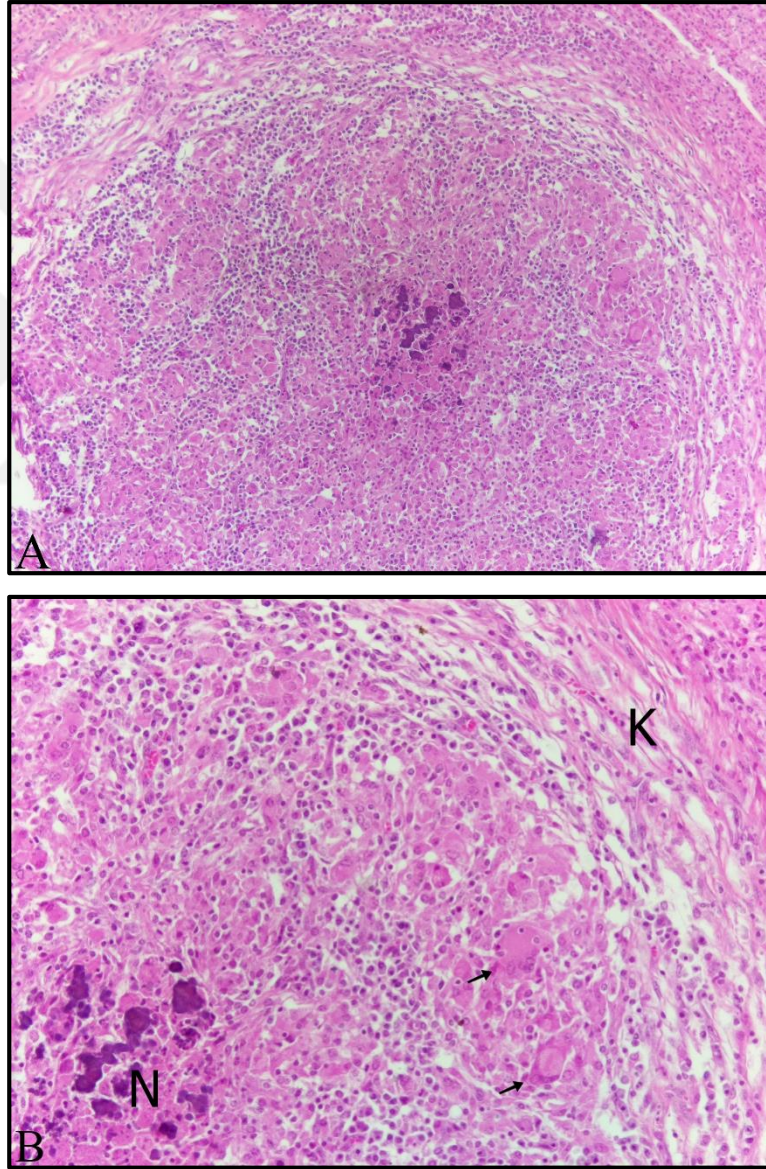
Şekil 3.17. II. Evre granülom, primer kompleks, akciğer, x100, HE (N: Nekroz, Oklar: dev hücreleri).



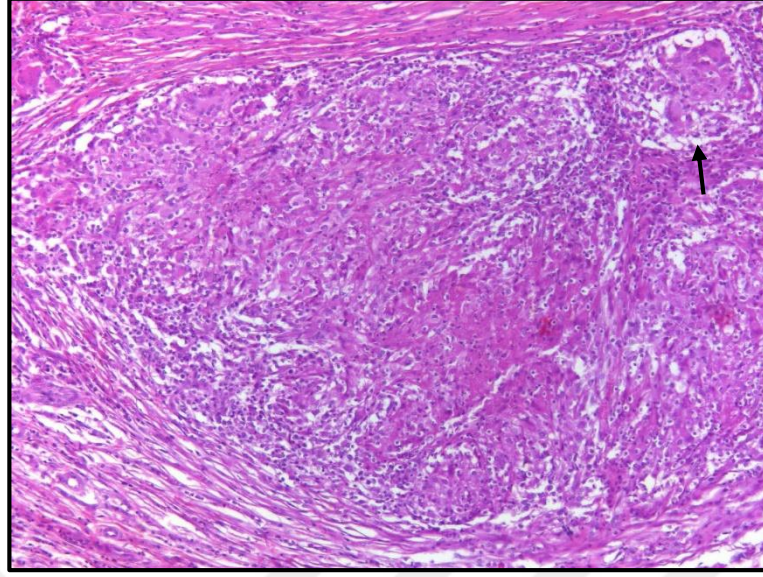
Şekil 3.18. II. Evre granülom, primer kompleks, akciğer, x200, HE (N: Nekroz, K: Kapsül).

**III. Evre granümler:** Merkezde piknotik hücreler, kazeifikasyon nekrozu ve kireçlenme içeren; çevresinde epitelioid makrofaj, Langhans tipi dev hücre, makrofaj ve lenfositlerden oluşan mononükleer hücreler ve tek tük nötrofil lökosit infiltrasyonları görülen (n:4) etrafı fibroblast, fibroblast ve kollajen ipliklerden oluşan

ince (n:5) ve/veya kalın bağ dokusundan (n:3) kapsülle çevrili tipik tüberküller (Şekil 3.19) gözlemlendi. Sadece 1 olguda III. evre granümlara aynı kesitlerde I. Evre granümlar da (Şekil 3.20) eşlik ediyordu. Farklı 1 olguda bronş, bronşiyol, damar çevresi ve interalveoler alanlarda, çoğunluğu lenfositlerden oluşan mononükleer hücre infiltrasyonları görüldü. Atektazik alveollere (n:1) de yer yer rastlandı.

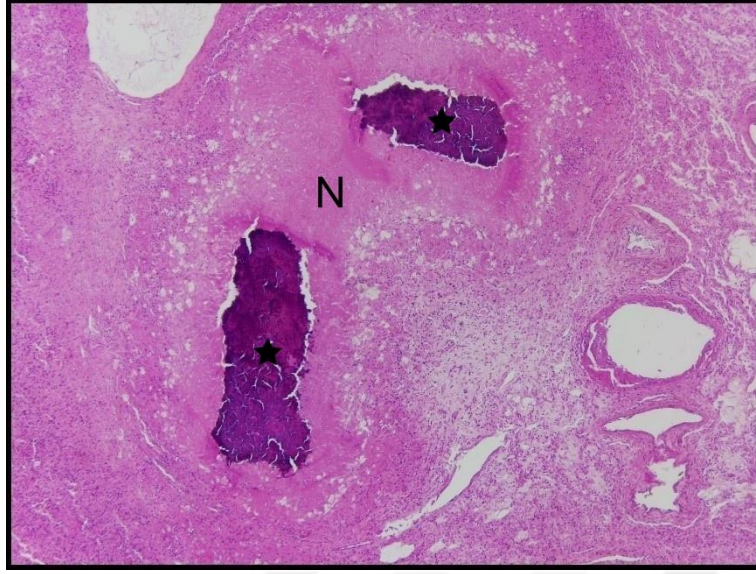


Şekil 3.19. III. Evre granülom, primer kompleks, akciğer, (A) x100, (B) x200, HE [N: Nekroz; K: Kapsül; Langhans tipi dev hücreleri (oklar)].

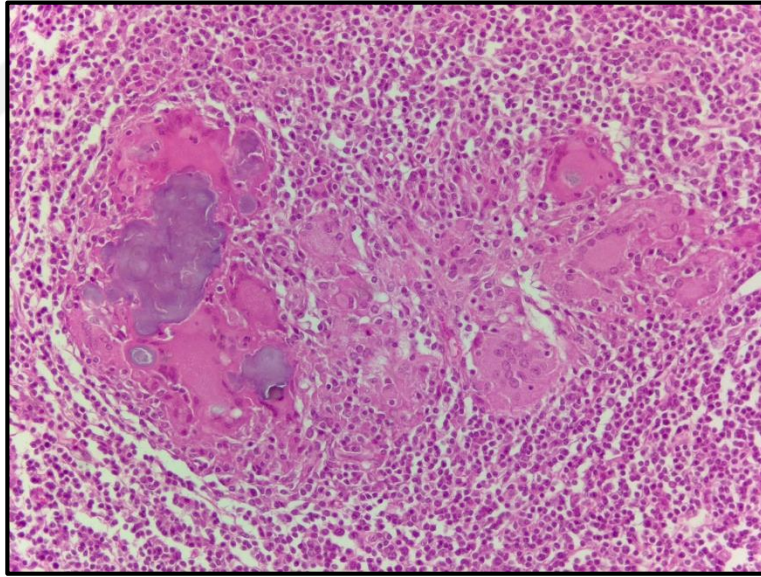


Şekil 3.20. III. Evre granülom ve I. Evre granülom (ok), primer kompleks, x100, HE.

**IV. Evre granülomlar:** Kireçlenmiş geniş kazeifikasyon nekrozlarının (Şekil 3.21) etrafında epiteloid makrofaj, Langhans tipi dev hücre (Şekil 3.22), çoğunluğu lenfosit ve makrofajlardan oluşan mononükleer hücreler, az sayıda nötrofil lökositler (n:4) vardı. Bunlar ise fibrosit, fibroblast ve kollajen ipliklerden oluşan kalın bağ dokusu ile çevrilmişti. Buna ek olarak IV. Evre granülomların çevresine dizilmiş şekilde küme halinde nötrofil lökosit epiteloid histiyosit ve tek tük lenfositler görülen çok sayıda I. Evre granülomlar (n:2) gözlemlendi. Farklı bir olguda ise bronş çevresindeki lenfoid foliküllerin hiperplazik olduğu görüldü. Bir olguda bronş, bronşiyol ve alveol lümenlerinde nötrofil lökosit infiltrasyonu ve alveol lümenlerinde pembe homojen ödem sıvısı dikkati çekti.



Şekil 3.21. IV. Evre granülom, primer kompleks, akciğer, x50, HE (N: Nekroz, Yıldız: Kireçlenme).



Şekil 3.22. IV. Evre granülom, primer kompleks, akciğer, x200, HE.

Primer komplekste akciğerlerdeki granülomlarda görülen lezyonlar Çizelge 3.4'de özetlendi.

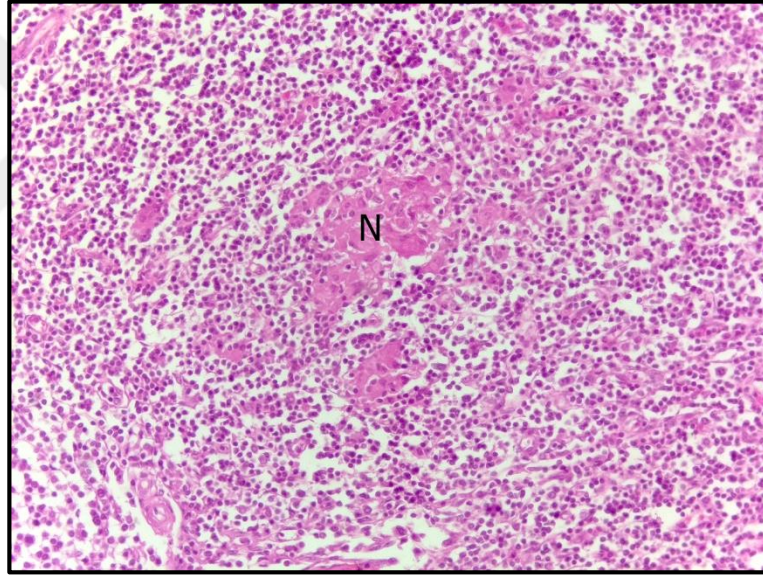
**Çizelge 3.4.** Primer komplekste akciğerde görülen histopatolojik değişiklikler.

No	Nekroz	Kireç	Nötrofil	MNHİ	Epiteloid Makrofaj	Dev hücresi	Kapsül	Evre
PKA-1	-	-	-	+	+	-	-	1
PKA-2	-	-	-	+	+	-	-	1
PKA-3	-	-	+	-	+	-	-	1
PKA-4	-	-	+	-	+	+	-	1
PKA-5	+	-	+	+	+	+	-	2
PKA-6	+	-	+	+	+	+	İnce	2
PKA-7	+	-	+	+	+	+	İnce	2
PKA-8	+	-	+	+	+	+	-	2
PKA-9	+	+	+	+	+	+	İnce	3
PKA-10	+	+	+	+	+	+	İnce	3
PKA-11	+	+	-	+	+	+	Kalın	3
PKA-12	+	+	-	+	+	+	İnce	3
PKA-13	+	+	+	+	+	+	Kalın	3
PKA-14	+	+	+	+	+	+	İnce	3
PKA-15	+	+	-	+	+	+	İnce	3
PKA-16	+	+	-	+	+	+	Kalın	3
PKA-17	+	+	+	+	+	+	Kalın	4
PKA-18	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKA-19	+	+	+	+	+	+	Kalın	4
PKA-20	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKA-21	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKA-22	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKA-23	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKA-24	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKA-25	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKA-26	+	+	+	+	+	+	Kalın	4
PKA-27	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKA-28	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKA-29	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKA-30	+	+	+	+	+	+	Kalın	4

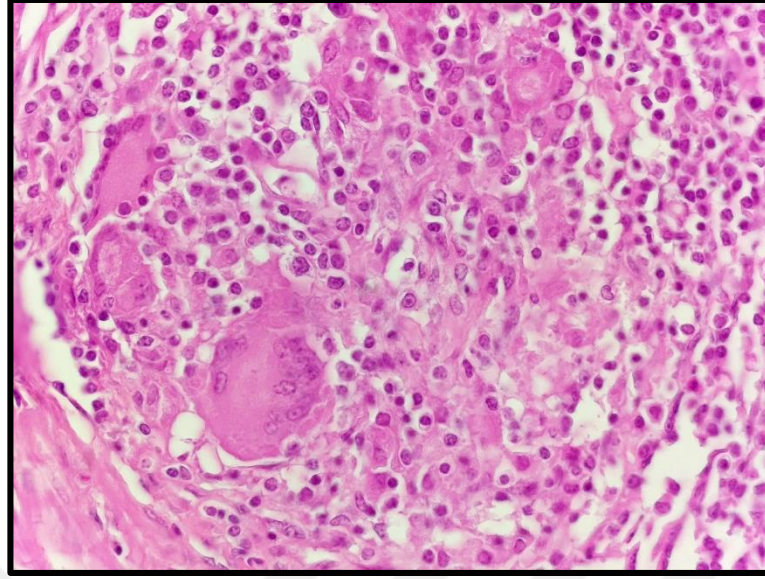
### 3.2.3.2. Mediastinal Lenf Dügümleri

**I. Evre granülomlar:** Primer kompleks olarak değerlendirilen mediastinal lenf düğümlerinde bu evre granülomlar gözlenmedi.

**II. Evre granülomlar:** Tüberkülün merkezinde piknotik çekirdeklerinde yer aldığı kazeifiye alanlar belirgin (Şekil 3.23), bunların etrafında nötrofil lökosit, epitelooid makrofaj, lenfosit ve makrofajlardan oluşan mononükleer hücre infiltrasyonları, Langhans tipi dev hücreleri (Şekil 3.24) vardı.

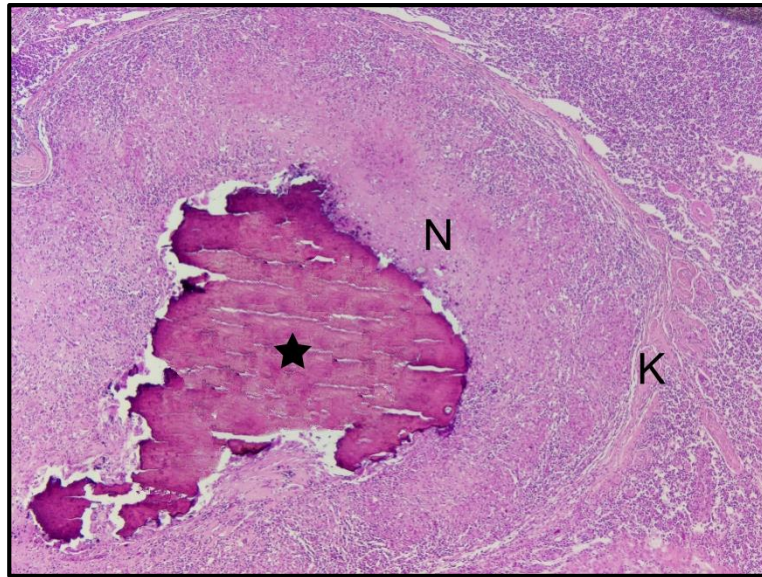


**Şekil 3.23.** II. Evre granülom, primer kompleks, mediastinal lenf düğümü, x200, HE (N: Nekroz).

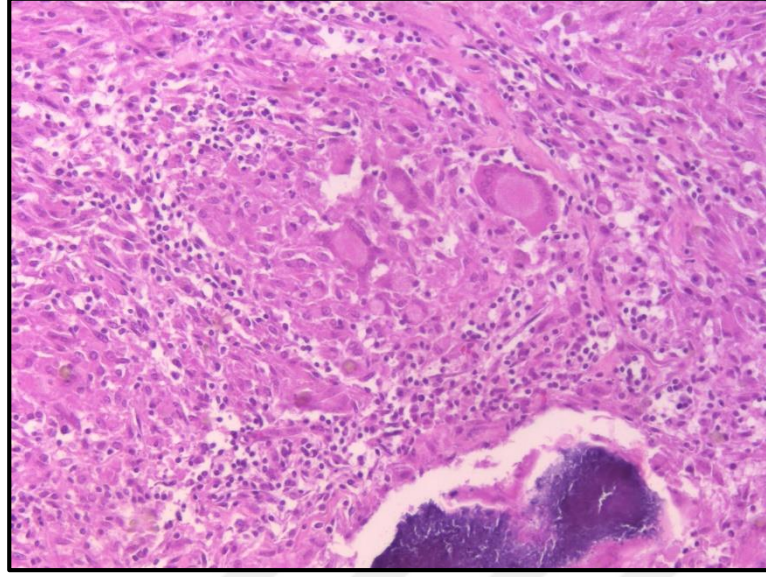


Şekil 3.24. II. Evre granülom, primer kompleks, mediastinal lenf düğümü, x400, HE.

**III. Evre granümler:** En dıştan fibrosit, fibroblast ve kollajen ipliklerden oluşan tek sıra ince bağ dokusundan kapsülün çevrelediği merkezde kazeifikasyon nekrozu ve kireçlenme içeren (n:1) çevresinde epitelioid makrofaj, Langhans tipi dev hücre, makrofaj ve lenfositlerden oluşan mononükleer hücre infiltrasyonu (Şekil 3.26) görülen tipik tüberküller (Şekil 3.25) gözlemlendi.

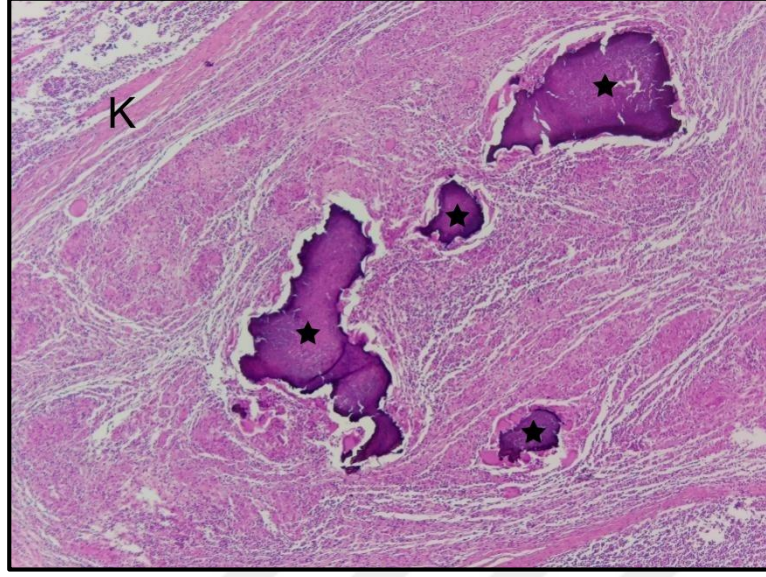


Şekil 3.25. III. Evre granülom, primer kompleks, mediastinal lenf düğümü, x50, HE (Yıldız: Kireçlenme, N: Nekroz, K: Kapsül).



Şekil 3.26. III. Evre granülom, primer kompleks, mediastinal lenf düğümü, x200, HE.

**IV. Evre granülomlar:** Çok sayıda geniş kazeifikasyon nekrozu, kireçlenme, piknotik hücreler içerdiği görüldü. Bunların çevresinde epitelioid makrofaj, Langhans tipi dev hücre, az sayıda nötrofil lökosit (n:6), çoğunluğu lenfosit ve makrofajlardan oluşan mononükleer hücreler, çevresi fibrosit, fibroblast ve kollajen ipliklerden oluşan kalın bağ dokusu ile çevrili düzensiz granülom yapıları (Şekil 3.27) gözlendi. Bunlara ek olarak 2 olguda IV. Evre granülomların çevresinde nötrofil lökosit, epitelioid makrofaj ve tek tük lenfositlerden oluşan I. Evre granülomlar dikkati çekti. Bir olguda mediastinal lenf foliküllerinde mediastinal lenfoid hücrelerin azalarak retiküler çatının açığa çıktığı dikkati çekti. Bir olguda da damar lümenlerinde nötrofil lökositler görüldü.



**Şekil 3.27.** IV. Evre granülom, primer kompleks, mediastinal lenf düğümü, x50, HE (K: Kapsül, Yıldızlar: Kireçlenme).

Primer komplekste mediastinal lenf düğümünde görülen lezyonlar Çizelge 3.5’de gösterildi.

**Çizelge 3.5.** Primer komplekste mediastinal lenf düğümlerinde görülen histopatolojik değişiklikler.

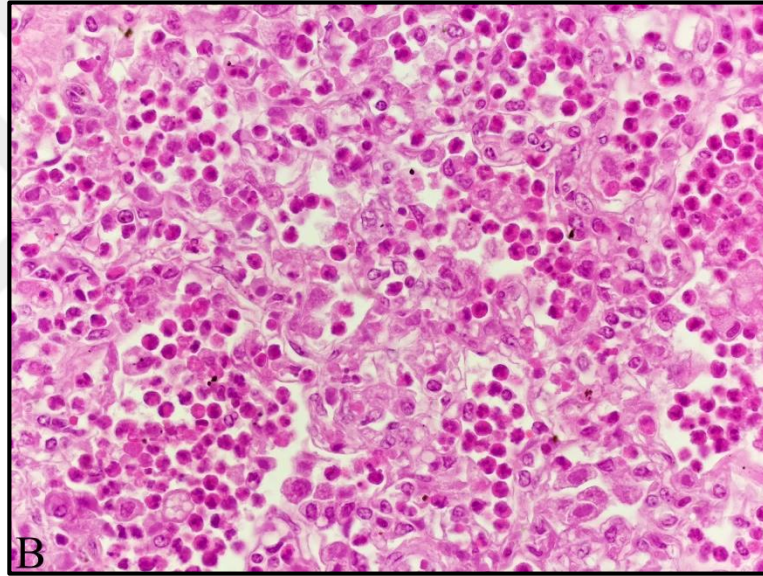
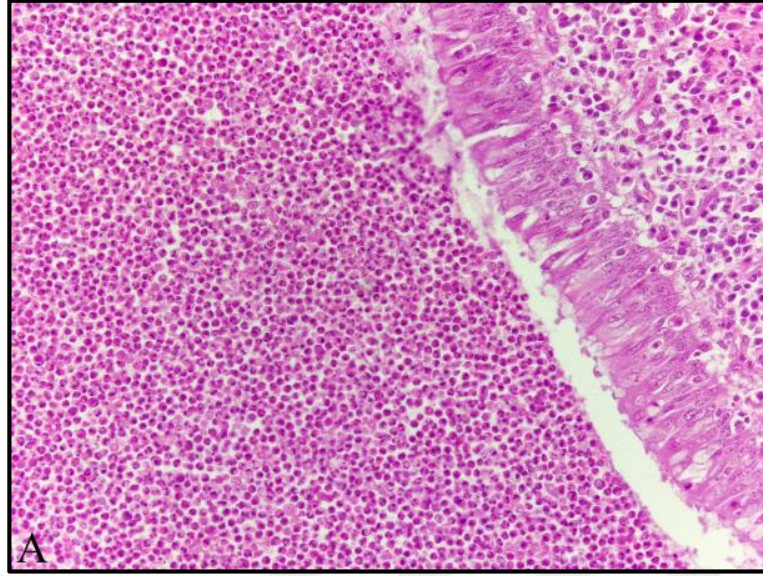
No	Nekroz	Kireç	Nötrofil	MNHİ	Epiteloid Makrofaj	Dev hücresi	Kapsül	Evre
PKL-1	+	-	+	+	+	+	-	2
PKL-2	+	-	-	+	+	+	İnce	3
PKL-3	+	+	-	+	+	+	İnce	3
PKL-4	+	+	+	+	+	+	Kalın	4
PKL-5	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKL-6	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKL-7	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKL-8	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKL-9	+	+	+	+	+	+	Kalın	4
PKL-10	+	+	+	+	+	+	Kalın	4
PKL-11	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKL-12	+	+	+	+	+	+	Kalın	4
PKL-13	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKL-14	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKL-15	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKL-16	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKL-17	+	+	+	+	+	+	Kalın	4
PKL-18	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKL-19	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKL-20	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKL-21	+	+	+	+	+	+	Kalın	4
PKL-22	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKL-23	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKL-24	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKL-25	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKL-26	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKL-27	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKL-28	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKL-29	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
PKL-30	+	+	-	+	+	+	Kalın	4

### 3.2.4. Tam Olmayan Primer Kompleks

Makroskopik muayene sonucu tam olmayan primer kompleks tanısı konulan hayvanların akciğerlerinde tüberküle rastlanılmasına rağmen nonspesifik histopatolojik değişiklikler gözlemlendi. Mediastinal lenf düğümlerinin ise tümünde I. Evre hariç diğer evrelerdeki granülomlar belirgin şekilde tespit edildi.

#### 3.2.4.1. Akciğerler

Bronş, bronşiyol ve alveol lümenlerinde yoğun nötrofil lökosit infiltrasyonu (Şekil 3.28) ve pembe homojen ödem sıvısı (n:7) görüldü. Farklı olgularda bronş, bronşiyol ve damarların çevresinde ve interalveoler alanlarda çoğunluğu lenfosit olan mononükleer hücre infiltrasyonlarına (n:4) rastlandı. Bir olguda merkezde eozinofilik parazit kutikulası olduğu, yapının bazı bölgelerde kireçlenme gösterdiği, çevresinde ise yabancı cisim dev hücreleri ve çoğunluğu makrofaj ile lenfositlerden oluşan mononükleer hücre infiltrasyonları görüldü. Bu yapının çevresinde fibrosit, fibroblast ve kollajen ipliklerden oluşan bağ dokudan kapsül gözlemlendi. Ayrıca bronşların çevresindeki lenf foliküllerinin hiperplazik olduğu (n:5) dikkati çekti. Buna ek olarak alveol lümenlerinde pembe homojen ödeme (n:3) rastlandı.



**Şekil 3.28.** Bronşiyol ve alveol lumenlerinde nötrofil lökosit infiltrasyonu, akciğer, (A) x200, (B) x400, HE.

Tam olmayan primer komplekste, akciğerlerde görülen lezyonlar Çizelge 3.6'da özetlendi.

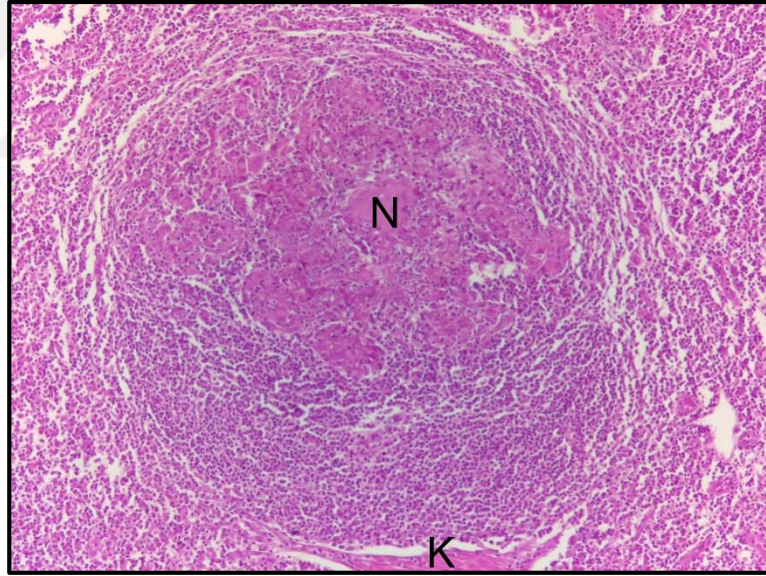
**Çizelge 3.6.** Tam olmayan primer komplekste akciğerde görülen histopatolojik değişiklikler.

No	Nekroz	Kireç	Nötrofil	MNHİ	Epiteloid Makrofaj	Dev hücresi	Kapsül	Evre
TOPKA-1	-	-	+	-	-	-	-	-
TOPKA-2	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-3	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-4	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-5	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-6	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-7	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-8	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-9	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-10	-	-	-	+	-	-	-	-
TOPKA-11	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-12	-	-	+	-	-	-	-	-
TOPKA-13	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-14	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-15	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-16	-	-	+	-	-	-	-	-
TOPKA-17	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-18	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-19	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-20	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-21	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-22	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-23	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-24	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-25	-	-	-	+	-	-	-	-
TOPKA-26	-	-	+	-	-	-	-	-
TOPKA-27	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-28	-	-	+	-	-	-	-	-
TOPKA-29	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-30	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-31	-	-	-	+	-	-	-	-
TOPKA-32	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-33	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-34	-	-	+	-	-	-	-	-
TOPKA-35	-	-	-	+	-	-	-	-
TOPKA-36	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-37	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-38	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-39	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-40	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-41	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-42	-	-	+	-	-	-	-	-
TOPKA-43	+	+	-	+	+	+	+	-
TOPKA-44	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-45	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-46	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPKA-47	-	-	-	-	-	-	-	-

### 3.2.4.2. Mediastinal Lenf Dügümleri

**I. Evre granülomlar:** Tam olmayan primer komplekslerde mediastinal lenf düğümlerinde I. Evre granüloma rastlanmadı.

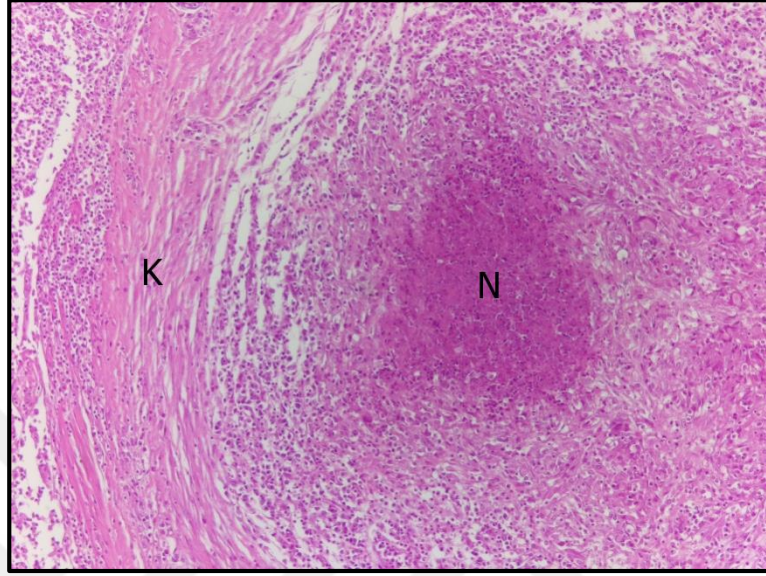
**II. Evre granülomlar:** Merkezinde piknotik çekirdeklerinde yer aldığı kazeifiye alanlar belirgin, bunların etrafında nötrofil lökosit, epitelooid makrofaj, lenfosit ve makrofajlardan oluşan mononükleer hücre infiltrasyonları, Langhans tipi dev hücreleri, tek sıra fibrosit, fibroblast ve kollajen ipliklerden oluşan ince bağ dokusuyla çevriliydi (Şekil 3.29). Bir olguda mediastinal lenfoid foliküllerin hiperplazik olduğu dikkati çekti.



**Şekil 3.29.** II. Evre granülom, tam olmayan primer kompleks, mediastinal lenf düğümü, x100, HE (N: Nekroz, K: Kapsül).

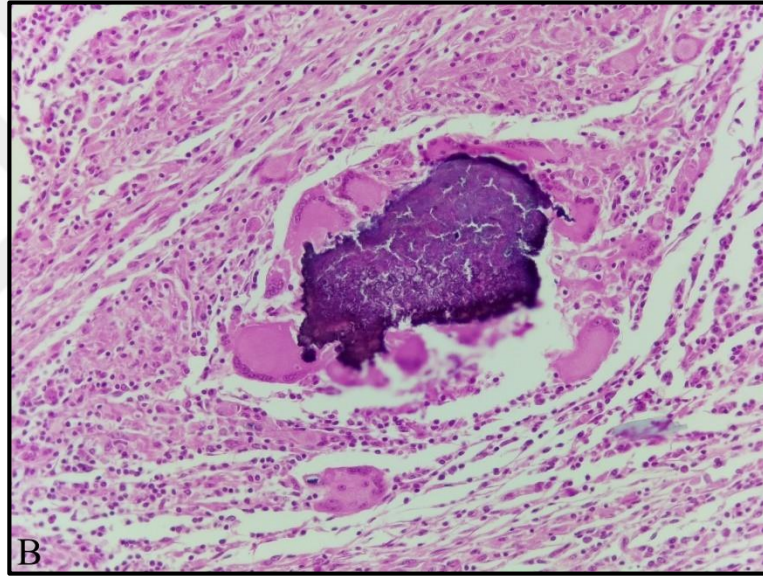
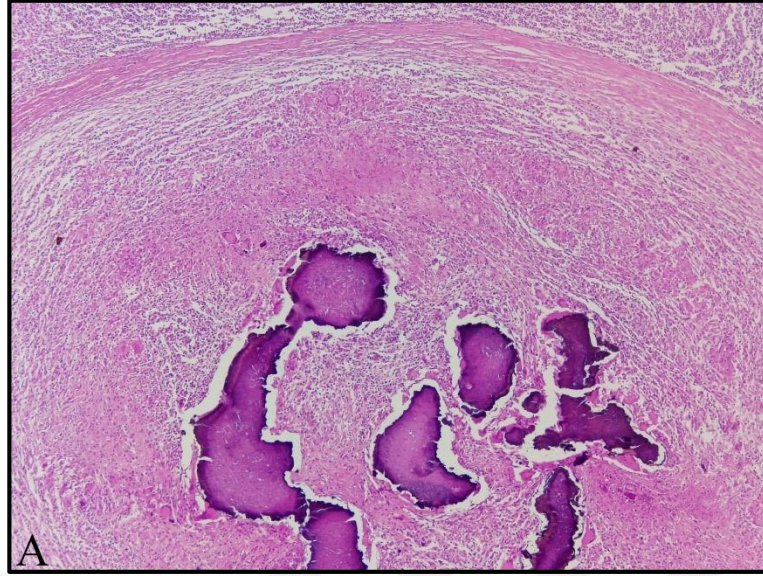
**III. Evre granülomlar:** Merkezde piknotik hücreler, kazeifikasyon nekrozu ve kireçlenme içeren; çevresinde epitelooid makrofaj, Langhans tipi dev hücre, makrofaj ve lenfositlerden oluşan mononükleer hücreler ve tek tük nötrofil lökosit infiltrasyonları görülen (n:1) ve etrafı fibrosit, fibroblast ve kollajen ipliklerden oluşan

ince (n:6) ve/veya kalın (n:4) bağ dokusundan kapsülle çevrili tipik tüberküller (Şekil 3.30) gözlendi.



**Şekil 3.30.** III. Evre granülom, tam olmayan primer kompleks, mediastinal lenf düğümü, x100, HE (N: Nekroz; K: Kapsül).

**IV. Evre granülomlar:** Çoklu odaklar halinde geniş kazeifikasyon nekrozu, kireçlenme, piknotik hücreler içermekteydi. Bunların çevresinde epitelooid makrofaj, Langhans tipi dev hücre, çoğunluğu lenfosit ve makrofajlardan oluşan mononükleer hücreler, az sayıda nötrofil lökosit (n:11), çevresi fibrosit, fibroblast ve kollajen ipliklerden oluşan kalın bağ dokusu ile çevrili düzensiz granülom yapıları (Şekil 3.31) gözlendi. İki olguda granülomların çevresinde aynı kesitte I. Evre granülomlar dikkati çekti. Farklı birer olguda kanama ve damar lümenlerinde nötrofillere rastlandı.



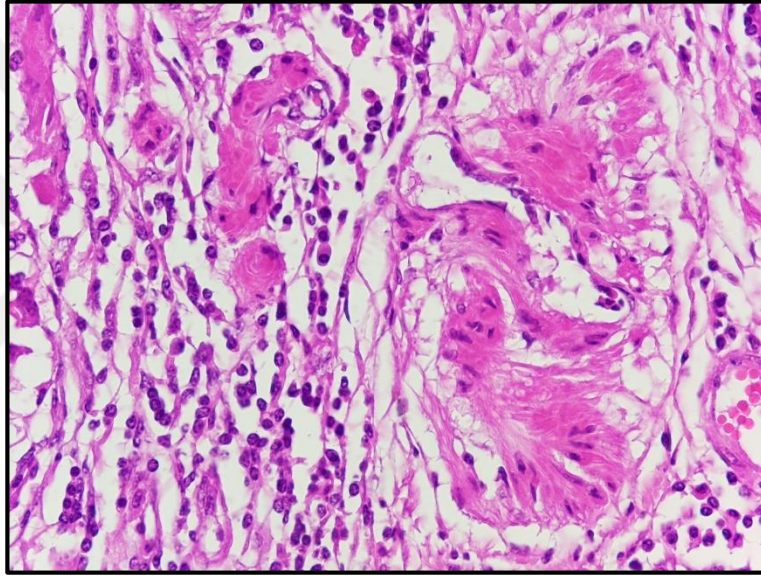
**Şekil 3.31.** IV. Evre granülom, tam olmayan primer kompleks, mediastinal lenf düğümü, (A) x100, (B) x200, HE.

Tam olmayan primer komplekste lenf düğümlerinde granülomlarda görülen lezyonlar Çizelge 3.7’da özetlenmiştir.

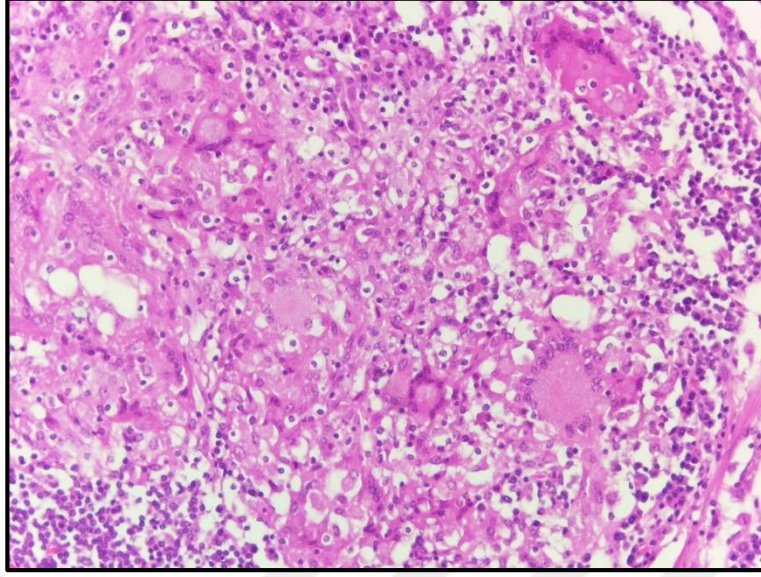
**Çizelge 3.7.** Tam olmayan primer komplekste mediastinal lenf düğümlerinde görülen histopatolojik değişiklikler.

No	Nekroz	Kireç	Nötrofil	MNHİ	Epiteloid Makrofaj	Dev hücresi	Kapsül	Evre
TOPKL-1	+	-	+	+	+	+	İnce	2
TOPKL-2	+	-	+	+	+	+	İnce	2
TOPKL-3	+	-	+	+	+	+	İnce	2
TOPKL-4	+	-	+	+	+	+	İnce	2
TOPKL-5	+	-	+	+	+	+	İnce	2
TOPKL-6	+	+	-	+	+	+	Kalın	3
TOPKL-7	+	+	-	+	+	+	İnce	3
TOPKL-8	+	+	-	+	+	+	İnce	3
TOPKL-9	+	+	-	+	+	+	İnce	3
TOPKL-10	+	+	-	+	+	+	İnce	3
TOPKL-11	+	-	-	+	+	+	İnce	3
TOPKL-12	+	+	-	+	+	+	Kalın	3
TOPKL-13	+	-	-	+	+	+	Kalın	3
TOPKL-14	+	-	-	+	+	+	Kalın	3
TOPKL-15	+	+	+	+	+	+	İnce	3
TOPKL-16	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-17	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-18	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-19	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-20	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-21	+	+	+	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-22	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-23	+	+	+	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-24	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-25	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-26	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-27	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-28	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-29	+	+	+	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-30	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-31	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-32	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-33	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-34	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-35	+	+	+	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-36	+	+	+	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-37	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-38	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-39	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-40	+	+	+	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-41	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-42	+	+	-	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-43	+	+	+	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-44	+	+	+	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-45	+	+	+	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-46	+	+	+	+	+	+	Kalın	4
TOPKL-47	+	+	+	+	+	+	Kalın	4

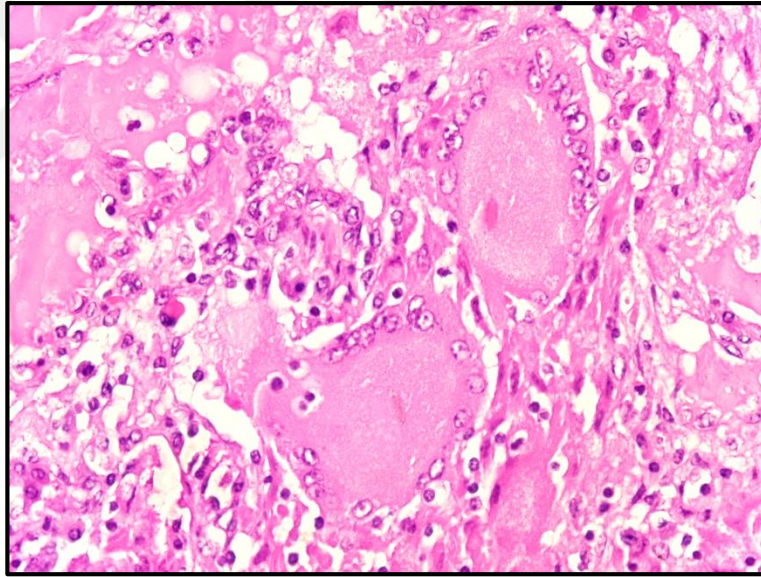
Yapılan incelemelerde morfolojik olarak (Şekil 3.32; Şekil 3.33) makrofaj çekirdekleri at nalı ya da taç şeklinde dizilmiş, bazılarının sitoplazmasında fagositik materyal bulunan Langhans tipi dev hücreleri (Şekil 3.34; Şekil 3.35); kireçlenmeye yakın alanlarda ve/veya granülom yapısında sitoplazmasında şekilsiz vakuoller ve/veya fagosite edilmiş hücreler bulunan (Şekil 3,36), hücre çekirdekleri düzensiz sıralanmış yabancı cisim dev hücreleri (Şekil 3.37; Şekil 3.38); çekirdekler sitoplazmada paralel dizilmiş şekilde olan osteoklastik dev hücrelerine benzer morfolojiler gözlemlendi.



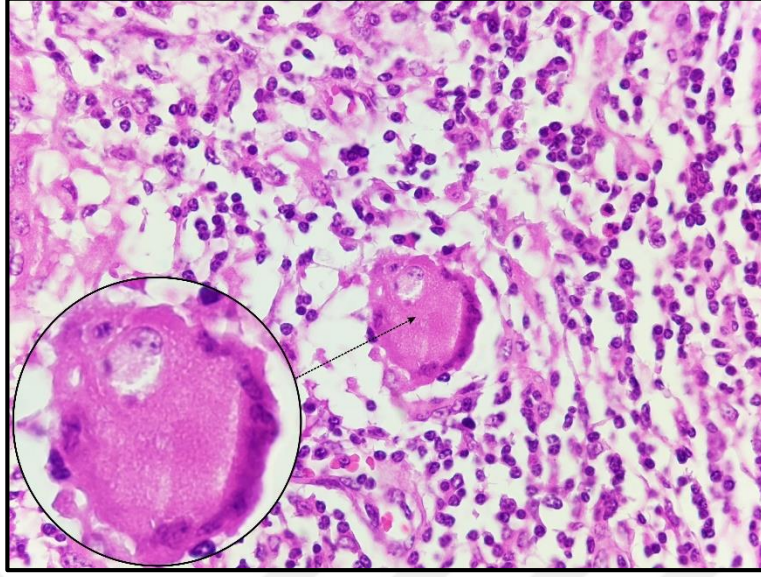
Şekil 3.32. Dev hücresi oluşumları, x400, HE.



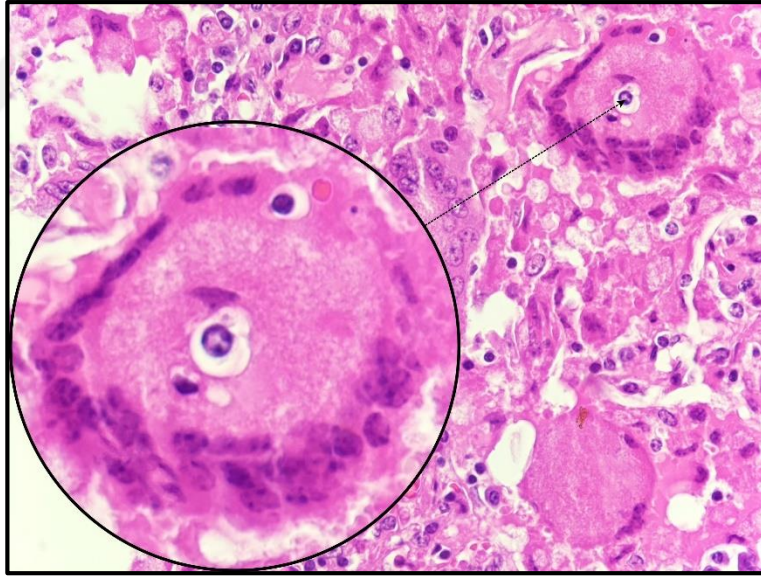
Şekil 3.33. Tüberkül yapısında farklı morfolojik görünümdeki dev hücreleri, x200, HE.



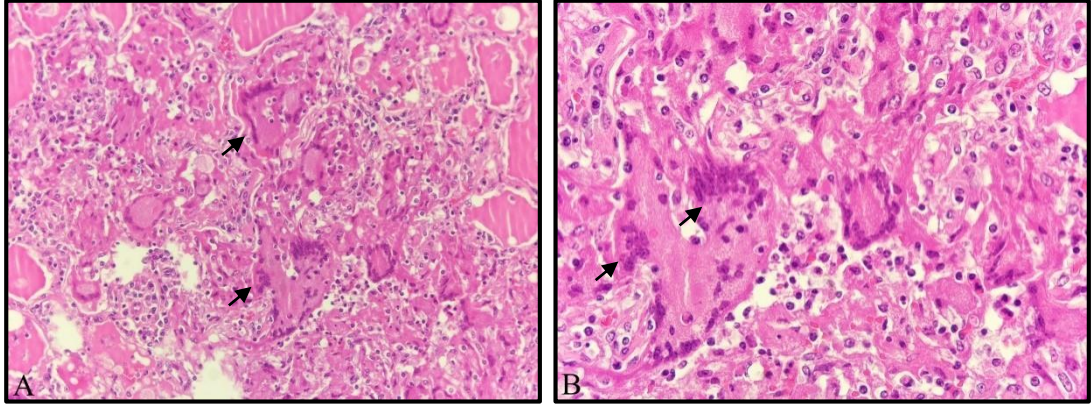
Şekil 3.34. Tipik Langhans tipi dev hücreleri, x400, HE.



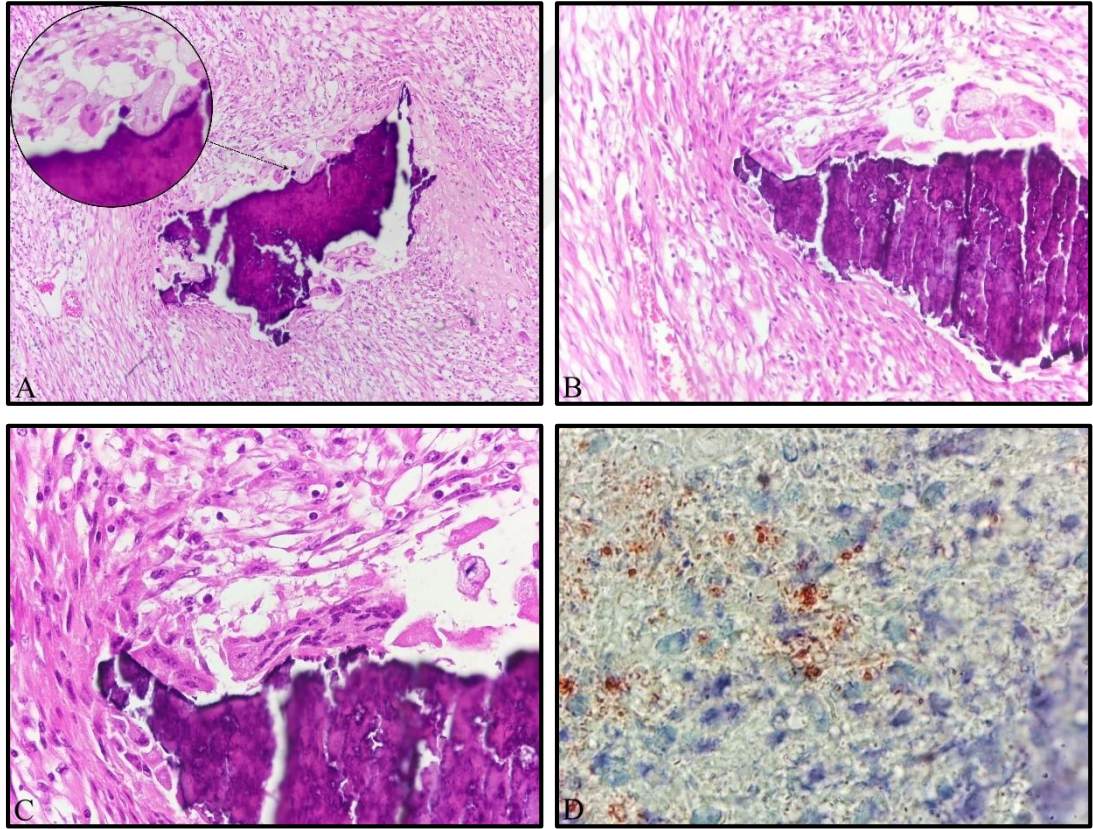
**Şekil 3.35.** Sitoplazmasında fagosite edilmiş materyal bulunan (siyah daire 2x yakınlaştırma) Langhans tipi dev hücresi, x200, HE.



**Şekil 3.36.** Sitoplazmasında fagosite edilmiş hücre (siyah daire, 2,5x yakınlaştırma) bulunan yabancı cisim dev hücresi, x200, HE.



Şekil 3.37. Yabancı cisim dev hücreleri (oklar), (A) x200, (B) x400, HE.



Şekil 3.38. Yabancı cisim dev hücreleri, (A) x100 (daire x2 yakınlaştırma), (B-C) x200, HE., Nekroz alanında bulunan etkin immüpozitifliği, (D) x1000, ABC-P.

### 3.2.5. Eksudatif Lezyonlar

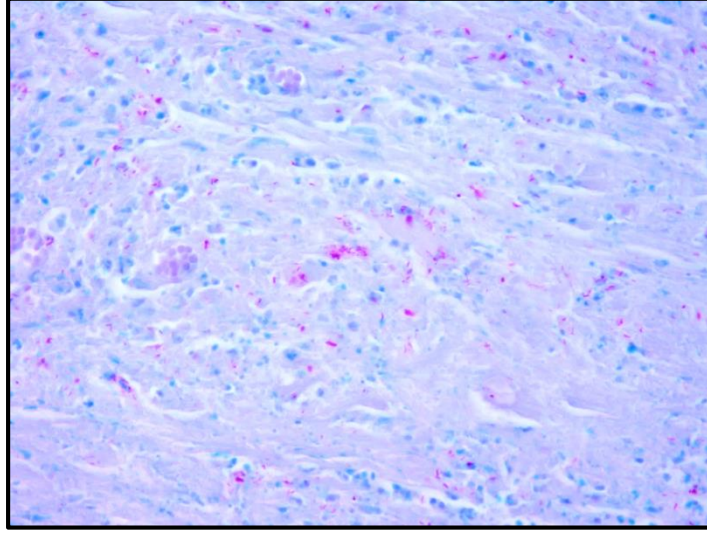
İncelenen doku örneklerinden akciğerlerde tüm damarlar hiperemikti. Yer yer yaygın eozinofilik kazeöz bu alanlarda piknotik ve/veya parçalı çekirdekli nötrofil lökositlerin eşlik ettiği kazeöz pnömoni odakları görüldü. Ayrıca bu odakların periferinde yer alan bronş, bronşiyol, alveollerin lumenlerinde nötrofil lökositler ve az sayıda diğer yangısal hücrelere ve pembe homojen ödem sıvısına rastlandı.

Mediastinal lenf düğümlerinde ise lenf foliküllerinin düzensizleşerek hiperplazik görünümde olduğu, genişlemiş olan kortikal ve medullar sinüslerde de dökülmüş endotel hücreleri ile çoğunluğu lenfositlerden oluşan mononükleer hücre infiltrasyonları dikkati çekti ve Lenfadenitis simpleks tanısı koyuldu.

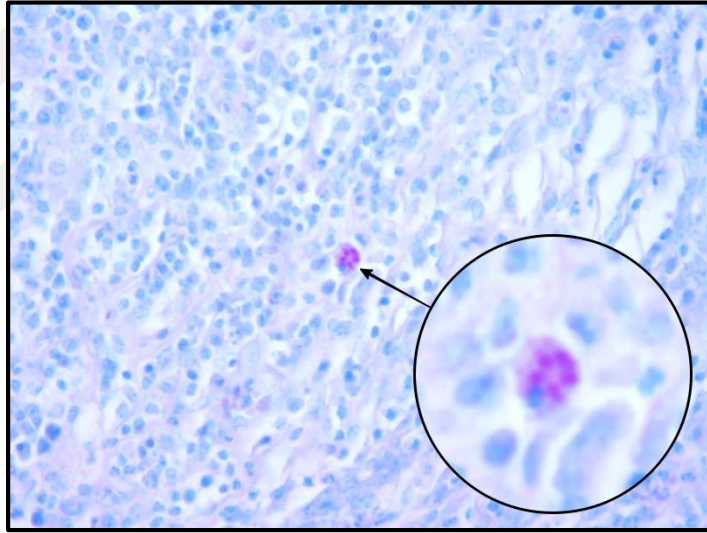
Mikroskopik incelemeler sonrası eksudatif lezyon görülen hayvanların akciğer ve mediastinal lenf düğümleri tüberkül içermediği için çalışma materyalinden çıkarıldı.

### 3.2.6. Ziehl Neelsen Boyaması Bulguları

Prodüktif olguların hepsinde ZN boyaması yapılmış ancak sadece primer komplekslerde 10 adet (%11) akciğer ve/veya mediastinal lenf düğümlerinde Ziehl Neelsen boyamaları sonucu asit-fast etkenlere rastlanıldı. Bu etkenler nekrotik alanlarda ve çevresinde çoğunlukla serbest halde (Şekil 3.39), daha az sayıda da makrofajlarda fagosite edilmiş halde (n:1) (Şekil 3.40) açık kırmızı renkte ve çomak şeklinde görüldü.



**Şekil 3.39.** Tüberküllerde serbest asit-fast etkenler, mediastinal lenf düğümü, x200, ZN.



**Şekil 3.40.** Makrofaj sitoplazmasında görülen asit-fast etkenler (x2,5 yakınlaştırma), mediastinal lenf düğümü, x400, ZN.

### 3.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

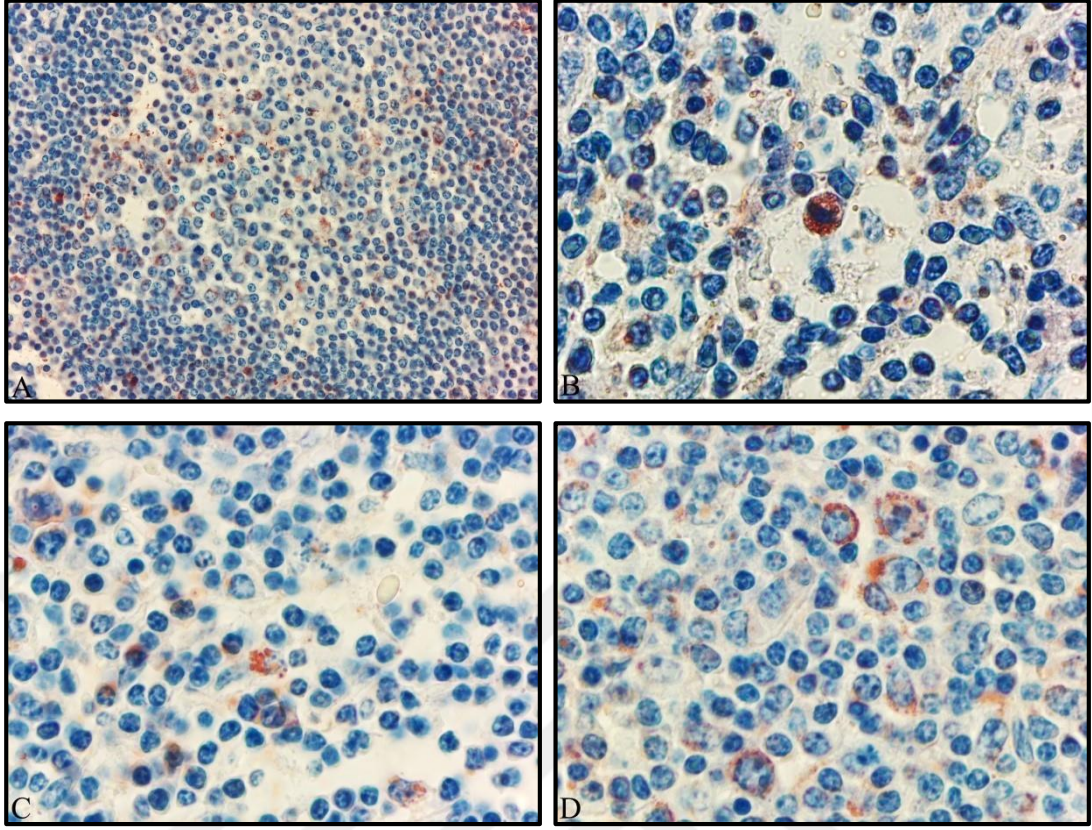
İmmunohistokimyasal incelemeler için akciğer ve mediastinal lenf düğümlerinde tüm hayvanlarda *Mycobacterium bovis*, CD3, CD68, CD119, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-17, Lambda Chain ve TLR-4 antikoru boyamaları yapılarak, etkenin lokalizasyonu ve etkene karşı immün sistemde etkili olan mekanizmalar (Şekil 3.59) detaylı olarak incelendi.

#### 3.3.1. *Mycobacterium bovis* Antikoru

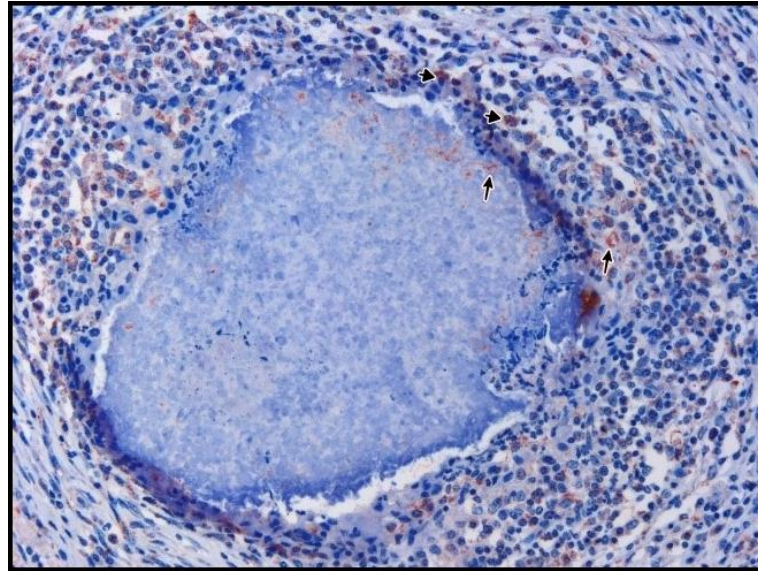
Hastalık etkenini göstermek için, parafin kesitlere *Mycobacterium bovis* antikoru (Çizelge 2.1) kullanılarak yapılan boyamalarda: prodüktif tipte primer odak (Şekil 3.41), primer kompleks ve tam olmayan primer komplekste akciğer ve/veya mediastinal lenf düğümlerinde değişen şiddet ve yoğunlukta tuğla kırmızısı renginde çomak ve/veya granüler görünümde *Mycobacterium bovis* antijenleri saptandı. Bunlar akciğerlerde (primer odak ve primer komplekste) nekrotik alanlarda serbest halde (Şekil 3.42; Şekil 3.43) iken, Langhans tipi dev hücreleri (Şekil 3.44) ile makrofajların sitoplazmalarında görüldü. Aynı zamanda tüberküllerin periferinde yer alan bronş, bronşiyol ve alveol (Şekil 3.45) epitel hücrelerinin sitoplazmalarında ve lümenlerinde yer alan eksudatta benzeri yapıda serbest ve/veya makrofajların sitoplazmasında (Şekil 3.46) antijenlere rastlandı. Aynı zamanda damar endotel hücrelerinin sitoplazmalarında da (Şekil 3.47) antijenler görüldü.

Eksudatif tipte ise nekrotik merkezlerde, bronş, bronşiyol ve/veya alveollerdeki eksudatta serbest halde çomak şeklinde, tuğla kırmızısı renginde etkenlere rastlandı.

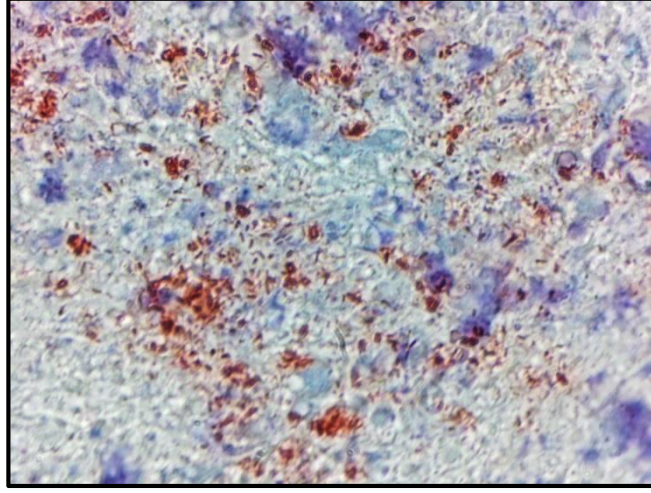
Kontrol grubundaki kesitlerde ise *Mycobacterium bovis* antijenine rastlanmadı.



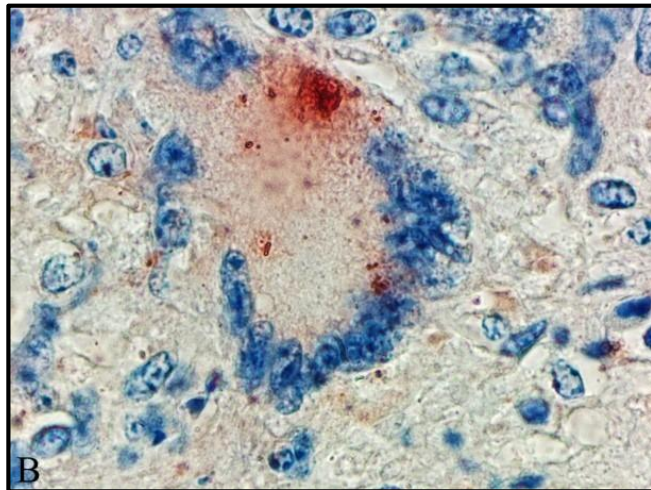
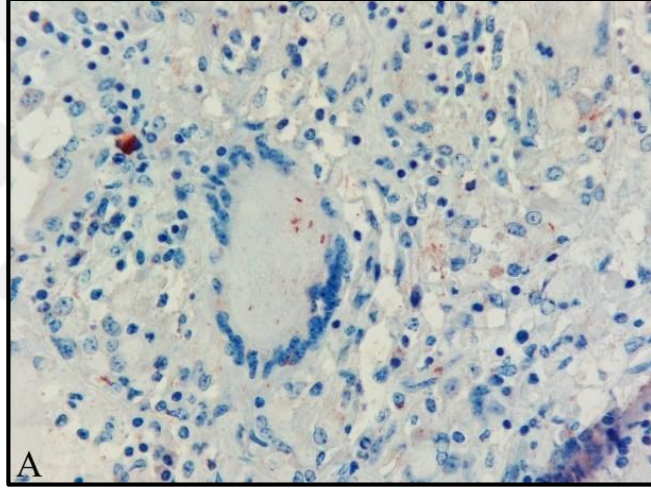
**Şekil 3.41.** Primer odak lenf düğümlerinde makrofaj sitoplazmasında görülen etkenler, (A) 400x, (B-D) 1000x, ABC-P.



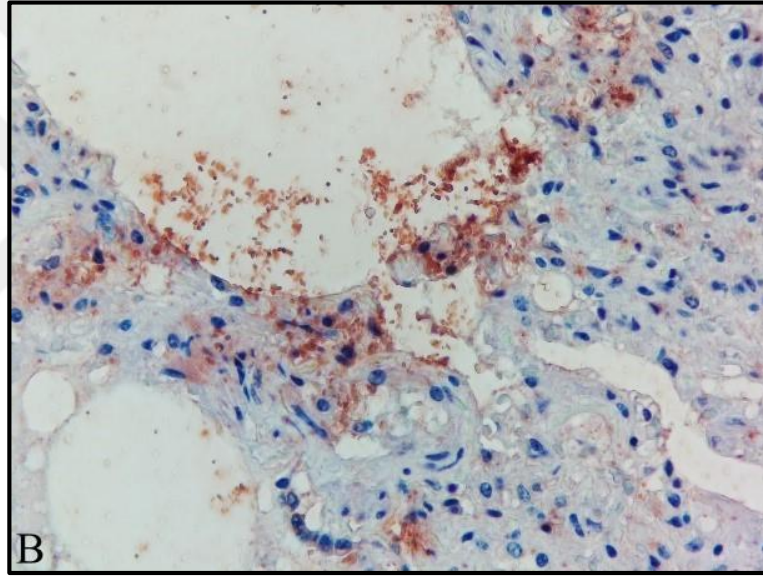
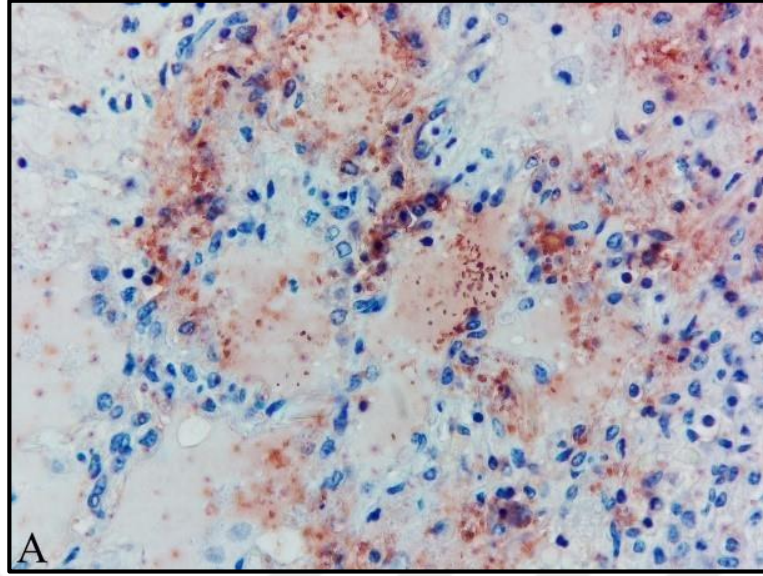
**Şekil 3.42.** Nekrotik alanlarda ve periferinde (oklar); makrofajlarda (kısa oklar) immunopozitif etkenler, mediastinal lenf düğümü, x100, ABC-P.



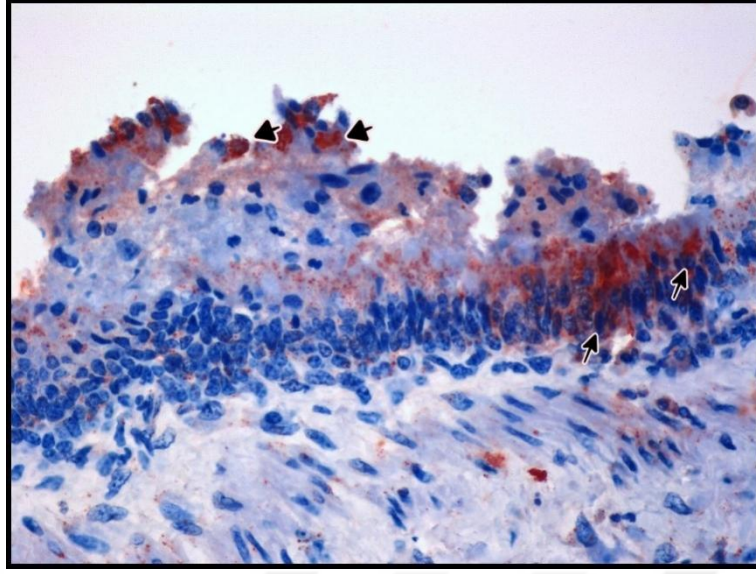
Şekil 3.43. Nekroz alanında serbest etkenler, akciğer, x1000, ABC-P.



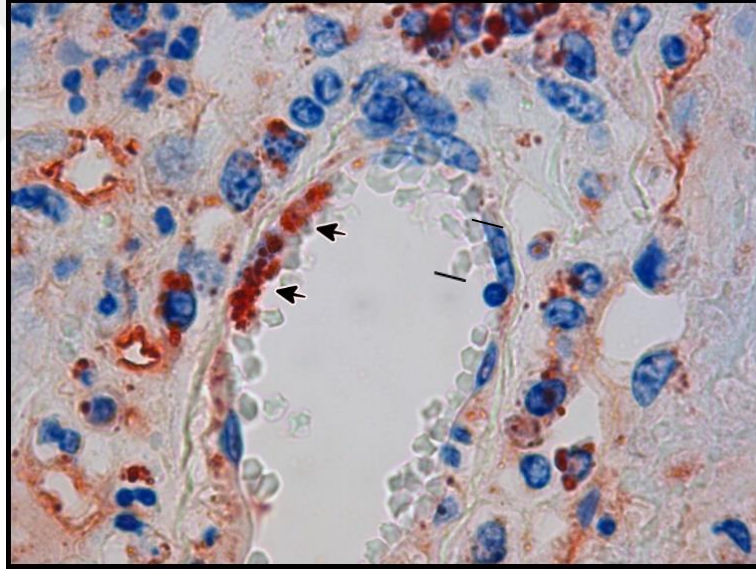
Şekil 3.44. Dev hücrelerde görülen etken immunopozitiflikleri, mediastinal lenf düğümü, (A) x400, (B) x1000, ABC-P.



**Şekil 3.45.** Alveol epitellerinde ve/veya alveol lümenlerde etken immunopozitiflikleri, akciğer, (A-B) x400, ABC-P.



**Şekil 3.46.** Bronşiyol epitellerin apikal uçlarında (ince oklar) ve eksudattaki makrofajlarda (kalın oklar) etken immunopozitiflikleri, akciğer, x400, ABC-P.

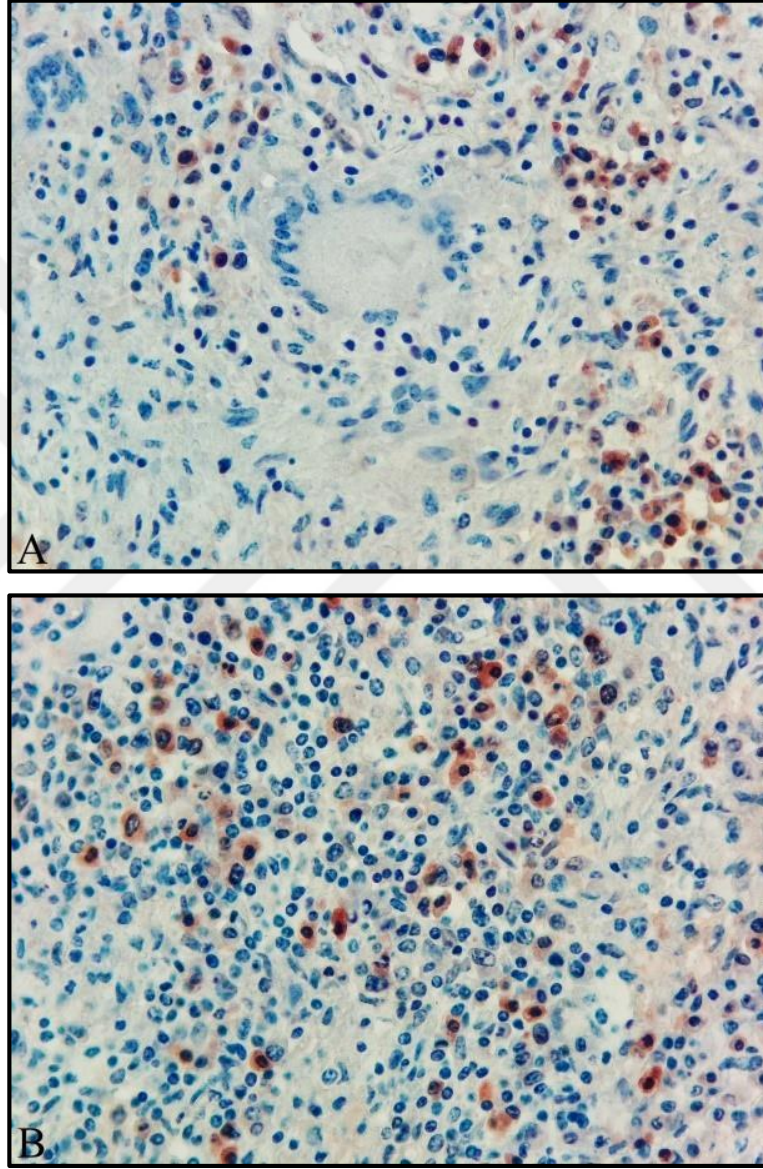


**Şekil 3.47.** Damar endotellerinin sitoplazmalarında etken immunopozitiflikleri (oklar), akciğer, x1000, ABC-P.

### 3.3.2. Toll-like Receptor 4 Antikoru

TLR-4 immunopozitifliği akciğerlerde tüberküllerde makrofajlar ve lenfositlerde (Şekil 3.48), tüberkül dışında bronş, bronşiyol epitel hücrelerinde ve

çevrelerindeki makrofaj ve lenfositlerde gözlemlendi. Mediastinal lenf düğümlerinde ise tüberkül içindeki ve/veya dışındaki makrofaj ve lenfositlerin sitoplazmalarında homojen görünümde, tuğla kırmızısı renginde, zayıf görünümde immunopozitiflikler dikkati çekti.



**Şekil 3.48.** Tüberküllerdeki TLR4 immunopozitifliği, mediastinal lenf düğümü, (A-B) x400, ABC-P.

Kontrol grubunda ise akciğerde bronş ve bronşiyol epitellerinde (Şekil 3.49), çevresindeki makrofajların; mediastinal lenf düğümlerinde medullar sinüsteki

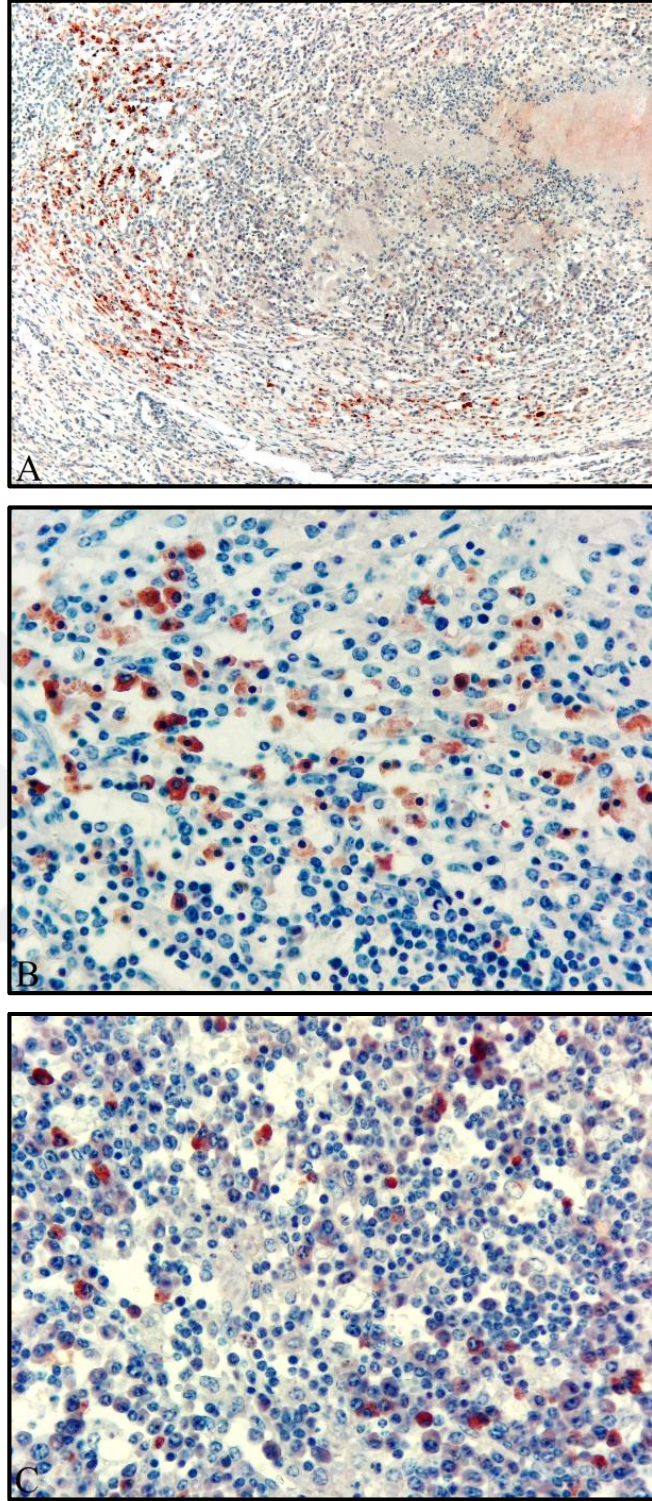
makrofajların ve lenfositlerin sitoplazmasında homojen, tuğla kırmızısı renge zayıf immunopozitiflikler görüldü.



Şekil 3.49. Bronşiyol epitellerinde TLR4 immunopozitifliği, akciğer, x100, ABC-P.

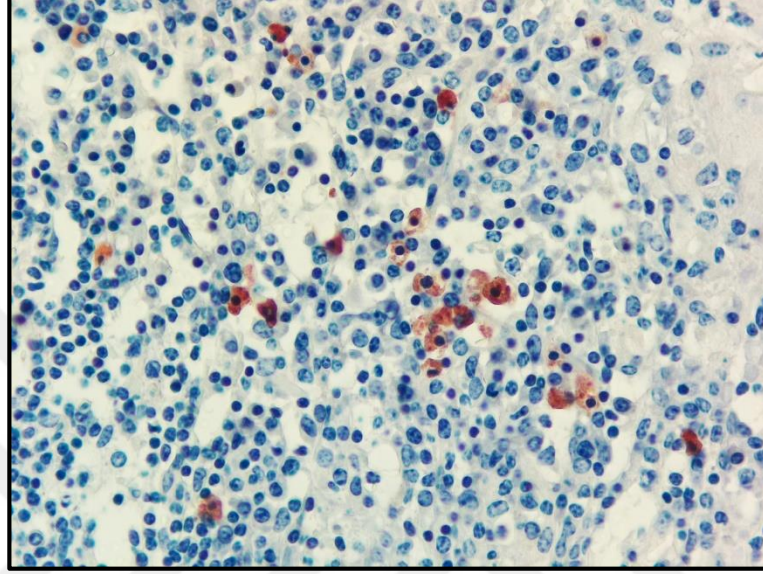
### 3.3.3. CD3 Antikoru

CD3 immunopozitifliği akciğer ve mediastinal lenf düğümlerinde hem tüberküllerdeki lenfositlerde (Şekil 3.50) hem de tüberkül dışındaki lenfositlerde görüldü. Bu hücrelerin sitoplazmalarında homojen, tuğla kırmızısı renkte güçlü immunopozitiflikler dikkati çekti.



**Şekil 3.50.** Tüberküllerdeki lenfositlerde CD3 immunopozitifliği, (A) x100, (B-C) x400, ABC-P.

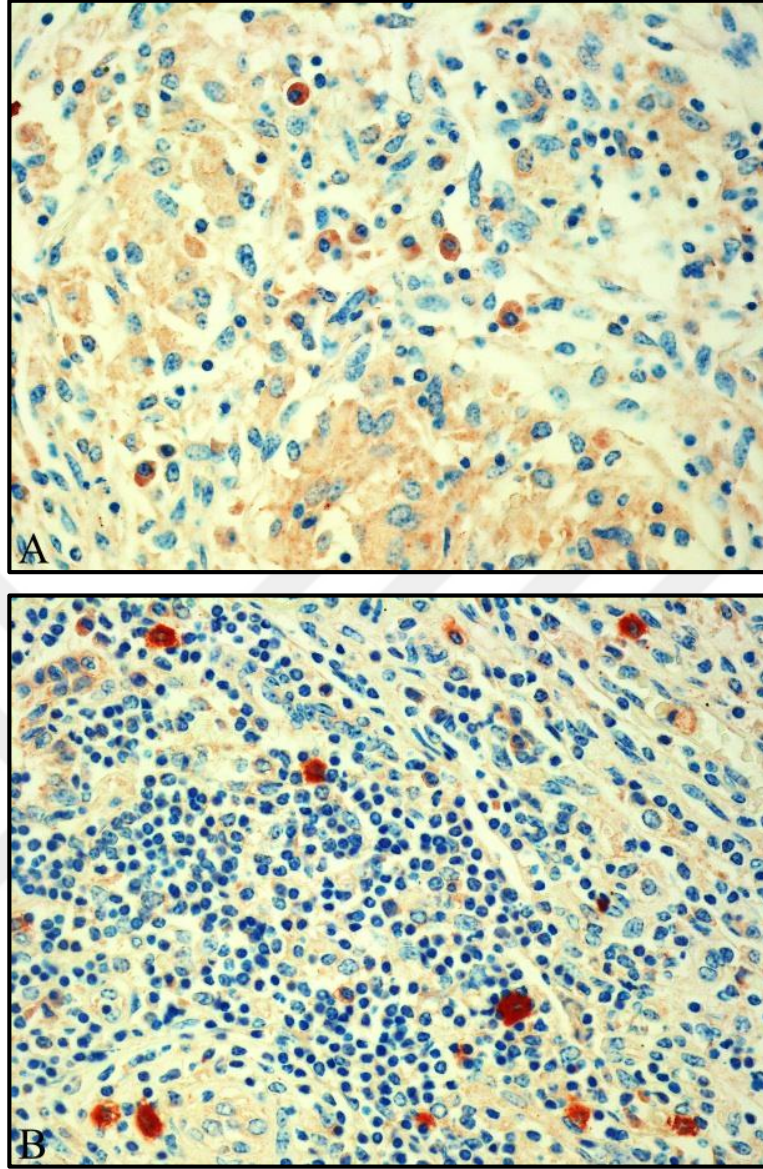
Kontrol grubunda ise akciğerlerde bronş ve damar çevrelerinde lenfositlerde; lenf düğümlerinde lenf foliküllerindeki lenfositlerde (Şekil 3.51) immunopozitifliklere rastlandı.



Şekil 3.51. Lenf foliküllerinde CD3 immunopozitifliği, x400, ABC-P.

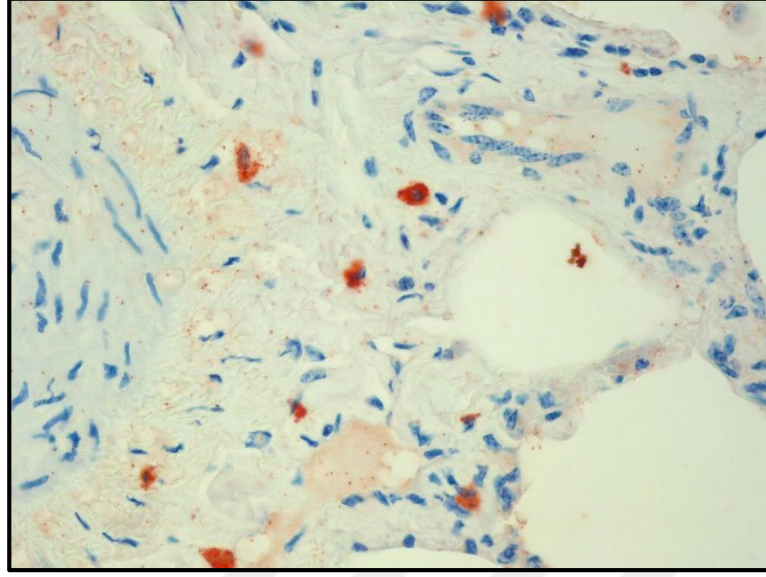
#### 3.3.4. CD119 Antikoru

CD119 antikoru ile yapılan boyamalarda akciğer ve mediastinal lenf düğümlerinde bulunan tüberküllerdeki makrofajların sitoplazmalarında tuğla kırmızısı renge zayıf ve/veya güçlü homojen (Şekil 3.52) immunopozitifliklere rastlandı. Ayrıca her iki dokuda da tüberküllerin dışında yer alan makrofajlarda da benzer renkte ve yoğunlukta immunopozitiflikler görüldü.



**Şekil 3.52.** Tüberkül yapısında zayıf ve/veya güçlü CD119 immunpozitifliği, (A-B) x400, ABC-P.

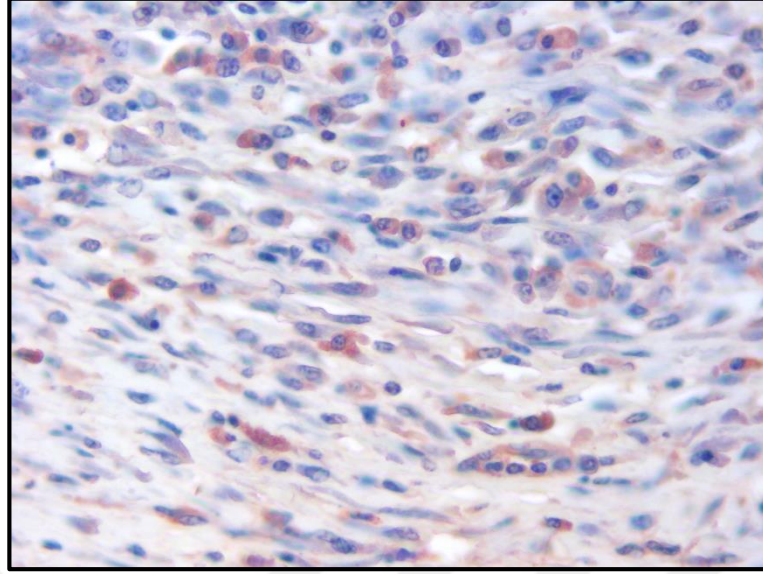
Kontrol grubunda ise akciğerde bronş çevresindeki makrofajların sitoplazmalarında (Şekil 3.53); lenf düğümlerinde ise medulla ve subkapsüler sinüsteeki makrofajlarda tuğla kırmızısı renkte zayıf homojen immüpozitifliklere rastlandı.



**Şekil 3.53.** Bronş çevresindeki makrofajlarda CD119 immunopozitifliği, x400, ABC-P.

### **3.3.5. Interleukin-4 Antikoru**

IL4 antikoru ile IP boyaması sonrası akciğer ve lenf düğümlerinde tüberkül ve periferlerinde immunopozitifliklere raslandı. Akciğer ve lenf düğümlerindeki tüberküllerde makrofaj ve lenfositlerde zayıf immunopozitiflikler (Şekil 3.54) görüldü. Periferinde ise akciğerde intersitsiyel alanlarda ve BALT'taki makrofajlar ve lenfositlerde, lenf düğümlerinde de kortikal ve medullar sinüslerdeki makrofaj ve lenfositlerde immunopozitiflikler gözlemlendi. Bunlar hücrelerin sitoplazmasında homojen şekilde, tuğla kırmızısı renkte dikkati çekti.

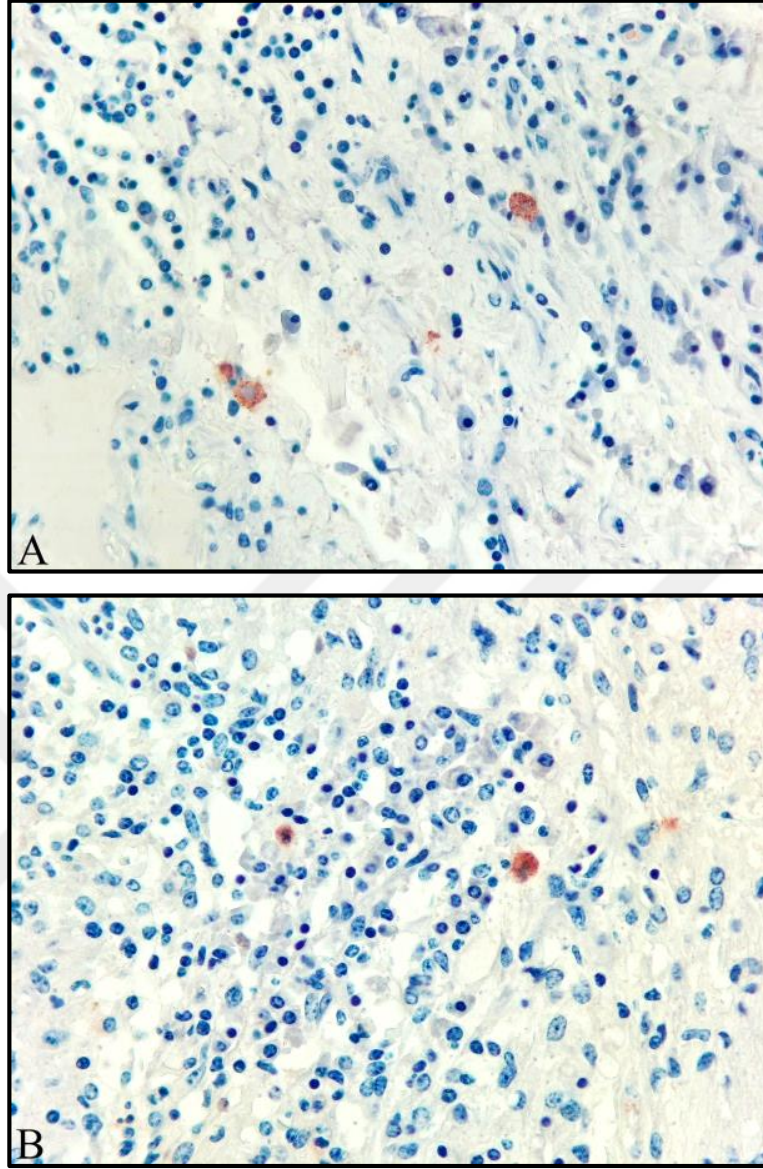


**Şekil 3.54.** Tüberkül yapısında zayıf IL4 immunopozitiflikleri, x400, ABC-P.

Kontrol grubunda ise BALT yapısında lenfositlerde; mediastinal lenf düğümlerinde lenf foliküllerindeki lenfositlerin sitoplazmalarında tuğla kırmızısı renkte, homojen immunopozitiflikler dikkati çekti.

### **3.3.6. Interleukin-17 Antikoru**

IL17 immunopozitifliği hem tüberkül yapısındaki lenfosit ve makrofajlarda (Şekil 3.55) hem de tüberkül dışında akciğerlerde intersitisyel alan, bronş ve bronşiyol ile damar çevrelerinde, mediastinal lenf düğümlerinde ise damar çevrelerinde, sinüslerde ve lenf foliküllerindeki lenfosit ve makrofajlarda immunopozitiflikler görüldü. Bu hücrelerde immunopozitiflikler tuğla kırmızısı renkte, güçlü ve/veya zayıf homojen görünümde gözlemlendi.



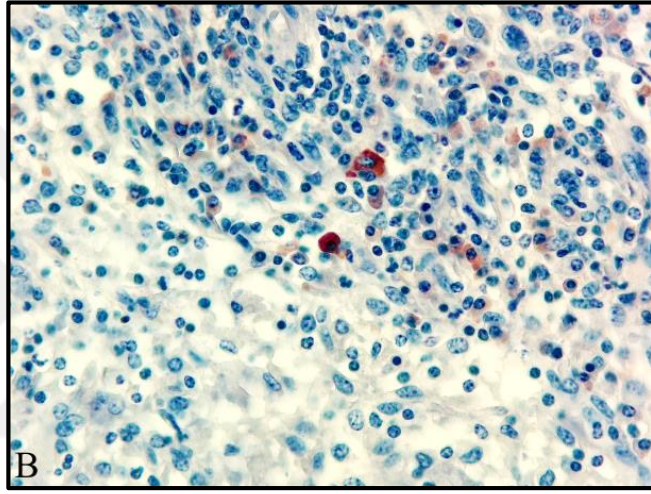
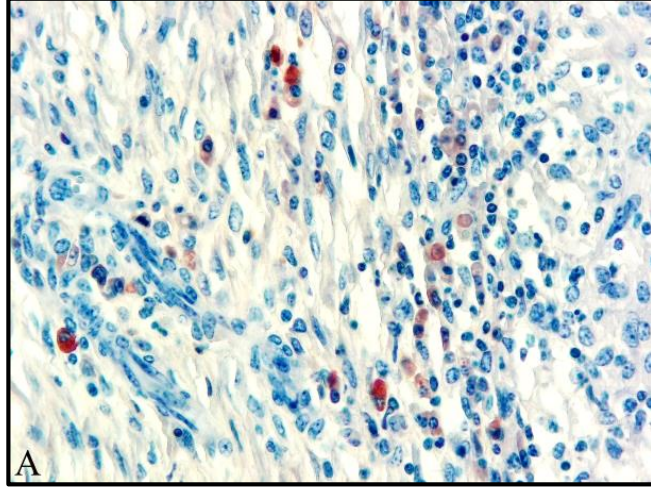
Şekil 3.55. Tüberkül yapısındaki IL17 immunopozitiflikleri, (A-B) x400, ABC-P.

Kontrol grubunda ise akciğerde bronş çevresindeki lenfositlerde; mediastinal lenf düğümlerinde, lenf foliküllerindeki lenfositlerin sitoplazmalarında homojen, tuğla kırmızısı renkte zayıf immunopozitifliklere rastlandı.

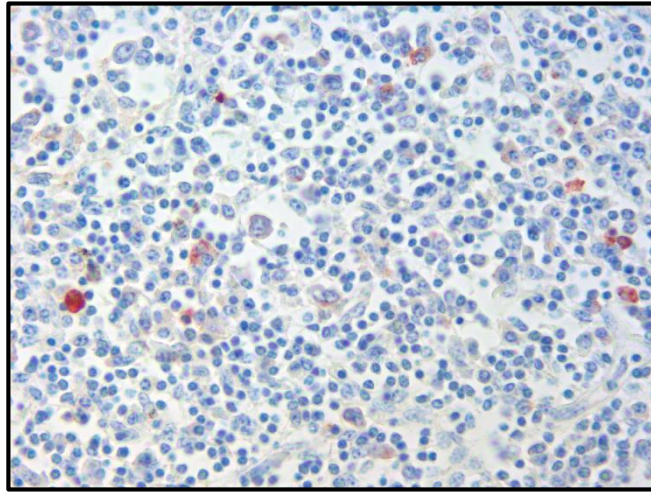
### 3.3.7. Lambda Chain Antikoru

Lambda chain immunopozitifliği akciğerlerde tüberküllerin yapısında bulunan lenfosit ve makrofajlarda (Şekil 3.56), tüberkül dışında ise bronş, bronşiyol etrafındaki lenfosit ve makrofajlarda BALT'ı oluşturan lenfositlerde görüldü. Mediastinal lenf düğümlerinde ise sinüslerde bulunan makrofaj ve lenfositlerin yanısıra lenf foliküllerindeki lenfositlerde, hücre sitoplazmalarında, homojen görünümde, tuğla kırmızısı renkte, zayıf ya da güçlü immunopozitiflikler dikkati çekti.

Kontrol grubunda ise akciğerde bronş çevresindeki makrofaj ve lenfositlerde; lenf düğümlerinde ise lenf foliküllerindeki lenfositlerde, medullar ve subkapsüler sinüslerdeki makrofajların sitoplazmalarında homojen, zayıf ve/veya güçlü, tuğla kırmızısı renkte immunopozitiflikler (Şekil 3.57) gözlemlendi.



**Şekil 3.56.** Tüberkül yapısındaki Lambda chain immunopozitiflikleri, (A-B) x400, ABC-P.

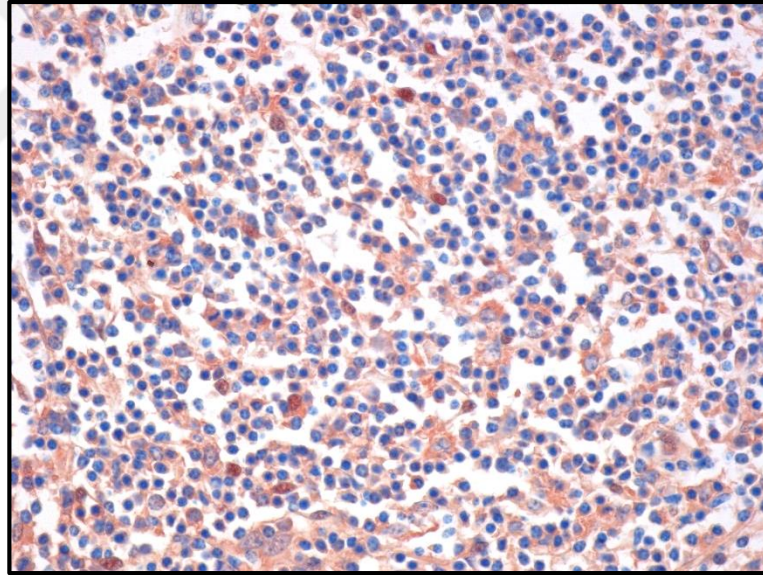


**Şekil 3.57.** Lenf foliküllerinde Lambda chain immupozitiflikleri, x400, ABC-P.

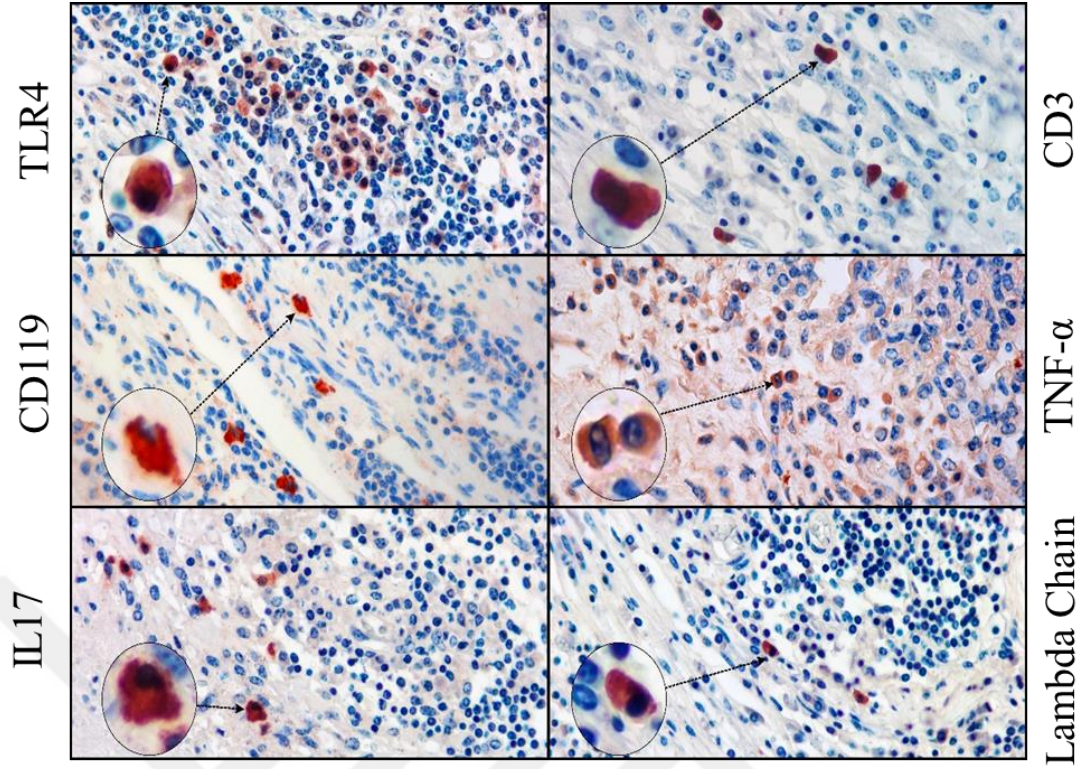
### 3.3.8. TNF- $\alpha$ Antikoru

TNF- $\alpha$  ile yapılan immunohistokimyasal boyamalarda tüberköl içinde lenfosit ve makrofajlarda, tüberköl dışında intersitisyel alan, bronş ve bronşiyol ile damar çevrelerindeki lenfosit ve makrofajlarda immunopozitiflikler göröldü. Mediastinal lenf düğümlerinde ise tüberköldeki lenfosit ve makrofajlarda, sinüslerde makrofaj ve lenfositlerde, lenf foliküllerindeki lenfositlerde immunopozitifliklere rastlandı.

Kontrol grubunda ise akciğerde bronşların çevresindeki lenfosit ve makrofajların; mediastinal lenf düğümlerinde, lenf foliküllerindeki lenfositlerde (şekil 3.58), subkapsüler ve medullar sinüslerdeki makrofajların sitoplazmasında zayıf, homojen, tuğla kırmızısı renkte immunopozitiflikler göröldü.



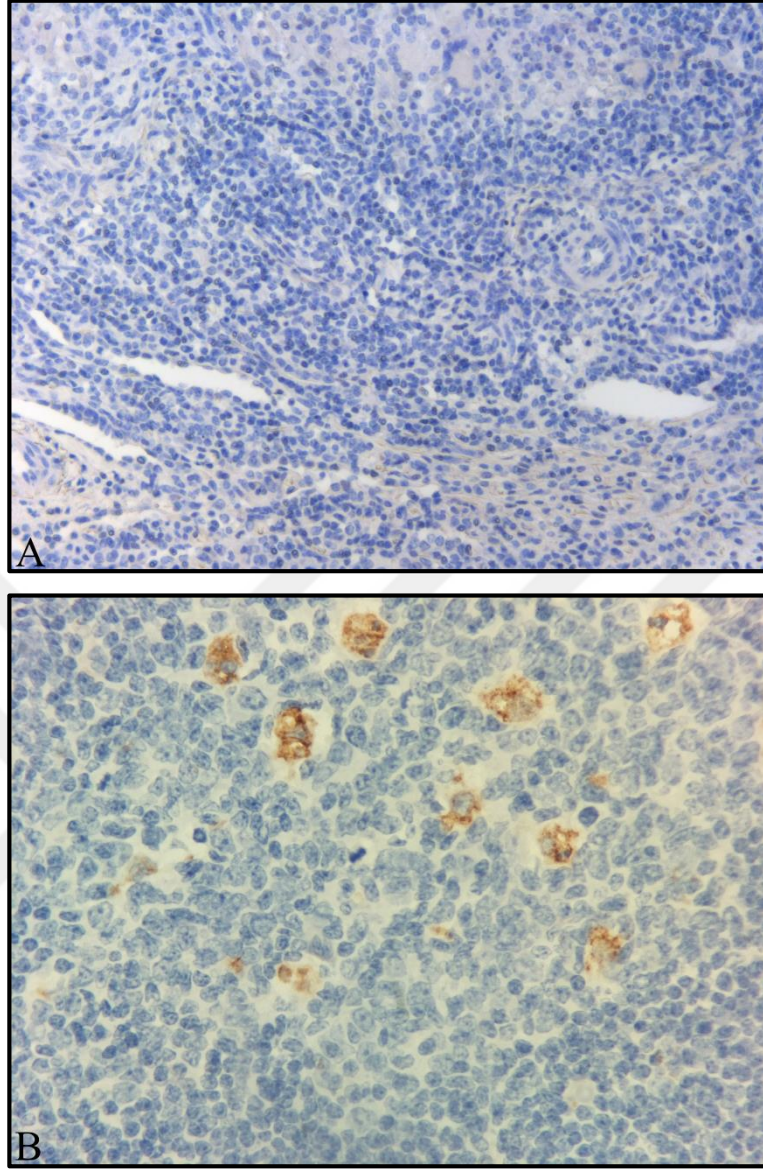
şekil 3.58. Lenf foliküllerinde TNF- $\alpha$  immunopozitiflikleri, x400, ABC-P.



**Şekil 3.59.** Tüberkül yapısında TLR4, CD3, CD119, TNF- $\alpha$ , IL-17, Lambda Chain immunopozitifliklerinin lokalizasyonları, x400, ABC-P.

### 3.3.9. CD68 Antikoru

Yapılan boyamalarda akciğer ve mediastinal lenf düğümlerinde immunopozitif hücreye rastlanmazken pozitif kontrol dokularında immunopozitifliklere rastlandı. (Şekil 3.60).

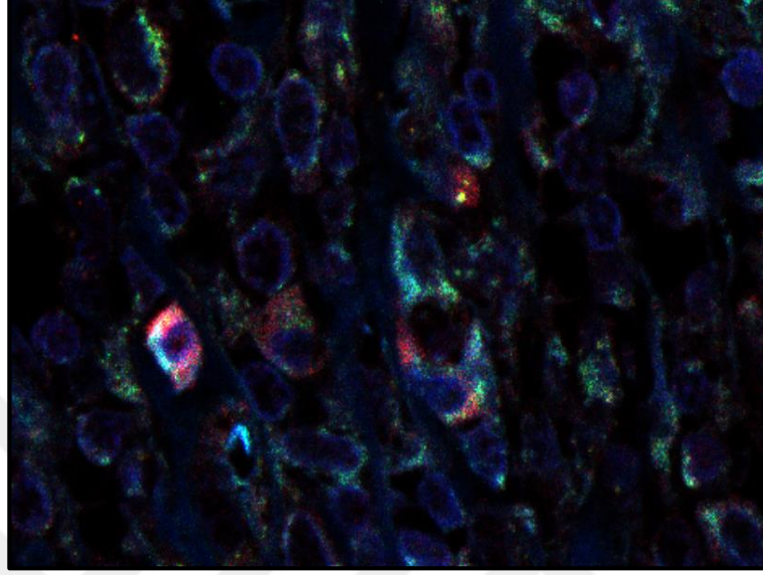


**Şekil 3.60.** Tüberkül yapısındaki hücrelerde CD68 negatifliği ve pozitif kontroldeki immunopozitiflikler, akciğer, (A) x100, lenf düğümü, (B) x400, ABC-P.

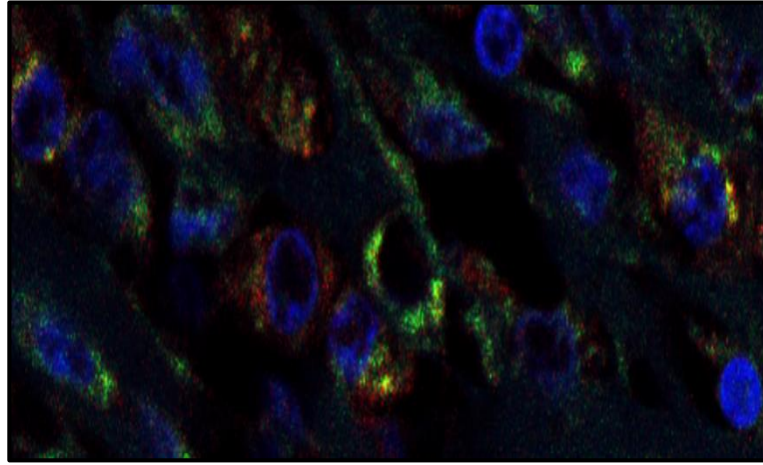
### 3.4. Konfokal Mikroskopi Bulguları

Yapılan IF yöntemiyle boyama primer antikor olarak *M. bovis*, CD3 ve TNF- $\alpha$ ; sekonder antikor olarak IL4 ve IL17 eşleştirildi (Çizelge 2.3). Daha sonra 488 ve 594 dalga boylarında konfokal mikroskopta görüntülenme yapıldı. Sonuçlarda birbirinden farklı 3'er olguda bulgulara rastlandı. Olguların birinde aynı makrofajlarda etken ve IL4 pozitifliği (Şekil 3.61) (yeşil ve kırmızı); farklı hücrelerde *M. bovis* ve IL17 (Şekil

3.62) immunopozitifliği (yeşil ve kırmızı); yine farklı hücrelerde CD3 ve IL-4 pozitifliğine rastlandı.



**Şekil 3.61.** Makrofaj sitoplazmasında *M.bovis* (yeşil) ve IL-4 (kırmızı) immunopozitifliği, akciğer, x400, IF.



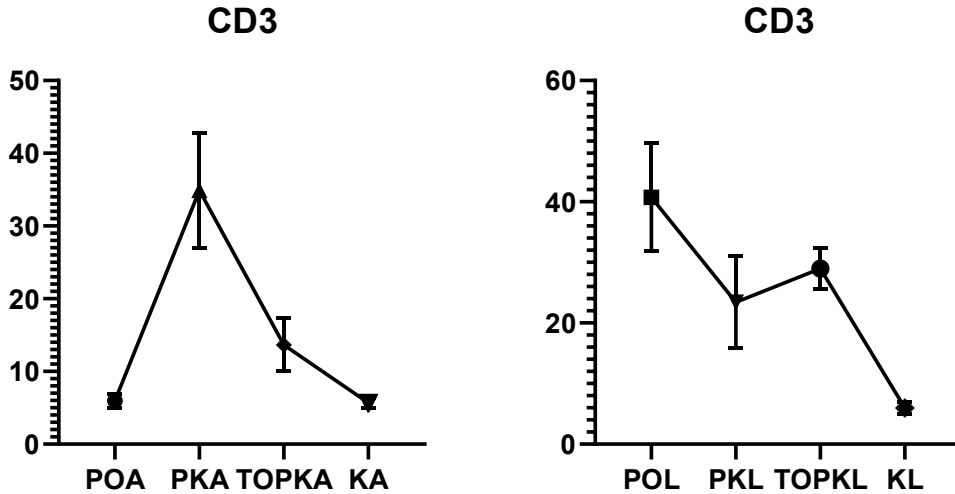
**Şekil 3.62.** Makrofaj sitoplazmasında *M.bovis* (yeşil) ve IL-17 (kırmızı) immunopozitifliği, akciğer, x400, IF.

### 3.5. Morfometrik İncelemeler

LAS 4.13 programında yapılan sayımlarda CD3, CD119, IL-17, Lambda Chain, TLR4 ve TNF- $\alpha$  antikorlarıyla yapılan immunohistokimyasal boyamalarda elde edilen sonuçlar aritmetik ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi. IL2 ve IL4 antikorlarında ise sayım için yeterli örnekte immunopozitifliğe rastlanmadı.

#### 3.5.1. CD3 Antikoru Sayımı

Morfometrik olarak CD3, primer odakta akciğerde  $6\pm 0,97$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $41\pm 8,9$ ; primer komplekste akciğerde  $35\pm 7,9$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $23\pm 7,6$ ; tam olmayan primer komplekste akciğerlerde  $14\pm 3,7$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $24\pm 3,8$  olarak hesaplandı. Kontrol gruplarında ise akciğerde  $5,7\pm 0,73$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $6\pm 0,97$  olarak bulundu (Şekil 3.63).

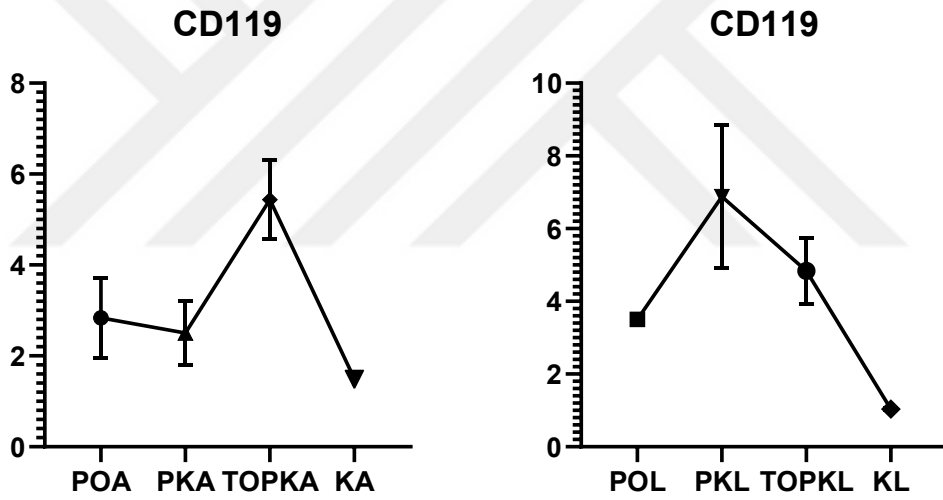


Şekil 3.63. Lezyon tiplerine göre CD3 immunopozitiflik oranı.

### 3.5.2. CD119 Antikoru Sayımı

CD119, primer odakta akciğerde  $2,8 \pm 0,88$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $3,5$ ; primer komplekste akciğerde  $2,5 \pm 0,71$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $6,9 \pm 2$ ; tam olmayan primer komplekste akciğerlerde  $5,4 \pm 0,86$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $4,8 \pm 0,91$  bulundu.

Kontrol grubunda ise akciğerde  $1,5$ , lenf düğümünde  $1,0 \pm 0,03$  bulundu (Şekil 3.64).

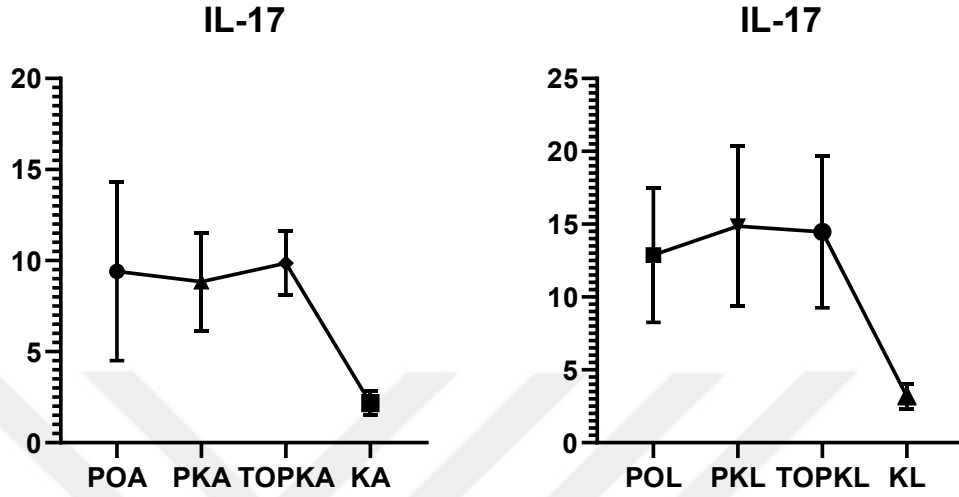


Şekil 3.64. Lezyon tiplerine göre CD119 immunopozitiflik oranı.

### 3.5.3. Interleukin17 Antikor Sayımı

Morfometrik incelemelerde IL17, primer odakta akciğerde  $9,4 \pm 4,9$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $13 \pm 4,6$ ; primer komplekste akciğerde  $8,8 \pm 2,7$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $15 \pm 5,5$ ; tam olmayan primer komplekste akciğerlerde  $9,9 \pm 1,8$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $14 \pm 5,2$  olarak hesaplandı.

Kontrol gruplarında ise akciğerde  $2,2 \pm 0,67$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $3,2 \pm 0,88$  olarak saptandı (Şekil 3.65).

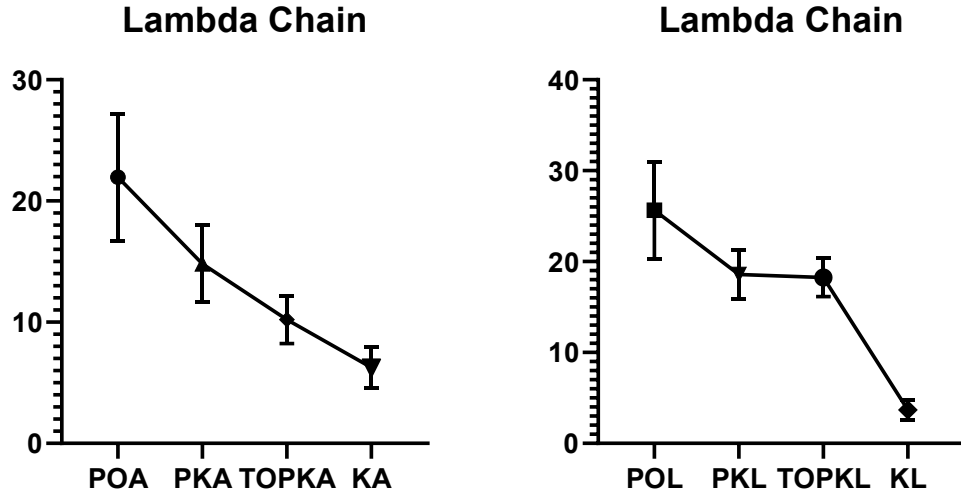


Şekil 3.65. Lezyon tiplerine göre IL17 immunopozitiflik oranı.

### 3.5.4. Lambda Chain Antikor Sayımı

Lambda Chain ile ilgili morfometrik incelemelerde primer odakta akciğerde  $22 \pm 5,2$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $26 \pm 5,3$ ; primer komplekste akciğerde  $15 \pm 3,2$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $19 \pm 2,7$ ; tam olmayan primer komplekste akciğerlerde  $10 \pm 2$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $18 \pm 2,1$  olarak hesaplandı.

Kontrol grubunda akciğerde  $6,3 \pm 1,7$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $3,7 \pm 1,1$  olarak ölçüldü (Şekil 3.66).

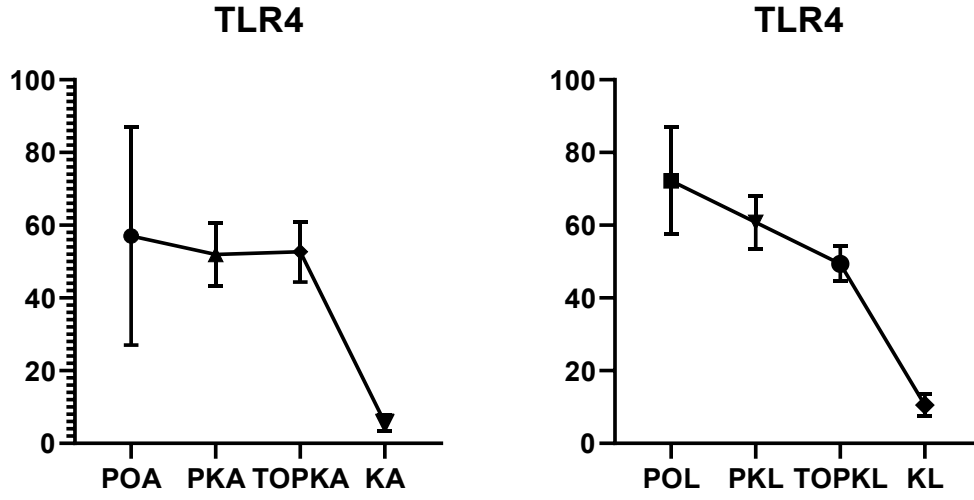


Şekil 3.66. Lezyon tiplerine göre Lambda Chain immunopozitiflik oranı.

### 3.5.5. TLR4 Antikoru Sayımı

Morfometrik incelemelerde TLR4, primer odakta akciğerde  $57 \pm 30$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $72 \pm 15$ ; primer komplekste akciğerde  $52 \pm 8,7$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $61 \pm 7,3$ ; tam olmayan primer komplekste akciğerlerde  $53 \pm 8,3$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $49 \pm 4,9$ 'du.

Kontrol grubunda ise akciğerde  $5,7 \pm 2,2$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $11 \pm 3,1$  olarak bulundu (Şekil 3.67).

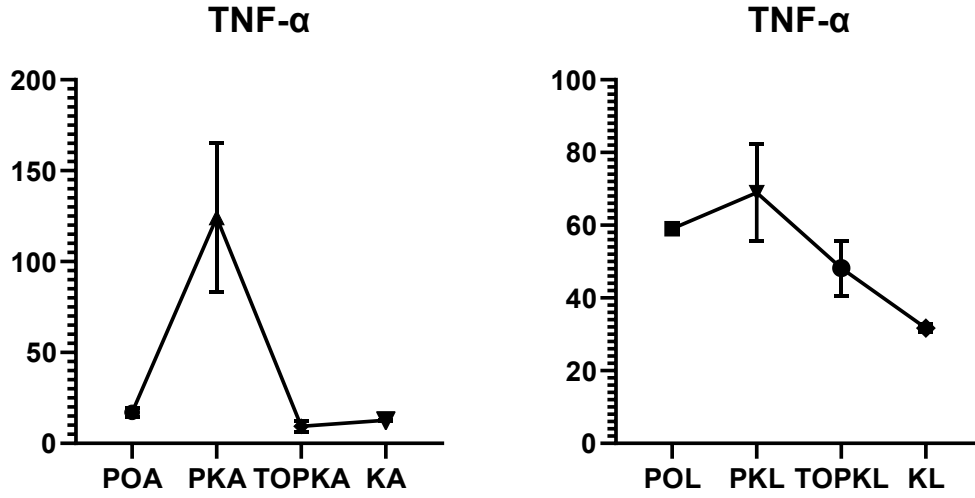


Şekil 3.67. Lezyon tiplerine göre TLR4 immunopozitiflik oranı.

### 3.5.6. TNF- $\alpha$ Antikor Sayımı

Morfometrik incelemelerde TNF- $\alpha$ , primer odakta akciğerde  $17 \pm 2,4$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $59 \pm 0,58$ ; primer komplekste akciğerde  $124 \pm 41$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $69 \pm 13$ ; tam olmayan primer komplekste akciğerlerde  $9,4 \pm 3,1$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $48 \pm 7,6$  olarak hesaplandı.

Kontrol grubunda ise akciğerde  $13 \pm 0,44$ , mediastinal lenf düğümlerinde  $32 \pm 1,1$  olarak bulundu (Şekil 3.68).



Şekil 3.68. Lezyon tiplerine göre TNF- $\alpha$  immunopozitiflik oranı.

Yapılan morfometrik incelemeler sonrası elde edilen değerler Çizelge 3.8’da özetlendi.

Çizelge 3.8. Morfometrik incelemelerde elde edilen sonuçlar.

Antikor	POA	POL	PKA	PKL	TOPKA	TOPKL	KA	KL
CD3	6±0,97	41±8,9	35±7,9	23±7,6	14±3,7	24±3,8	5,7±0,73	6±0,97
CD119	2,8±0,88	3,5	2,5±0,71	6,9±2	5,4±0,86	4,8±0,91	1,5	1,0±0,03
IL-17	9,4±4,9	13±4,6	8,8±2,7	15±5,5	9,9±1,8	14±5,2	2,2±0,67	3,2±0,88
Lambda Chain	22±5,2	26±5,3	15±3,2	19±2,7	10±2	18±2,1	6,3±1,7	3,7±1,1
TLR4	57±30	72±15	52±8,7	61±7,3	53±8,3	49±4,9	5,7±2,2	11±3,1
TNF-a	17±2,4	59±0,58	124±41	69±13	9,4±3,1	48±7,6	13±0,44	32±1,1

### 3.6. İstatistiksel Bulgular

Akciğerde CD3 için morfometrik incelemelerde gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0,002$ ). Gruplar arasındaki çoklu karşılaştırmalarda ise POA-PKA grupları arasında ( $p=0,015$ ) ve PKA-KA grupları arasında ( $p=0,008$ ) istatistiksel olarak fark anlamlı iken, POA-TOPKA ( $p=0,264$ ),

POA-KA (p=0,821), PKA-TOPKA (p=0,336), TOPKA-KA (p=0,187) arasında anlamlı fark bulunamadı. Mediastinal lenf düğümlerinde ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p=0,011). Gruplar arasındaki çoklu karşılaştırmalarda POL-KL (p=0,003), TOPKL-KL (p=0,005) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken, POL-PKL (p=0,074), POL-TOPKL (p=0,385), PKL-TOPKL (0,168), PKL-KL (p=0,089) grupları arasında farka rastlanılmadı.

CD119 için yapılan istatistiksel incelemelerde, akciğerde morfolometrik incelemelerde elde edilen veriler ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü (p=0,024). Gruplar arasında yapılan çoklu karşılaştırmalarda ise TOPKA-KA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farka rastlanırken (p=0,008), POA-PKA (p=0,786), POA-TOPKA (p=0,188), POA-KA (p=0,309), PKA-TOPKA (p=0,064), PKA-KA (p=0,415) grupları arasında ise fark saptanmadı. Mediastinal lenf düğümlerinde ise gruplar arasında anlamlı fark elde edildi (p=0,014). Gruplar arasında ise PKL-KL (p=0,006) ve TOPKL-KL (p=0,012) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülürken diğer gruplar arasında (POL-PKL, p=0,511; POL-TOPKL, p=0,814; POL-KL, p=0,231; PKL-TOPKL, p=0,396; PKL-KL, p=0,396) anlamlı fark gözlenemedi.

IL17 için yapılan morfolometrik incelemelerde elde edilen verilerde akciğerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (p=0,174). Gruplar arasında yapılan çoklu karşılaştırmalarda ise yalnızca TOPKA-KA grupları arasında anlamlı fark elde edildi (p=0,027). POA-KA (p=0,894), POA-TOPKA (p=0,488), POA-KA (p=0,145), PKA-TOPKA (p=0,497) ve PKA-KA (p=0,078) grup karşılaştırmalarında ise istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi. Lenf düğümlerinde de aynı şekilde gruplar arasında istatistiksel anlamda fark dikkati çekmedi (p=0,528). Aynı şekilde gruplar arasında yapılan çoklu karşılaştırmalarda da herhangi bir farka rastlanmadı (POL-PKL, p=0,719; POL-TOPKL, p=0,762; POL-KL, p=0,172; PKL-TOPKL, p=0,937; PKL-KL, p=0,196; TOPKL-KL, p=0,179).

Lambda chain için akciğerde yapılan morfolometrik incelemelerde elde edilen

sonuçlar karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı bir sonuç elde edilemedi ( $p=0,099$ ). Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise POA-TOPKA ( $p=0,045$ ) ve POA-KA ( $p=0,026$ ) grupları arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunurken, POA-PKA ( $p=0,208$ ), PKA-TOPKA ( $p=0,312$ ), PKA-KA ( $p=0,143$ ) ve TOPKA-KA ( $p=0,454$ ) grupları arasında anlamlı farka rastlanmadı. Aynı şekilde mediastinal lenf dđđümlerinde de gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunamazken ( $p=0,53$ ), çoklu karşılaştırmalarda POL-KL ( $p=0,006$ ), PKL-KL ( $p=0,017$ ) ve TOPKL-KL ( $p=0,019$ ) grupları arasında istatistiki olarak anlamlı fark görüldü. Diğer gruplarda ise (POL-PKL,  $p=0,334$ ; POL-TOPKL,  $p=0,227$ ; PKL-TOPKL,  $p=0,783$ ) anlamlı farka rastlanmadı.

Morfometrik incelemelerde TLR4 için yapılan sayımlarda, akciğerdeki gruplar karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiki olarak önemli bir fark görülmedi ( $p=0,085$ ). Gruplar arasında çoklu karşılaştırmalarda ise PKA-KA ( $p=0,018$ ) ve TOPKA-KA ( $p=0,011$ ) grupları anlamlı fark dikkati çekti. POA-PKA ( $p=0,918$ ), POA-TOPKA ( $p=0,906$ ), POA-KA ( $p=0,064$ ) ve PKA-TOPKA ( $p=0,653$ ) grupları arasında ise fark tespit edilmedi. Mediastinal lenf dđđümlerinde ise gruplar arasında istatikselsel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi ( $p=0,021$ ). Gruplar arasında çoklu karşılaştırmalarda POL-KL ( $p=0,004$ ), PKL-KL ( $p=0,005$ ) ve TOPKL-KL ( $p=0,018$ ) grupları arasında istatistiki olarak anlamlı farklılık elde edilirken, POL-PKL ( $p=0,441$ ), POL-TOPKL ( $p=0,159$ ), PKL-TOPKL ( $p=0,299$ ) grupları arasında fark görülmedi.

Akciğerdeki gruplar arasında TNF- $\alpha$  için yapılan morfometrik incelemelerde elde edilen sonuçlara göre gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı sonuç elde edildi ( $p<0,001$ ). Gruplar arasında yapılan çoklu karşılaştırmalarda ise PKA-TOPKA ( $p=0,001$ ) ve PKA-KA ( $p=0,014$ ) anlamlı fark gözlenirken; diğer gruplar arasında (POA-PKA,  $p=0,084$ ; POA-TOPKA,  $p=0,169$ ; POA-KA,  $p=0,408$ ; TOPKA-KA,  $p=0,654$ ) anlamlı fark görülmedi. Mediastinal lenf dđđümlerinde ise gruplar arasında ( $p=0,331$ ) ve gruplar arasındaki çoklu karşılaştırmalarda (POL-PKL,  $p=0,868$ ; POL-TOPKL,  $p=0,366$ ; POL-KL,  $p=0,170$ ; PKL-TOPKL,  $p=0,239$ ; PKL-KL,  $p=0,120$ ; TOPKL-KL,  $p=0,381$ ) istatistiki olarak anlamlı farka rastlanmadı.

## 4. TARTIŞMA

Sığır tüberkülozu, çoğunlukla *Mycobacterium bovis*'in neden olduğu önemli kronik bir hastalıktır. Hastalıktan sığırların yanısıra, birçok hayvan türü ve insanlar da etkilenmektedir (LoBue ve ark., 2010 ve Thoen ve ark., 2006). Hemen hemen tüm dünya ülkelerinde geçmişte rapor edilen bir hastalık olan bTB, Afrika ve Hindistan'da endemik olarak seyretmektedir (Perry ve ark., 2013). Dünya çapında 4. en önemli hayvancılık hastalığı olarak kabul edilen bTB, yıllık milyarlarca dolar maddi kayba, süt üretim verimliliğinde ise %30'lara varan kayıplara neden olmaktadır (Boland ve ark., 2010 ve Garnier ve ark., 2003).

Dünya Hayvan Sağlığı Organizasyonu Ocak 2017 ve Haziran 2018 arasında 188 bölgede, Türkiye dahil 82 ülkede (%44) bTB hastalığı bildirilmiştir. Bu verilere göre Türkiye'de 2018'de çeşitli illerde toplam 1629 bTB salgını, 110.000 şüpheli, 11.040'de aktif vakanın bulunduğu kaydedilmiştir.

İnsanlarda görülen bTB vakalarının ise dünyada %10'a ulaştığı gözlenmiştir (WOAH, 2018). Türkiyede ise yapılan bölgesel bir çalışmada bu oran %1,4 olarak belirtilmiştir (Öztürk ve ark., 2016). Bu durum hayvan ve insan sağlığı açısından enfeksiyonun rezervuarı olarak kabul edilen sığırların hastalığın bulaşmasında ve yayılmasındaki önemini de göstermektedir.

Hastalığın bulaşmasında en yaygın yol, enfekte partiküllerin inhalasyonu ile ortaya çıkan aerojen yoldur. Aerojen yolla alınan etken nasofarenks, alt solunum yolları, özellikle akciğer ve bölgesel lenf düğümlerinde lezyonlar oluşturmaktadır. (Neill ve ark., 1994 ve Neill ve ark., 2001). Kontamine su, yiyecek ve ekipman ile temasla da alimenter yolla da bulaşma görülmektedir. Alimenter yolla alınan etken farenks, bölge lenf düğümlerinde, nadiren tonsil, bağırsak ve bölgesel lenf düğümleri

etkilenmektedir (Domingo ve ark., 2014; Neill ve ark., 1994 ve Neill ve ark., 2001 ve Terefe, 2014). Çalışmada mezbaha kesimlerinden elde edilen bTB'li örneklerden faydalanılmış olup lezyonların hepsi ya akciğerde ya bölgesel lenf düğümlerinde ya da her ikisinde görülmüştür. Bu da direkt olarak enfeksiyonun çok büyük bir oranda aerojen yolla olduğunu düşündürmektedir. Kaynaklara göre tüberküllerin tek başına görüldüğü, en çok etkilenen organlar retrofaringeal lenf düğümleri (%29,4), mediastinal lenf düğümleri (%28,2), trakeobronşiyel lenf düğümleri (%18), akciğerler (%8), mezenterik lenf düğümleri (%2,9), parotid lenf düğümleri (%2,4) ve kaudal servikal lenf düğümleri (%2,4)'dır (Corner ve ark., 1990). Çalışmada da lenf düğümlerinde (n:77), akciğerlerden (n:46) daha fazla lezyon görülmesine rağmen, tek başına sadece lenf düğümünde 47 (%51), akciğerde ise 16 (%17,2) hayvanda lezyon görülmüştür. Bu durum akciğerde görünme oranının literatürden farklı olarak daha yüksek oranda olduğunu göstermektedir. Ancak çalışmada yoğunlaşılacak organlar göğüs boşluğunda bulunan, daha çok da akciğer ve mediastinal lenf düğümleri olduğundan bu oranın yüksek çıktığını düşündürmektedir.

Domingo ve ark., (2014) özellikle tam olmayan primer komplekslerde lenf düğümlerinde lezyon görülse dahi akciğerde lezyonların genellikle görülmediğini ileri sürerken, McIlroy ve ark. (1986) nekropside detaylı aramalar sonucunda olguların %70'inde primer lezyonun görüldüğünü ileri sürmüşlerdir. Çalışmada bu oran %51 olarak bulunmuştur. Bunun en önemli sebebi ise yapılan numune toplama işleminin mezbaha ortamında yapılması ve özellikle akciğerin ekonomik önemi nedeniyle, kasapların belirgin bir lezyon olmayan akciğeri elletmeyip, sadece çok belirgin lezyonlu akciğerlerden örnek alınmasına müsaade etmesi nedeniyle detaylı bir inceleme yapılamamasıdır.

Tüberküloz'un yaygın makroskobik lezyonları, değişen boyutlarda çoğunlukla kranial loblarda nadiren tüm lobları kaplayan, kesit yüzü sarı-boz renkte bağ doku ile çevrili tüberküllerdir. Bu tüberküller bağ dokusuyla sınırlandırılmıştır ve merkezlerinde kazeöz nekroz ile kireçlenme görülür (Domingo ve ark., 2014). Çalışmada özellikle akciğerin kranial loblarında 2-30 mm boyutlarında, etrafı bağ

dokusu ile çevrili, sert kıvamda, yüzeyden taşkın, kesit yüzünde sarı-yeşil renkte irinli ve kazeifiye tüberküller gözlenmiştir. Bölgesel lenf düğümleri ise şişkin ve 4-40 mm boyutlarında, yüzeyden taşkın, kesit yüzü sarı-yeşil renkli irinli ve/veya belirgin kazeifiye dokulardan ibaretti. Akciğer ve lenf düğümlerinde görülen bu makroskobik bulgular kaynaklarla büyük oranda benzerlik göstermektedir.

Akciğerde bazı olgularda primer enfeksiyon döneminde bronşiyoler ve bronşiyal yol boyunca multifokal geniş kazeöz nekrozlu, granülomlar ve kavernöz lezyonlar görüldüğü bildirilmektedir. Domingo ve ark. (2014) bu dönemin dışında yaygın kazeöz nekrozla birlikte hava kanallarında ülserin görülmesiyle karakterize kronik organ tüberkülozundan da bahsetmektedir. Hatta bu lezyonların hem akciğer hem de lenf düğümlerinde olduğunu, nekrozun tamamen lenf düğümünü kapsadığına dikkat çekmişlerdir. Oysa bazı kaynaklarda görülen lezyonların daha önce geçirilen enfeksiyona ait olduğu bildirilmiştir. Çalışmada bu şekilde lezyonlara rastlanılmamıştır. Çalışmada lenf düğümlerinde 3 olguda neredeyse tüm paransimi kapsayan granümatöz değişiklikler görülmüştür. Ancak bu olgularda akciğerde granülom yapılarına ve hava yollarında ülserlere rastlanmaması ve kavernöz lezyonların görülmemesi nedeniyle kronik organ tüberkülozu olarak göz önüne alınmamıştır. Bu durum hastalıkla ilgili taramaların sürekli yapılması nedeniyle, bazı kaynaklarda da olduğu gibi (Cassidy, 2006 ve Van Rhijn ve ark., 2008) erken dönemde hastalığın saptanmasına yorumlanmıştır.

Öztürk-Gürgen ve ark. (2020) tüberkülleri, makroskobik olarak görülen yangı bulguları (kazeöz nekroz alanları, yangı alanları ve fibröz doku), bu bulguların düzeni ve tüberküllerin çapı, sayısı gibi kriterlerle makroskobik olarak 5 modelde sınıflandırılmıştır. Buna göre; I. Modelde 5 ile 24 mm, kesit yüzünde 3 merkezden oluşan lezyonları tanımlamıştır. Merkezde sarı renkte kuru, bazı alanlarda sarı-beyaz renkte düzensiz odaklar bulunan, kesit atarken çıtırtı sesi gelen, çevresinde de açık kahverengi renkte alanları en dışta beyazımsı-gri renkte çevreleyen lezyonlar tanımlanmıştır. II. Modelde düzen ve oluşum I. Modele benzerken multifokal ve 0,5 cm'den küçük odaklar şeklinde bildirilmiştir. III. modelde diğer modellerde belirtilen

merkezlerin belirgin olmadığı, genel olarak akciğerlerin büyük bir bölümünü, lenf düğümlerinin de tamamını kapsadığı ve kesit yüzlerinin kaygan-sarı renkte, iyi ayırt edilemeyen merkezleri olduğu belirtilmiştir. IV. model lezyonun boyutu ile karakterize edilmiştir. Lenf düğümlerinin kesit yüzlerinin tamamının değiştiği, kazeöz merkezlerin daha yaygın olduğu, orta ve dış katmanların I. Modeldeki lezyonlardan daha küçük olduğu veya ayırt edilemediği bildirilmiştir. V. Modelde genellikle I. Modelle kombinasyon şeklinde görülmüştür. Bu modelde kazeöz dokunun likefaksiyonu sonucu kaviteğin oluşturulduğu bildirilmiştir. Ayrıca akciğere özel bir VI. model de tanımlanmıştır. Bu modelde akciğer lobüllerinin ya da lobüllerin bir kısımlarının, düzensiz sarımsı odağa sahip kahverengi alanlar şeklinde tanımlanmıştır. Çalışmada Öztürk-Gürgen ve ark. (2020)'ın bu modellemesini dikkate alarak gruplandırma yapılmak istenmesine rağmen, daha önce de ifade edildiği gibi numune toplama işlemlerinin mezbaha şartlarında, hızlı bir şekilde yapıyor olmasının detaylı incelemeyi engellemesi, gözden bazı bulguların kaçma olasılığı dikkate alınarak makroskobik modellemeden kaçınılmış, mikroskobik evrelendirme tercih edilmiştir. Bu bağlamda akciğer ve mediastinal lenf düğümlerinde kesim için gönderilen hayvanlardan örnekler alınmıştır. Buna göre: **I. Evre (Epiteloid tüberkül):** Kapsül ve nekroz görülmeyen çok sayıda epiteloid makrofaj kümeleri, lenfositler ve nötrofil lökositlerden, tek tük Langhans tipi dev hücreler; **II. Evre:** Kısmen veya tamamen ince bağ doku kapsülü ile çevrili, küçük bir alanda nekrozun eşlik ettiği yoğun olarak epiteloid makrofajlardan ve diğer yangısal hücreler ve Langhans tipi dev hücrelerinin bulunduğu; **III. Evre:** Granülomun merkezinde kazeöz nekroz, kireçlenme; nekrozun etrafında epiteloid makrofajlar, Langhans tipi dev hücreler, lenfositlerle karışmış makrofajlar ve tek tük nötrofil lökositler görülebildiği ve tüm bu yapıları en dışta fibröz bir kapsülün sınırladığı; **IV. Evre:** Etrafı kalın bağ dokusuyla çevrili, geniş ve düzensiz, yer yer kalsifiye multisentrik nekroz odaklarına sahip granülomlardır. Nekrozun etrafında III. Evrede olduğu gibi epiteloid makrofajlar ve Langhans tipi dev hücreleri görülür. Bağ dokusuna yakın alanlarda lenfosit kümeleri olan tüberkül yapıları şeklinde sınıflandırılmıştır (Wangoo ve ark., 2005).

Mikroskobik olarak ilk aşamada nötrofil lökosit, epiteloid makrofaj ve birkaç Langhans tipi dev hücreden oluşan odaklar görülmektedir (Domingo ve ark., 2014).

Çalışmamızda akciğerde benzer odaklara rastlanmakla birlikte (n:7), sadece 1 olguda Langhans tipi dev hücre infiltrasyonları gözlenmiştir. Bu olgular I. Evre granülomlar olarak değerlendirilmiştir. Yer yer nekrozun eşlik ettiği olgularda ise II. Evre granülom tanısı konulmuştur. Çalışmamızda bu tip granülom yapılarına akciğerler ve lenf düğümlerinde 2 odakta rastlanmıştır ve bu olgulara II. Evre granülom tanısı konulmuştur. Üçüncü evre granülomların ise merkezde kireçlenmiş kazeöz nekroz alanları ile çevresinde belirtilen hücreler, en dışta bağ dokudan kapsülle sarılı tipik tüberkül yapısı hakimdi. Çalışmada bu evreye akciğerde 7, lenf düğümlerinde ise 8 olguda rastlanılmıştır. Granülom yapıları merkezde kazeöz nekroz ve kireçlenme olarak tanımlansa da bazı granülom yapılarında birden çok kazeöz nekroz olabileceği görülmüştür. Çalışmada bu tip lezyonlara akciğerde 25, lenf düğümünde 55 olguda rastlanmıştır ve IV. evre granülom tanısı konulmuştur. Araştırmacılar tarafından (Johnson ve ark., 2006 ve Wangoo ve ark., 2005) granülomların evrelendirmesi yalnızca lenf düğümünde yapılmış olsa bile, çalışmada bu lezyonların birebir aynı şekilde, akciğerlerde görünen lezyonlarla benzer olması, bu evrelendirmenin akciğerlerde de değerlendirebileceğini düşündürmüştür.

Wangoo ve ark. (2005), granülomların etrafında görülen bağ dokuya göre evrelendirmiştir. Buna göre I. Evrede bağ doku oluşumu görülmediği, II. Evrede de tek sıra fibroblasttan oluşan granülomun belirli bir bölümünü ya da tamamını saran ince bir bağ dokusu; III. ve IV. evrelerde granülom yapısının tamamını saran kalın bir bağ dokusundan kapsül gözlenmiştir. Palmer ve ark. (2022) da III. evre granülomların etrafındaki kapsülün belirgin bir fibröz dokudan ibaret olduğuna dikkat çekerken, kalınlığıyla ilgili yorumda bulunmamıştır. Ancak yine IV. Evre granülomların kalın bağ dokusundan kapsülle sarıldığından bahsetmiştir. Yapılan çalışmada ise I ve II. evre granülomlarda bulgular kaynaklarla uyumlu iken, III. evre tanısı konulan granülomlardan lenf düğümünde 2 olguda, IV. evre tanısı konulan granülomlarda ise akciğerde 2 olguda ince bağ dokudan kapsüle rastlanmıştır. İnce bağ dokudan kapsülün görülmesi sebebi ise granülomların genişlemiş olabileceğidir. Granülomların genişlemesinin primer olarak, infiltre olan hücrelerin değil merkezi nekroz alanının genişlemesi nedeniyle olduğu bildirilmiştir (Wangoo ve ark., 2005; Ulrichs ve Kaufmann, 2006). Bağ doku oluşumunu başlatan hücrelerin granülom yapısında

bulunan hücrelerden salgılanan sitokinler olduğu düşünülürse (Palmer ve ark., 2022), granülom büyüse dahi hücre artışının olmaması bağ dokusunda incelmeye neden olabileceğini düşündürmüştür.

Hastalıkta dev hücrelerinin morfolojik karakteri at nalı ve/veya taç şeklinde sıralanmış hücre çekirdeklerinden oluşan Langhans tipi dev hücreleri ya da belirgin bir hücre dizilimine sahip olmayan yabancı cisim dev hücreleri olarak görülmektedir (Palmer ve ark., 2016). Kaplan ve ark. (1983), dev hücrelerinin hastalıktaki fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte eksikliklerinde immun sistemin yeterli etkiyi gösteremediğini bildirmiştir. Çalışmada görülen cisimlerin morfolojisi kaynaklarla benzerlik göstermekte; ancak sitoplazmalarında görülen etken antijenleri ve fagosite edilmiş hücreler göz önüne alındığında, yangı alanında zarar gören yapıların ve etkenlerin fagosite edilmesi için oluştukları düşünülmüştür. Oluşan dev hücre miktarının yüksek olması da hastalığa karşı güçlü immun yanıtın bir göstergesi olabilir.

Gelişmekte olan ülkelerde büyük bir sağlık problemi olan tüberküloz hastalığının teşhisi için hızlı ve düşük maliyetli bir yöntem olan asit-fast boyama yönteminden yararlanılmaktadır. Asit-fast basiller için geleneksel ZN yöntemi, Tüberküloz'un teşhisi ve tedavi izlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemin en büyük dezavantajı %20 ile %43 arasında değişen duyarlılığıdır (Annam ve ark., 2009; Balows ve ark. 1991 ve Savic ve ark., 1992). Humphrey ve Weiner (1987), bu düşük duyarlılığın nedeni olarak ZN yöntemiyle, sadece sağlam etkenlerin boyanmasını göstermişlerdir. Ayrıca Ulrichs ve ark. (2005), preparatlarda mikobakteriyel etkenlerin az olması durumunda (preparatta  $<10^4$  etken) ZN boyamasıyla etkenlerin görülemeyebileceğini bildirmiştir. Çalışmada prodüktif olgulardaki tüm hayvanlardan alınan kesitlere ZN boyaması yapılmasına rağmen, olguların sadece %11'inde asit-fast etken görülmüştür. Buna karşın etkenin immunohistokimyasal yöntemle boyanmasında tüm prodüktif olgularda akciğer ve/veya lenf düğümlerinde çomak ve/veya granüler yapıda *M.bovis* antijenine rastlanmıştır. Granüler görünüm etkenin parçalandığına ve/veya zarar gördüğüne yorumlanmıştır. Ziehl Neelsen boyama oranının azlığı ise hem etken yükünün azlığına

(preparatta  $<10^4$  etken) hem de etkenin zarar görmesine bağlanmıştır. İmmunohistokimyasal yöntemle etken boyamasında ise çapraz reaksiyon görülebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Araştırmacılar aynı zamanda bu çalışmada, poliklonal etken serumuyla yaptıkları boyamalarda *Corynebacteriae*, *Actinomycetae*, *Nocardiae* aileleri ve *Staphylococcus aureus*'a karşı çapraz reaksiyon görmüşlerdir. Ancak granümatöz lezyonlarda yapılan patolojik teşhislerde dokularda etken antikoruyla reaksiyon görülmesinin yanlış pozitif sonuçların, yöntemin tanısal değerini etkilemeyeceğini belirtmiştir. Çalışmada elde edilen verilere göre prodüktif lezyon görülen olgularda mikobakteriyel etkenlerin immunohistokimyasal boyamalarla yapılmasının, hastalığın yaygın olduğu bölgelerde hızlı teşhisi için kullanışlı bir araç olduğu kanısına varılmıştır.

Palmer ve ark. (2007)'nin deneysel olarak sığırlar üzerinde *M.bovis* ile yaptıkları bir çalışmada lenf düğümlerinde, inokulasyonun 15. gününde I. evre granülomlar görülürken 28 ve 60 günler arası granülom oluşumlarında gözle görülür ilerleme kaydedilmiş, 60 gün sonunda ise tüm evreler görülmeye başlanmıştır. Enfeksiyonun 60. gününden sonra III ve IV. Evre granülom yapılarına sıklıkla rastlanırken bunların etrafında I. evre granülomlar dikkati çekmektedir. Bu durumda saptanan I. Evre granülomlar “uydu granülomları” olarak adlandırılmıştır. Çalışmada genellikle Palmer ve ark. (2007) görüşüne uygun olarak III ve IV. evre granülomlar hakimdi ve bu evrelerin etrafında uydu granülomları mevcuttu. Bu durum aynı zamanda enfeksiyonun 60 günün üzerinde olabileceğini düşündürmüştür. Ancak çalışmada az sayıda da olsa sadece I. ve II. evre granülomların akciğer (n:9) ve lenf düğümlerinde (n:10) görülmesi, kesimlerin aynı gün ve aynı sürüde yapılmasına rağmen enfeksiyonun üzerinden 60 günün geçmesi kuralına aykırıydı. Bu hayvanlarda ise enfeksiyonun erken dönem olduğu ve henüz sürüde yeni bulaşmaya maruz kalanlar olduğunu ya da sürüye zaman içinde aradan katılan hayvanlar olduğunu düşündürdü. Yetkili birimlerce sürünün detay bilgileri gizlilik kapsamında bizlerle paylaşılmadığı için tüm bu yorumlar varsayımdan ibarettir.

Çalışmada primer odak (n:2), primer kompleks (n:1), tam olmayan primer kompleks (n:4) saptanan olgularda akciğerlerde bronş, bronşiyol ve damar çevresinde; interalveoler alanlarda çoğunluğu lenfositlerden oluşan mononükleer hücre infiltrasyonları görülmüştür. Bu durum bTB ile eşzamanlı viral enfeksiyonların olabileceğini düşündürmüştür. Nitekim adi ve kompleks mikroorganizmaların genellikle viral enfeksiyonlarla beraber görülmesi ya da sekonder olarak ortaya çıkması akciğerde bronko-intersitisyel pnömoni veya bronkopnömoni oluşumuyla karakterizedir (Ellis, 2009; Lopez, 2007 ve Panceria ve Confer, 2010).

Aerojen yolla alınan etken öncelikle akciğere gelerek primer enfeksiyonu oluşturmaktadır. Özellikle bu dönemde alveoler makrofajlar sayıca artmakta ve etkeni fagosite etmek istemektedir. Ancak etken yapısında yer alan LAM'lerden (ManLAM, LAM, AraLAM) dolayı kolaylıkla fagosite edilememektedir. Nitekim ManLAM bir taraftan makrofajları inhibe ederken, nötrofilleri aktive etmektedir. AraLAM ise kemokin ve IL (özellikle IL8) yapımını uyarmaktadır. Kemokinlerde aynı zamanda T lenfosit, nötrofil, makrofaj ve monosit kemotaksisini başlatmaktadır. Etken aynı zamanda yapısında bulunan 19 kDa lipoproteini ile IL12'yi inhibe ederek TLR2 aracılığıyla immünolojik yanıtı düzenlemekte ve antijeni tanımaktadır. Bunun yanında TLR ailesinden TLR4 ise doğal bağışıklık sistemini aktive eden ve LAM maddesini tanınmasını sağlayan bir transmembran proteindir (Brubaker ve ark., 2015; Miossec ve ark., 2009 ve Vaure ve Liu, 2014). Etken tanındıktan sonra hücreler arası iletişimin sağlanması için IFN'ler salgılanır (Parkin ve Cohen, 2001). T lenfositlerden salgılanan IFN- $\gamma$  ile makrofajlar aktive edilmektedir (Flynn ve Chan, 2001). Bu sitokinin reseptör eksikliğinde enfeksiyona duyarlılığın arttığı bildirilmiştir (Gross, 2017). Doğal bağışıklık uyarılması sonrası T hücreleri maturasyonu ile kazanılmış bağışıklık cevapları oluşmaktadır (Tailleux ve ark., 2003). T hücrelerinin regülasyonu ise interleokinler tarafından gerçekleştirilmektedir. Savunmada etkili olan makrofajların mikobakteriyel etkenleri öldürebilmesi ya da gelişimlerini etkileyebilmesi için IL2, TNF- $\alpha$  gibi sitokinler gerekmektedir (Pollock ve ark., 2001). Ayrıca TNF- $\alpha$  granülom oluşumunda bölgeye mononükleer hücreleri çekerek önemli bir rol oynamaktadır (Lucaks ve ark., 1994). Kazanılmış bağışıklıkta etkili olan antikorlar ise B hücrelerinden salgılanmaktadır. Aktive edilmiş B ve T lenfosit proliferasyonunu

uyaran IL4, ayrıca B hücrelerinin plazma hücrelerine dönüşünü de uyarmaktadır (Sokol ve ark., 2008). Hem doğal hemde kazanılmış bağışıklı olan Th hücreleri ise Th17 hücreleridir. Bu hücrelerden salgılanan IL17 ile yangı bölgesine makrofaj ve nötrofil lökositlerin çekilmesini sağlar (Miossec ve ark., 2009).

TLR4 gen kodları, hücre yüzeyinde bulunan mikobakteriyel etkenlerin membranlarını tanımada rol alan moleküllerdir (Akira, 2001). TLR4'ün mikomembranını tanımlanması sonucu sitokinler (özellikle IFN- $\gamma$ ), kemokinler ve antimikrobiyal peptidlerin sekresyonunu arttıran yolaklar aktive edilir (Kawai ve Akira, 2010). Bu nedenlerle bTB'unda direncin TLR4 genleriyle ilişkisi aday gen yaklaşımı için önem arz etmektedir (Bhaladhare ve ark., 2016). Ayrıca TLR4, *M. tuberculosis*'e karşı savunmada otofajinin uyarılmasında etki göstermektedir, eksikliğinde ise nekroz uyarılmaktadır (Guttierez ve ark., 2004; Pahari ve ark., 2020 ve Sanchez ve ark., 2010;). Sığır tüberkülozu geniş çapta maddi zararlara sebep olsa da hastalığa karşı etkili aşı programları bulunmamaktadır. Tedavisi ise maliyetli olduğundan önerilmez. Hastalığın ortadan kaldırılması için, Dünya'nın çeşitli ülkelerinde uygulanan hastalık görülen sürülerdeki hayvanların eradikasyonu ise, diğer ülkelerdeki sosyo-ekonomik durum ve dini gelenekler nedeniyle uygulanması zor bir durumdur (Verma ve ark. 2014). Hastalığın eradikasyonundaki bu tür zorluklar hastalıkla savaşmak için aday gen yaklaşımını ortaya çıkarmıştır. Aday gen yaklaşımıyla, yeni dirençli hayvan popülasyonlarının oluşturması düşünülmektedir (Bermingham ve ark., 2014). Bu aday genlerden birisi TLR4'dür. Çalışmada TLR4 için yapılan istatistiki incelemelerde akciğerlerde gruplar arasında da belirgin bir fark görülmemiştir; ancak gruplar arasındaki çoklu karşılaştırmalarda ise PKA ve TOPKA gruplarında istatistiki olarak anlamlı artış gözlenmiştir. Mediastinal lenf düğümlerinde ise hem grup karşılaştırmalarında, hem de gruplar arasında çoklu karşılaştırmalarda anlamlı olarak artışa rastlanmıştır. POA grubunda istatistiki olarak fark görülmesi de grup ortalaması kontrol grubundan yüksektir. Bu da TLR4'ün bTB hastalığı esnasında dokularda arttığını göstermektedir. Bu artışın dokularda mikobakteriyel etkenlerinin tanımlanmasını kolaylaştırdığı hem de doğal bağışıklığın uyarıldığını düşündürmüştür. Belirtilen artışın II, III, ve IV. Evre granülomlarda nekrozun görülmesi nedeniyle nekrozu önlemede etkin bir rol oynamadığı görülmüştür.

Çalışmada mikobakteriyel etkenlere karşı ilk savunma hattı olan makrofajların IHC yöntemleriyle görülebilmesi için CD68 antijeni boyanması yapılmıştır. Ancak kaynaklarda belirtilen (Palmer ve ark., 2007 ve Wangoo ve ark., 2005) antikor klonunda, dilüsyonlarda ve inkübasyon sürelerinde immunopozitiflik gözlenmemiştir. Bununla birlikte kaynaklarda belirtilen antijen retrieval yöntemleri dışında (Citrate buffer, pH 6,0, 98 °C'de 25 dakika ve 60 °C'de gece boyu; EDTA buffer, pH 9,0, 98 °C'de 25 dakika) ve farklı inkübasyon süreleri (37 °C 1 saat) yöntemler denenmiş olsa da immunopozitiflik gözlenenemiştir. Bu gibi sebeplerle belirtilen antikor klonunun (M0718) sıgırlarda kullanılması önerilmemektedir.

Mikobakteriyel etkenlere karşı immun cevabın oluşabilmesi için T hücreleri ve makrofajlar arasında etkileşim olması gerekmektedir (Kaufmann, 2006). Prodüktif olgularda görülen tüberkül I ve IV. Evre arasında gelişirken ilk evrelerde lenfositlerin varlığı artmaktadır (Aranday-Cortes ve ark., 2012; Palmer ve ark., 2007; Salguero ve ark., 2017 ve Wangoo ve ark., 2005). Johnson ve ark. (2006), yaptığı çalışmada, tüberküller içinde T hücre belirteci olarak CD3 miktarının arttığı bildirilmiştir. Çalışmada yapılan immunopozitif CD3 oranı tüberkül görülen PKA, PKL, TOPKL gruplarında artmış olmasına rağmen, POA grubunda artış gözlenmemiştir. İstatistiksel olarak kontrolle karşılaştırıldığında gruplar arası çoklu karşılaştırmalarda akciğerlerde PKA grubunda, lenf düğümlerinde POL, TOPKL gruplarında anlamlı fark bulunmasına rağmen, tüberkül görülen PKL grubunda anlamlı farka rastlanamamıştır. Bunun yanında tüberkül görülmemesine rağmen POL grubunda kontrolle karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark görülmesi lenf düğümlerinde T hücre etkinliğinin daha belirgin olduğunu ortaya koymaktadır.

Yardımcı T hücreleri, CD4+ T hücreleri olarak bilinen sitokin salgılayarak diğer yangı hücrelerinin aktivitesine yardımcı olan, kazanılmış immünyetede önemli rolü olan hücrelerdir. Th hücreleri hücre ilişkili (Th1) ve antikor ilişkili (Th2) immun cevapta etkilidir. *M. bovis*'e karşı etkili immun cevabın oluşabilmesi Th1 hücrelerinden salgılanan sitokinlere (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) ihtiyaç duyulur. IFN- $\gamma$ , makrofajların aktivasyonu, granülom oluşumu ve sitokin salgılanması için Th1 hücre-ilişkili

immünite de rol oynayan bir sitokindir (Johnson ve ark., 2006 ve Thacker ve ark., 2007). Genel olarak Th1 hücrelerinden IL2, IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinler salgılanırken, Th2 hücrelerinden IL4, IL-5, IL-10 ve IL-13 gibi sitokinler salgılanır (Spellberg ve Edwards, 2001). Çalışmada Th1 hücrelerinin mikobakteriyel etkenlere karşı etkinliğine dair bulgular elde edilmişken, IL2 ile ilgili yeterli pozitifliklere rastlanamamıştır. Tüberküloz ile ilgili yapılan çalışmalarda IL2'nin latent enfeksiyonlarda bildirildiği görülmüştür (Biselli ve ark., 2010; Mamishi ve ark., 2015 ve Wang ve ark., 2012). Çalışmada saptanan tüm reaksiyonlar aktif enfeksiyon ve bunlarla ilgili lezyonlar olduğu için IL2 aktivitesinin görülmemesi kaynaklara uyumlu ve doğru bir sonuç olarak yorumlanmıştır.

Çalışmada Th2 hücrelerinin etkinliğini göstermek için IL4 sitokininin yararlanılması düşünülmüştür. Ancak IL4 ile morfometrik inceleme yapılması için yeterli immunopozitiflik görülmemiştir. Boddu-Jasmine ve ark. (2008) yaptığı enfeksiyöz dozla ilgili yaptığı çalışmada, intrabronşiyal inokulasyondan 26 hafta sonra lenf düğümlerinde yüksek dozla enfekte edilen hayvanlarda IL4'ün arttığını bildirmiştir. Yapılan ZN boyamalarında pozitifliklere rastlanmamasının düşük mikobakteri miktarı nedeniyle olabileceği göz önüne alınırsa, çalışmaya dahil edilen hayvanlarda mikobakteriyel etkenlerin az olabileceği, bu nedenle IL4 uyarımının gerçekleşmediği düşünülebilir. Ancak yapılan konfokal mikroskopi incelemelerinde sitoplazmasında etken bulunan makrofajlarda aynı anda IL4 etkinliği de saptanmıştır. Bu durum da IL4 etkinliğinin mikobakteriyel yük ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

CD119, IFNGR-1 geni tarafından üretilen bir proteindir (Novick ve ark., 1987). Sharma ve ark. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, hücre kültürlerinde *M. tuberculosis* ile enfekte edilmiş hücrelerde CD119 varlığı gözlenmiştir. Ayrıca IFNGR eksikliği bulunan farelerin tüberküloz hastalığını oluşturan etkenlere karşı duyarlı oldukları bildirilmiştir (Flynn ve ark., 1993). Yapılan çalışmada akciğer ve medistinal lenf düğümlerinde gruplar arasında CD119 için istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmiştir. Kontrolle karşılaştırıldığında akciğerlerde TOPKA grubunda, lenf düğümlerinde ise PKL, TOPKL grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark

gözlenmiştir. Primer odakta ve PK'te artış görülmemesi; TOPK'lerde oluşan lezyonların primer akciğer lezyonları iyileştikten sonra ilerlediği dikkate alınır, CD119'un hastalığın geç döneminde artış gösterdiğini düşündürmüştür. Ayrıca Salguero ve ark. (2017) yaptığı çalışmada tüberküllerde evre arttıkça IFN- $\gamma$ 'nın artış gösterdiğini bildirmiştir. Çalışmada PK ve TOPK'lerde görülen tüberküllerin evrelerinin daha çok III ve IV. Evrede olması dolaylı olarak CD119 artışı olduğunu düşündürebilir.

Makrofajlar ve T hücreleri tarafından üretilen, tüberkül oluşumunda rol oynayan TNF- $\alpha$ 'nın (Guirado ve ark, 2013 ve Ramakrishnan, 2012), fazla üretilmesi doku hasarına neden olabilmektedir. Araştırmacılar (Aranday-Cortes ve ark., 2013; Canal ve ark., 2017; Özmen, 2009; Palmer ve ark., 2015; Palmer ve ark., 2021 ve Salguero ve ark., 2017) TNF- $\alpha$ 'nın tüm tüberkül yapılarında görüldüğü bildirmişlerdir. Ancak çalışmada TNF- $\alpha$  için yapılan morfometrik incelemelerde elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında akciğerdeki gruplar arasında anlamlı fark görülürken, mediastinal lenf düğümlerinde istatistiki olarak anlamlı farka rastlanamamıştır. Akciğerdeki lezyonların aksine, lenf düğümlerinde görülen lezyonlar birbirleriyle çok benzeştiği için arada bir farkın olmamasının bir önemi olduğu düşünülmemiştir.

Th1 ve Th2 hücrelerinin yanısıra Th17 hücreleri bulunmaktadır. Bu hücrelerden IL17 salgılanmaktadır. Bu sitokin yangı bölgesine makrofaj ve nötrofil lökositlerin çekilmesini sağlar (Miossec ve ark., 2009). Sığır tüberkülozunda IL17 sitokininin hastalığa karşı koruyucu ve zararlı yangısal reaksiyonların başlatılmasında etkili olduğu bildirilmiştir. Bu gibi nedenlerle hastalık biyomarkeri olarak önerilmiştir (Waters ve ark., 2016). Ayrıca Thacker ve ark. (2009) yaptığı çalışmada BCG aşılama sonrasında periferik kan mononükleer hücrelerinde IL17 varlığında artış görülmesi nedeniyle aşı etkinliğinin biyomarkeri olarak da önerilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda tüberküllerde IL17 varlığının arttığı, I ve II. Evre granülomlarda bu artışın daha belirgin olduğu bildirilmiştir (Aranday-Cortes ve ark., 2012; Palmer ve ark., 2015; Palmer ve ark., 2016 ve Shu ve ark., 2014). Yapılan çalışmada IL17 için yapılan morfometrik incelemelerde elde edilen veriler akciğer ve lenf düğümlerinde

birbirine benzerdi. Bu durumun çalışmada görülen tüberküllerin yaygın olarak geniş nekroz ve belirgin kapsülün olduğu III ve IV. evrede olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmada gruplar arasında yapılan çoklu karşılaştırmalarda akciğerde TOPKA ve KA grupları arasında anlamlı fark elde edilmesine rağmen, TOPKA grubundaki akciğerlerde tüberkül bulunmaması, ancak IL17'nin yangı bölgesine nötrofil lökositlerin çekilmesini sağlaması nedeniyle, tüberkülden bağımsız görülen nötrofil lökosit infiltrasyonlarının (n:7) dolaylı olarak belirgin bir fark oluşturabileceği düşünülmüştür.

Tüberkül gelişiminde ya da bTB patogeneğinde antikorların rolü tam olarak bilinmemektedir (Palmer ve ark., 2022). Ancak yapılan çalışmalarda tüberküllerde I ve II. Evre granülomlarda makrofajlarla karışık şekilde, III ve IV. Evre granülomlarda ise fibröz kapsüle yakın şekilde B hücreleri varlığı görülmüştür (Cassidy ve ark., 2001; Johnson ve ark., 2006 ve Wangoo ve ark., 2005;). İmmunoglobulin hafif zincirleri antikorların yapısında bulunan polipeptitlerdir. Bu nedenle antikor üreten B hücrelerinde immunoglobulin hafif zincirleri bulunmaktadır. Bu zincirler Lambda ve Kappa hafif zincirleridir. Çalışmamızda Lambda chain gruplar arasında karşılaştırılmış, akciğer ve mediastinal lenf düğümlerinde anlamlı fark gözlenmediği, ancak gruplar arasındaki çoklu karşılaştırmalarda tüberkül görülen POA grubunda, TOPKA ve KA grupları arasında istatistiki fark olması akciğerlerdeki antikorların bTB patogeneğinde hatta TOPK'te sadece lenf düğümleri lezyonunun görüldüğünü açıkladığına yorumlanmıştır. Aynı şekilde mediastinal lenf düğümlerinde de kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüberkül gözüken PKL ve TOPKL gruplarında, tüberkül gözükmemesine rağmen POL grubunda artış olması bTB hastalığında antikorların etkili olabileceği konusunu ortaya çıkarmaktadır.

Son yıllarda konfokal mikroskopi, floresans görüntüleme etkili bir araç haline gelmiştir. Belirgin dalga boylarında tarama yapılabilmesi, sadece ışık filtreleriyle görüntülenen floresans maddeler yerine, spesifik materyallerin kullanılabilmesine imkân sağlamıştır. Modern konfokal mikroskoplar, birden çok floresan aralığında yüksek kaliteli görüntü almaya fırsat tanımaktadır. Ancak kullanılan kuvvetli lazerler

nedeniyle hücre kültürlerinde ve preparatlarda oluşabilecek hasarlara karşı dikkatli olunması gerekmektedir (St Croix ve ark., 2005). Yapılan konfokal mikroskopik incelemelerde olguların birinde aynı makrofajlarda etken ve IL4 pozitifliği; farklı hücrelerde *M. bovis* ve IL17 immunopozitifliği; yine farklı hücrelerde CD3 ve IL-4 pozitifliği gözlemlendi. Ancak yapılan incelemeler yöntemin pahalı olması (sekunder floresans işaretlenmiş antikor temini, konfokal mikroskopi kullanımı için hizmet alımı) nedeniyle 10 örnekle sınırlandırılmıştır. Yapılan konfokal mikroskopi incelemelerinin pandemi dönemine denk gelmesi, kullanılan ekipmanın sürekli soğutulması gerekliliği nedeniyle ortamda klima ile hava sirkülasyonu sağlanması, bu nedenle oluşabilecek bulaşın engellenmesi amacıyla odaya mikroskop operatöründen başkasının girememesi, mikroskobun direkt olarak çalışmacıların kullanamaması sonucu ortaya çıkan incelemelerin doğru alanlarda yapılmadığı düşünülmektedir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada sığır tüberkülozunda akciğer ve mediastinal lenf düğümlerinde görülen granülomların (tüberküllerin) yapısı patomorfolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle detaylı olarak incelenmiştir.

Çalışmada makroskobik incelemeler sonrası akciğer ve lenf düğümlerinde tipik tüberküllerin görülmesi ile hastalık hakkında direkt yorum yapılabilmektedir. Bazı olgularda prodüktif lezyonların görülmediği dikkatimizi çekmiştir. Makroskobik incelemede lezyon görülmeyen bu akciğer ve lenf düğümlerinin mikroskobik incelemede I. ve II. Evre granülomlara sahip olduğu saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlara göre klinik olarak şüphe duyulan durumlarda makroskobik lezyon görülmesine dahi mikroskobik inceleme için örnekleme yapılması önerilmektedir.

Çalışmada histopatolojik, immunoperoksidaz ve immunfloresans boyamalarında (konfokal mikroskopi) hastalığın teşhisi ve patogeneziyle ilgili sonuçlar ortaya konulmuştur. Histopatolojik boyamalarda HE boyamasında hastalığa ait granülomların evresine göre enfeksiyon periyodu hakkında kolaylıkla fikir alınabileceği görülmüştür. Ayrıca görülen granülomların evrelendirilmesinin histopatolojik teşhis için katkı sağlamadığı, yalnızca tipik tüberkül yapıları dışında erken evrelerdeki granülomların teşhisi için yararlı olabileceği görülmüştür. İmmunoperoksidaz yöntemiyle ise hastalığın aerojen bulaşma sonrası akciğer ve lenf düğümlerinde bulgular detaylı incelenerek evrelere göre immunohistokimyasal olarak doğuştan ve kazanılmış immunité ile ilgili bazı belirteçlerin lezyon ve evrelerine göre araştırılması yapılmıştır. Konfokal mikroskopi incelemeleri oldukça maliyetli incelemelerdir. Bu nedenle hastalık için rutin tanısal ve sitokinlerin kullanılması yerine; patogeneizde etkili yolakların ve/veya hastalığın tedavisinde bu yolaklar üzerinde kullanılan ilaç vb. materyallerin etkisinin araştırılmasının daha anlamlı olacağı düşünülmüştür. Ayrıca konfokal mikroskobun rutin incelemelerde pratik

olmadığı kanaatine varılmıştır.

Formalin tespitli parafin dokularda yapılan ZN boyamalarda etkenin parçalanması, zarar görmesi durumunda sensitivite ve spesifitede azalmalar dikkati çekmiştir. Bu boyamalarda antijenin tüberkül yapılarında ve/veya periferinde bulunan doku bölümlerinde; tüberkül görülmeyen olgularda dahi, etken pozitifliği saptanmıştır. Bu nedenle kesin tanı için yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip immunohistokimyasal antijen boyaması yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Antijenlerin tanınmasında önemli role sahip olan TLR ailesinden TLR4 çalışmada tüm olgularda lezyon tiplerine göre aynı oranda artış göstermiştir. Lenf düğümlerinde ise anlamlı fark gözlenmiştir. Bu bağlamda tüberkül görülen ve/veya görülmeyen akciğer ve/veya lenf düğümlerinde, mikobakteriyel etken görülmesi durumunda organizma tarafından etkenin tanınması ve yangıyı başlatıcı etkileri konusunda sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenlerle mikobakteriyel etkenlerde TLR4'ün etkinliğinin saptanması, enfeksiyonun organizmada tanındığını belirlemek için kullanılabilir.

Tüm olgularda CD119 immunopozitifliğinde artış, makrofaj aktivasyonu ve fagositoz şiddetini göstermiştir. Bu da önemli hücre aracılı immunitiyi akla getirmektedir.

İmmunohistokimyasal incelemelerde CD3 immunopozitifliği primer odak dışındaki tüm lezyonlarda, *M. bovis* antijenine paralel olarak artmıştır. Bu da lenfositlerin antijen yoğunluğuna bağlı olarak aktif olduğunu kanıtlamaktadır.

Çalışmada B lenfositlerin hafif zincirlerinden biri olan Lambda zinciri tercih edilmiş ve tüm olgularda özellikle de primer odakta bunun belirgin olarak artışı görülmüştür. Bu durum enfeksiyonun başlangıç aşamasında humoral immnitenin aktif

rol oynadığını düşündürmüştür. Ancak yine de hem T hem de B lenfositlerinin belirteçlerine ilgili çok çeşitli boyamaların yapılması gerekmektedir.

Akciğerde yapılan TNF- $\alpha$  immunohistokimyasal boyamalarda, lezyonlu gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda TNF- $\alpha$  immüpozitifliklerinde istatistiksel bir fark dikkati çekmemesine rağmen grafiksel (Şekil 3.8) olarak eğrinin yükseldiği dikkati çekmiştir. Bu durum akciğer ve lenf düğümlerindeki lezyonlarda çeşitliliğin olmamasına yorumlanmıştır.

Çalışmada IL17 immüpozitifliklerinde gruplar arasında fark gözlenmemiştir. Bu durumun çalışmada görülen tüberküllerin yaygın olarak geniş nekroz ve belirgin kapsülün olduğu III ve IV. Evrede olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmada IL-2 ile yeterli immüpozitifliğe rastlanılmamıştır. Bu durum tüm reaksiyonların aktif enfeksiyon ve bunlarla ilgili lezyonlar olduğundan, kaynaklarla uyumlu olarak doğru bir sonuç olarak değerlendirilmiştir. Aynı şekilde IL4 için de yeterli immüpozitiflik görülmemiştir. Bu durum ise yapılan ZN boyamalarında düşük oranda pozitifliklere rastlanması etkenlerin azlığı ve çalışmaya dahil edilen hayvanlarda mikobakteriyel etkenlerin az olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmada makrofaj belirteci olarak CD68 antikoruna boyaması yapılmıştır. Bu antikor kaynaklarda belirtilen klon temel alınarak temin edilmiştir. Farklı dilüsyonlarda ve inkübasyon sürelerinde pozitif ve negatif kontrol eşliğinde boyamalar gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrollerde immüpozitiflik belirgin olarak saptanmışken, lezyonlu dokularda immüpozitiflik görülmemiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre çalışmada ve kaynaklarda kullanılan bu klonun, sığır tüberkülozunda uygun olmadığı saptanmıştır. Bu antikorun kullanılma durumu olması halinde ise, CD68'in diğer klonlarıyla beraber denenmesi gerektiği önerilmektedir.

Sonuç olarak; çalışmada akciğer ve lenf düğümlerinde sığır tüberkülozu hastalığında oluşan tüberküllerin makroskopik incelemeleri yapılmış, mikroskopik olarak; nekrozun ve fibröz kapsülün varlığı gibi morfolojik kriterlerle evrelendirilmesi gerçekleştirilmiş, immunohistokimyasal boyamalarla *M. bovis*, CD3, CD68, CD119, TNF- $\alpha$ , IL2, IL4 IL17, Lambda Chain, TLR4 antikoru boyanarak hastalığın ilerleyişi hakkında bilgiler elde edilmiştir. Bu bağlamda sığır tüberkülozunda hastalığın teşhisi için makroskopik ve/veya mikroskopik bulguların yeterli olabileceği, etken teşhisi için histopatolojik yöntemlerin yeterli olmayıp, immunohistokimyasal yöntemlere başvurulması gerektiği, hastalığa karşı oluşan reaksiyonun makrofaj ve lenfositlerle oluşan hücrel immunityle ilgili olduğu, yapılan sitokin ve/veya kemokin boyamalarında da kazanılmış bağışıklıkta erken enfeksiyon dönemlerinde humoral bağışıklığın etkili olabileceği sonucunu ortaya koymaktadır. Gelecekte yapılacak çalışmaların hücrel ve/veya humoral aktivitenin belirlenmesinde genel belirteçlerin dışında alt tip belirteçlerin boyanması yönünde olması önerilmektedir. Yapılacak konfokal mikroskopi çalışmalarının ise maliyetli olmasından daha detaylı yolak/patogenez çalışmasında yapılması hastalık hakkında bilgilerin elde edebileceğini düşündürmektedir. Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde sığır tüberkülozunda doğal bağışıklığın etkili olmadığı, kazanılmış bağışıklıkta ise hem hücrel hem de humoral aktivitenin etkili olduğu kanısına varılmıştır.

## ÖZET

### Doğal Sığır Tüberkülozu'nda Akciğer ve İlgili Lenf Dğümlerindeki Granülomların Patomorfolojik ve İmmunohistokimyasal Yapısı

Çalışmada doğal sığır tüberkülozunda oluşan granülomların yapısının, patomorfolojik ve immunohistokimyasal olarak detaylı araştırılması amaçlanmıştır. Özellikle elde edilen immunohistokimyasal yöntemlerin sonuçlarına göre immunité tipi hakkında bilgi edinmek, etkin hücre tiplerini saptamak ve ileri dönük tedavi yöntemlerine yönelik araştırmalara katkı sağlanması hedeflenmiştir.

Çalışmanın materyali özellikle Ankara ve çevre illerin mezbahalarında, sığır tüberkülozu hastalığı nedeniyle kesime gelen ve lezyon görülen 100 adet sığırın akciğer ve mediastinal lenf dğümüleri oluşturdu. Farklı dönemlerde kesilen sağlıklı 5 adet besi sığırının akciğer ve mediastinal lenf dğümüleri ise kontrol grubu olarak alındı. Makroskobik incelemeler sonucu 93 adet prodüktif, 7 adet eksudatif tüberküloz tespit edildi. Mikroskobik incelemeler sonucu da prodüktif lezyonlar primer odak (n:16), primer kompleks (n:30) ve tam olmayan primer kompleks (n:47) olarak sınıflandırıldı. Ayrıca görülen granülomlar epitelioid hücre, dev hücre, nekroz ve kapsül kriterleri göz önüne alınarak mikroskobik olarak (I-IV. evre) evrelendirildi. Tüm lezyonlu örnekler histokimyasal olarak Hematoksilen-Eozin, Ziehl-Neelsen; immunohistokimyasal olarak da *Mycobacterium bovis*, CD3, CD68, CD119, TNF- $\alpha$ , IL2, IL4, IL17, Lambda Chain, TLR4 antikorları kullanıldı. Konfokal mikroskobik incelemeler için 10 adet primer kompleks bulunan dokular, *Mycobacterium bovis*-IL4, *Mycobacterium bovis*-IL17, TNF- $\alpha$ -IL4, CD3-IL4 antikorları eşleştirilerek boyandı. Yapılan incelemelerde makroskobik olarak saptanamayan I. ve II. evre granülomların tamamı mikroskobik olarak saptandı. Etken varlığı için yapılan Ziehl-Neelsen ve immunohistokimyasal boyamalarda; Ziehl-Neelsen boyama olgularında pozitiflik %11 iken, immunohistokimyasal boyamalarda %100 bulunmuştur. İmmunohistokimyasal olarak aynı zamanda TLR4 pozitifliğinin yüksek olmasının antijenin tanınmasında etkin rol oynadığı düşünüldü. CD119 ve CD3'ün pozitifliği hayvanlardaki hücre aracılı immunité etkinliğini gösterirken; özellikle primer odaklarda saptanan Lambda Chain pozitifliği ise humoral immunitéde artışı doğrulamıştır. Yapılan konfokal mikroskopi incelemelerinde de IL4 ve etken antijeni aynı hücrede tespit edilmiş, etken ve IL17 antijenleri farklı hücrelerde görülmüştür.

Sonuç olarak sığır tüberkülozunda hastalığın kesin teşhisi için makroskobik, mikroskobik bulguların yeterli olabileceği (I ve II. evre granülomlar hariç), etken teşhisi için Ziehl-Neelsen boyamasının yeterli olmayıp, immunohistokimyasal yöntemlere başvurulması gerektiği, hastalığa karşı oluşan reaksiyonun makrofaj ve lenfositlerle oluşan hücresel immunitéyle ilgili olduğu, yapılan sitokin ve/veya kemokin boyamalarında da kazanılmış bağışıklıkta erken enfeksiyon dönemlerinde humoral bağışıklığın etkili olabileceği kabul edilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** İmmunité, İmmunohistokimya, Patomorfoloji, Sığır, Tüberküloz.

## SUMMARY

### **Pathomorphological and Immunohistochemical Structure of Granulomas in Lung and Related Lymph Nodes in Natural Bovine Tuberculosis**

In this study, it was aimed to investigate the structure of granulomas in natural bovine tuberculosis in detail with pathomorphological and immunohistochemical methods. In particular, the aim was to obtain information about the type of immunity according to results of immunohistochemical method, determine active cell types and contribute to researches on advanced treatment methods.

The materials of this study included lungs and mediastinal lymph nodes with lesions of 100 animals, especially in the slaughterhouses of Ankara and its provinces, presented to slaughtering because of bovine tuberculosis disease. Lungs and mediastinal lymph nodes of 5 healthy beef cattle slaughtered at different times were taken as the control group. As a result of macroscopical examinations, 93 productive and 7 exudative tuberculosis were detected. Also in microscopical examination, productive lesions were classified as primary focus (n:16), primary complex (n:30), and incomplete primary complex (n:47). In addition, granulomas were staged microscopically (stages I-IV) considering presence of epithelioid cells, giant cells, necrosis and capsule. To all samples that have lesions, histochemically Hematoxylin-Eosin, Ziehl Neelsen stains were performed; immunohistochemically, *Mycobacterium bovis*, CD3, CD68, CD119, TNF- $\alpha$ , IL2, IL4, IL17, Lambda chain and TLR4 antibodies were used. For confocal microscopical examinations, 10 tissues with primary complex were stained with matching *Mycobacterium bovis*-IL4, *Mycobacterium bovis*-IL17, TNF- $\alpha$ -IL4, CD3-IL4 antibodies. In examinations, all stages of granulomas were detected microscopically including I. and II. stage granulomas which could not be detected macroscopically. In stainings for causative agent; positivity was 11% in Ziehl-Neelsen staining, but 100% in immunohistochemical staining of all cases. TLR4 positivity was also found to be high and it was thought to play an active role in the recognition of the antigen. While the positivity of CD119 and CD3 shows the efficiency of cell-mediated immunity in animals; Lambda Chain positivity, especially in primary foci, confirmed the increase in humoral immunity. In confocal microscopy examinations, IL4 and causative agent were detected in the same cells, where the agent and IL17 antigens were observed in different cells.

It was concluded that, macroscopical and microscopical findings may be sufficient for the definitive diagnosis of the disease in bovine tuberculosis (except for stage I and II granulomas), where Ziehl-Neelsen staining is not sufficient for diagnosis of causative agent and immunohistochemical methods should be performed, in addition to the results showing that the reaction against the disease is related to cellular immunity formed by macrophages and lymphocytes, and according to cytokine and/or chemokine stainings, humoral immunity may be effective in acquired immunity during the early infection periods.

**Keywords:** Bovine, Immunity, Immunohistochemistry, Pathomorphology, Tuberculosis.

## KAYNAKLAR

- AGUET M, DEMBIĆ Z, MERLIN G (1988). Molecular cloning and expression of the human interferon- $\gamma$  receptor. *Cell*, **55(2)**: 273-280.
- AIT-KHALED N, ENARSON DA, STOP TB INITIATIVE (2003). In: Tuberculosis: a manual for medical students. World Health Organization.
- AKIRA S (2001). Bacterial infections and toll-like receptors. *Kekkaku.*, **76(8)**: 593-600.
- AKSU M, TOPRAK S (2012). The importance of associations in the struggle against tuberculosis in Turkey. *Tuberk Toraks.*, **60(3)**: 291-294.
- ALLEN AR, MINOZZI G, GLASS EJ, SKUCE RA, MCDOWELL SWJ, WOOLLIAMS JA, BISHOP SC (2010). Bovine tuberculosis: the genetic basis of host susceptibility. *Proc Biol Sci.*, **277(1695)**: 2737-2745.
- AMENI G, TAFESS K, ZEWDE A, EGUALE T, TILAHUN M, HAILU T, SIRAK A, SALGUERO FJ, BERG S, ASEFFA A, HEWINSON RG, VORDERMEIER, HM (2018). Vaccination of calves with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette–Guerin reduces the frequency and severity of lesions of bovine tuberculosis under a natural transmission setting in Ethiopia. *Transbound Emerg Dis.*, **65(1)**: 96-104.
- ANNAM V, KARIGOUDAR MH, YELIKAR BR (2009). Improved microscopical detection of acid fast bacilli by modified bleach method in lymph node aspirates. *Indian J Pathol Microbiol.*, **52**: 349-352.
- ANONİM, THE NOBEL PRIZE (1905). The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1905. Erişim Adresi: [<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1905/summary/>]. Erişim Tarihi: 16/03/2022.
- ANONİM (1978). Tarım ve Orman Bakanlığı, Sığır Tüberkülozu Yönetmeliği, Erişim Adresi: [[https://www.tarimorman.gov.tr/Belgeler/Mevzuat/Yonetmelikler/sigir\\_tuberkulozu\\_yonetmeligi.pdf](https://www.tarimorman.gov.tr/Belgeler/Mevzuat/Yonetmelikler/sigir_tuberkulozu_yonetmeligi.pdf)]. Erişim tarihi: 16/06/2022.
- ANONİM (2020). IFNGR1 interferon gamma receptor 1 [ *Bos taurus* (cattle) ], Erişim Adresi: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/508619>]. Erişim Tarihi: 16/03/2022.
- ARANAZ A, COUSINS D, MATEOUS A, DOMINGUEZ L (2003). Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, **53**: 1785–1789.
- ARANDAY-CORTES E, HOGARTH PJ, KAVEH DA, WHELAN AO, VILLAREAL-RAMOS B, LALVANI A, VORDERMEIER HM (2012). Transcriptional profiling of disease-induced host responses in bovine tuberculosis and the identification of potential diagnostic biomarkers. *PLoS One.*, **7(2)**: e30626.
- ARANDAY-CORTES E, BULL NC, VILLAREAL-RAMOS B, GOUGH J, HICKS D, ORTIZ-PELÁEZ AO, VORDERMEIER HM, SALGUERO FJ (2013). Upregulation of

- IL-17A, CXCL9 and CXCL10 in early-stage granulomas induced by *Mycobacterium bovis* in cattle. *Transbound Emerg Dis.*, **60(6)**: 525-537.
- AYELE WY, NEILL SD, ZINSSTAG J, WEISS MG, PAVLIK I (2014). Bovine tuberculosis: and old disease but a new threat to Africa. *Int J Tuberc Lung Dis.*, **8(8)**: 924-937.
- BAILEY SS, CRAWSHAW TR, SMITH NH, PALGRAVE CJ (2013). *Mycobacterium bovis* infection in domestic pigs in Great Britain. *Vet J.*, **198(2)**: 391-397.
- BALLOWS A, HAUSLER WJ, HERMANN KL, SHADOMY HJ (1991). In: Manual of clinical Microbiology. 5th ed. Washington.
- BATES JH (1980). Transmission and pathogenesis of tuberculosis. *Clin Chest Med.*, **1**: 167-174.
- BEHR MA, SMALL PM (1999). A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine.*, **17**: 915-922.
- BERMIGHAM ML, BISHOP SC, WOOLLIAMS JA, PONG-WONG R, ALLEN AR, MCBRIDE SH, RYDER JJ, WRIGHT DM, SKUCE RA, MCDOWELL SWJ, GLASS EJ (2014). Genome-wide association study identifies novel loci associated with resistance to bovine tuberculosis. *Heredity (Edinb).*, **112(5)**: 543-551.
- BISELLI R, MARIOTTI S, SARGENTINI V, SAUZULLO I, LASTILLA M, MENGONI F, VANINI V, GIRARDI E, GOLETTI D, D'AMELIO R, NISINI R (2010). Detection of interleukin-2 in addition to interferon- $\gamma$  discriminates active tuberculosis patients, latently infected individuals, and controls. *Clin Microbiol Infect.* **16(8)**: 1282-1284.
- BHALADHARE A, SHARMA D, KUMAR A, SONWANE A, CHAUHAN A, SINGH R, KUMAR P, YADAV R, BAQIR M, BHUSHAN B, PRAKASH O (2016). Single nucleotide polymorphisms in toll-like receptor genes and case-control association studies with bovine tuberculosis. *Vet World.*, **9(5)**: 458-464.
- BODDU-JASMINE HC, WITCHELL J, VORDERMEIER M, WANGOO A, GOYAL M (2008). Cytokine mRNA expression in cattle infected with different dosages of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinb).* **88(6)**: 610-615.
- BOLAND F, KELLY GE, GOOD M, MORE SJ (2010). Bovine tuberculosis and milk production in infected dairy herds in Ireland. *Prev. Vet. Med.*, **93(2-3)**: 153-161.
- BONAH C (2005). The 'experimental stable' of the BCG vaccine: safety, efficacy, proof, and standards, 1921-1933. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci.*, **36(4)**: 696-721.
- BOURNE D (2018). Bovine Tuberculosis (Bacterial Disease). Erişim Adresi: [<http://wildpro.twycrosszoo.org/S/00dis/Bacterial/BovineTB/BovineTB.htm>]. Erişim Tarihi: 18/08/2018.
- BROCKER C, THOMPSON D, MATSUMOTO A, NEBERT DW, VASILIOU V (2010). Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Hum Genomics.*, **5(1)**: 30-55.

- BROOKS-POLLOCK E, CONLAN AJK, MITCHELL ANDY P, BLACKWELL R, MCKINLEY TJ, WOOD JLN (2013). Age-dependent patterns of bovine tuberculosis in cattle. *Vet Res.*, **44(1)**: 97.
- BROSCH R, GORDON SV, MARMIESSE M, BRODIN P, BUCHRIESER C, EIGLMEIER K, GARNIER T, GUTIERREZ C, HEWINSON G, KREMER K, PARSONS LM, PYM AS, SAMPER S, VAN SOOLINGEN D, COLE ST (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **99(6)**:3684-3689.
- BROUGHAN JM, DOWNS SH, CRAWSHAW TR, UPTON PA, BREWER J, CLIFTON-HADLEY RS (2013). *Mycobacterium bovis* infections in domesticated non-bovine mammalian species. Part 1: Review of epidemiology and laboratory submissions in Great Britain 2004-2010. *Vet J.*, **198(2)**: 339-345.
- BRUBAKER SW, BONHAM KS, ZANONI I, KAGAN JC. (2015). Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol.*, **33**: 257-290.
- BUDDLE BM, RYAN TJ, POLLOCK JM, ANDERSEN P, DE LISLE GW (2001). Use of ESAT-6 in the interferon-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Vet Microbiol.*, **80(1)**: 37-46.
- BUSH M, MONTALI RJ, PHILLIPS JR L, HOLOBAUGH PA (1990). Bovine tuberculosis in a Bactrian camel herd: clinical, therapeutic, and pathological findings. *J Zoo Wildl Med.*, 171-179.
- CANAL AM, PEZZONE N, CATALDI A, ZUMARRAGA M, LARZABAL M, GARBACCIO S, FERNANDEZ A, DOMINGUEZ L, ARANAZ A, RODRIGUEZ-BERTOS A (2017). Immunohistochemical detection of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in granulomas in cattle with natural *Mycobacterium bovis* infection. *Res Vet Sci.*, **110**: 34-39.
- CASSIDY JP (2006). The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Vet Microbiol.*, **112**: 151–161.
- CASSIDY JP, BRYSON DF, GUTIERREZ CANCELA MM, FORSTER F, POLLOCK JM, NEILL SD (2001). Lymphocyte subtypes in experimentally induced early-stage bovine tuberculous lesions. *J Comp Pathol.*, **124(1)**: 46-51.
- CASSIDY JP, BRYSON DG, NEILL SD (1999). Tonsillar lesions in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Rec.*, **144(6)**: 139-142.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2016). World TB Day. Erişim Adresi : [<https://www.cdc.gov/tb/worldtbdays/history.htm>]. Erişim Tarihi: 16/03/2022.
- CHAPARAS SD, MALONEY CJ, HEDRICK SR (1970). Specificity of tuberculins and antigens from various species of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.*, **101(1)**: 74-83.
- CHU WM (2013). Tumor necrosis factor. *Cancer Lett.*, **328(2)**: 222-225.

- COAD M, HEWINSON RG, CLIFFORD D, VORDERMEIER HM, WHELAN AO (2007). Influence of skin testing and blood storage on interferon-gamma production in cattle affected naturally with *Mycobacterium bovis*. *Vet Rec.*, **160(19)**: 660-662.
- COMAS I, GAGNEUX S (2009). The past and future of tuberculosis research. *PLoS Pathog.*, **5(10)**: e1000600.
- COMSTOCK GW (1994). The International Tuberculosis Campaign: a pioneering venture in mass vaccination and research. *Clin Infect Dis.*, **19(3)**: 528-540.
- COOPER AM (2009). Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.*, **27**: 393-422.
- CORNER LA (2006). The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Vet Microbiol.*, **112(2-4)**: 303-312.
- CORNER LA, MELVILLE L, MCCUBBIN K, SMALL KJ, MCCORMICK BS, WOOD PR, ROTHEL JS. (1990). Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. *Aust Vet J.*, **67(11)**: 389-392.
- COUSINS DV (2001). *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev Sci Tech.*, **20(1)**: 71-85.
- COUSINS DV, SKUCE RA, KAZWALA RR, VAN EMBDEN JD (1998). Towards a standardized approach to DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, Tuberculosis in Animals Subsection. *Int J Tuberc Lung Dis.*, **2(6)**: 471-478.
- DACSO CC (1990). Skin testing for Tuberculosis. In: Clinical Methods: The History, Physical and Laboratory Examinations, 3rd Edn, Ed.: Walker, H.K., Hall, W.D., Hurst, J.W., Boston: Butterworths.
- DE ANDREA M, RAVERA R, GIOIA D, GARIGLIO M, LANDOLFO S (2002). The interferon system: an overview. *Eur J Paediatr Neurol.*, **6 Suppl A**: A41-46; discussion A55-58.
- DEAN G, WHELAN A, CLIFFORD D, SALGUERO FJ, XING Z, GILBERT S, MCSHANE H, HEWINSON RG, VORDERMEIER M, VILLARREAL-RAMOS B (2014). Comparison of the immunogenicity and protection against bovine tuberculosis following immunization by BCG-priming and boosting with adenovirus or protein based vaccines. *Vaccine.*, **32(11)**: 1304-1310.
- DOMINGO M, VIDAL E, MARCO A (2014). Pathology of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci.*, **97**: 20-29.
- DOWNS SH, BROUGHAN JM, GOODCHILD AV, UPTON PA, DURR PA (2016). Responses to diagnostic tests for bovine tuberculosis in dairy and non-dairy cattle naturally exposed to *Mycobacterium bovis* in Great Britain. *Vet J.*, **216**: 8-17.
- DUIGNAN A, KENNY K, BAKKER D, GOOD M (2019). Tuberculin PPD Potency Assays in Naturally Infected Tuberculous Cattle as a Quality Control Measure in the Irish Bovine Tuberculosis Eradication Programme. *Front Vet Sci.*, **6**: 328.

- DUNGWORTH DL (1985). In: Pathology of Domestic Animals, 3rd Edn, Ed.: Jubb, K. V. F., Kennedy, P. C., Palmer, N., Orlando, Florida: Academic Press.
- EHLERS S, SCHAIBLE UE (2013). The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. *Front Immunol.*, **3**: 411.
- ELLIS JA (2009). Update on viral pathogenesis in BRD. *Anim Health Res Rev.*, **10(2)**: 149-153.
- ERER H, ÖZDEMİR Ö (2021). Dişi Genital Sistem. In: Veteriner Sistemik Patoloji II. Cilt, 5. Baskı, Eds: Hüdaverdi Erer, M. Kemal Çiftçi, Nobel Akademik Yayıncılık, İstanbul.
- ERZİN N (1950). Türkiye’de BCG aşısı. *Türk Hij ve Deney Biyol Derg.*, **10**: 339-44.
- FLYNN JL, CHAN J, TRIEBOLD KJ, DALTON DK, STEWART TA, BLOOM BR (1993). An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med.*, **178(6)**:2249-2254.
- FLYNN JL, CHAN J (2001). Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.*, **19(1)**: 93-129.
- FRANCIS J (1958). In: Tuberculosis in animals and man. A study in comparative pathology. Cassell & Co., London.
- FRANCIS J (1971). Pathogenesis and pathology. In: Tuberculosis in animals and man. Cassell & Co., London.
- FRİK F (1981). Türkiye’de bulaşıcı hastalıklar. *Dirim.*, **9-10**: 306-309.
- GAO W, CAI Y, ZHANG G, WANG X, WANG J, LI Y, WANG Y (2022). Lipidomics revealed the global lipid responses of primary bovine alveolar macrophages to infections of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *Int Immunopharmacol.*, **104**: 108407.
- GARNIER T, EIGLMEIER K, CAMUS JC, MEDINA N, MANSOOR H, PRYOR M, DUTHOY S, GRONDIN S, LACROIX C, MONSEMPE C, SIMON S, HARRIS B, ATKIN R, DOGGETT J, MAYES R, KEATING L, WHEELER PR, PARKHILL J, BARRELL BG, COLE ST, GORDON, SV, HEWINSON RG (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **100(13)**: 7877-7882.
- GEROSA F, BALDANI-GUERRA B, NISII C, MARCHESINI V, CARRA G, TRINCHIERI G (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med.*, **195(3)**: 327-333.
- GHON A (1912). In: Der primäre Lungenherd bei der Tuberkulose der Kinder. Urban & Schwarzenberg, Munich.
- GORMLEY E, DOYLE MB, FITZSIMONS T, MCGILL K, COLLINS JD (2006). Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of gamma-interferon (Bovigam) assay. *Vet Microbiol.* **112(2-4)**: 171-179.

- GRIFFIN JFT, BUCHAN GS (1994). Aetiology, pathogenesis and diagnosis of *Mycobacterium bovis* in deer. *Vet Microbiol.*, **40(1-2)**: 193-205.
- GRIFFIN JM, DOLAN LA (1995). The role of cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis* in the epidemiology of tuberculosis in cattle in the Republic of Ireland: a review. *Ir Vet J.*, **48**: 228-234.
- GROSS MB (2017). IMMUNODEFICIENCY 27B; IMD27B. Erişim Adresi: [<https://omim.org/entry/615978>]. Erişim Tarihi: 16/03/2022.
- GUIRADO E, SCHLESINGER LS, KAPLAN G (2013). Macrophages in tuberculosis: friend or foe. *Semin Immunopathol.*, **35(5)**: 563-583.
- GUTIERREZ MG, MASTER SS, SINGH SB, TAYLOR GA, COLOMBO MI, DERETIC V (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell.*, **119(6)**: 753-766.
- HALIGUR M, VURAL SA, SAHAL M, URAL K, BERKIN S (2007). Generalised tuberculosis in a cat. *Bull Vet Inst Pulawy.*, **51**: 531-534.
- HANNAWAY C (2008). In: Biomedicine in the twentieth century: practices, policies and politics. IOS Press, Amsterdam.
- HERSHEY GKK, FRIEDRICH MF, ESSWEIN LA, THOMAS ML, CHATILA TA (1997). The association of atopy with a gain-of-function mutation in the  $\alpha$  subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med*, **337(24)**: 1720-1725.
- HETTEC, RUBIN EJ (2008). Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **72(1)**: 126-156.
- HUMPHREY DM, WEINER MH (1987). Mycobacterial antigen detection by immunohistochemistry in pulmonary tuberculosis. *Hum Pathol.*, **18(7)**: 701-708.
- HUNTER RL (2011). Pathology of post primary tuberculosis of the lung: An illustrated critical review. *Tuberculosis (Edinb.)*, **91(6)**: 497-509.
- JAY SJ, KIRBIYIK U, WOODS JR, STEELE GA, SCHWENGBER RB, GUPTA P (2018). Modern theory of tuberculosis: culturomic analysis of its historical origin in Europe and North America. *Int J Tuberc Lung Dis.* **22(11)**: 1249-1257.
- JOHNSON L, GOUGH J, SPENCER Y, HEWINSON G, VORDERMEIER M, WANGOO A (2006). Immunohistochemical markers augment evaluation of vaccine efficacy and disease severity in bacillus Calmette–Guerin (BCG) vaccinated cattle challenged with *Mycobacterium bovis*. *Vet Immunol Immunopathol.*, **111(3-4)**: 219-229.
- KATZMANN JA, CLARK RJ, ABRAHAM RS, BRYANT S, LYMP JF, BRADWELL AR, KYLE RA (2002). Serum reference intervals and diagnostic ranges for free  $\kappa$  and free  $\lambda$  immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin Chem.*, **48(9)**: 1437-1444.
- KAWAI T, AKIRA S (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.*, **11(5)**: 373-384.

- KAPLAN G, VAN VOORHIS WC, SARNO EN, NOGUEIRA N, COHN ZA (1983). The cutaneous infiltrates of leprosy. A transmission electron microscopy study. *J Exp Med.*, **158(4)**: 1145-1159.
- KAUFMANN (2006). Tuberculosis: back on the immunologists' agenda. *Immunity.*, **24(4)**: 351-357.
- KHATTAK I, MUSHTAQ MH, AHMAD MU, KHAN MS, CHAUDHRY M, SADIQUE U (2016). Risk factors associated with *Mycobacterium bovis* skin positivity in cattle and buffalo in Peshawar, Pakistan. *Trop Anim Health Prod.*, **48(3)**: 479-485.
- KIESER KJ, RUBIN EJ (2014). How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nat Rev Microbiol.*, **12(8)**: 550-562
- KINNE J, JOHNSON B, JAHANS KL, SMITH NH, UL-HAQ A, WERNERY U (2006). Camel tuberculosis- a case report. *Trop Anim Health Prod.*, **38(3)**: 207-213.
- LAWN SD, ZUMLA AI (2011). Seminar tuberculosis. *Lancet*, **378.9785**: 57-72.
- LEONG AS, COOPER K, LEONG FJ (2003). In: Manual of Diagnostic Cytology, Cambridge, England: Greenwich Medical Media Ltd.
- LIAO W, LIN JX, LEONARD WJ (2011). IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol.*, **23(5)**: 598-604.
- LIEBANA E, JOHNSON L, GOUGH J, DURR P, JAHANS K, CLIFTON-HADLEY R, SPENCER Y, HEWINSON RG, DOWNS SH (2008). Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales. *Vet J.*, **176(3)**: 354-360.
- LOBUE PA, ENARSON DA, THOEN CO (2010). Tuberculosis in humans and animals: an overview. *Int J Tuberc Lung Dis.*, **14(9)**: 1075-1078.
- LOPEZ A (2007). Respiratory System. In: Pathologic Basis of Veterinary Disease. Ed: McGavin M.D. Zachari J.F. Mosby, St. Louis.
- LUKACS NW, CHENSUE SW, STRIETER RM, WARMINGTON K, KUNKEL SL (1994). Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF-alpha-inducible intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol.*, **152(12)**: 5883-5889.
- MALONE FE, WILSON EC, POLLOCK JM, SKUCE RA (2003). Investigations into an outbreak of tuberculosis in a flock of sheep in contact with tuberculous cattle. *J Vet Med B*, **50(10)**: 500-504.
- MAMISHI S, POURAKBARI B, MARJANI M, BAHADOR A, MAHMOUDI S (2015). Discriminating between latent and active tuberculosis: the role of interleukin-2 as biomarker. *J Infect.*, **70(4)**: 429-431.
- MCCARTHY OR (2001). The key to the sanatoria. *J R Soc Med.*, **94(8)**: 413-417.
- MCILROY SG, NEILL SD, MCCRACKEN RM (1986). Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *Vet Rec Open.*, **118(26)**: 718-721.

- MIOSSEC P, KORN T, KUCHROO VK (2009). "Interleukin-17 and type 17 helper T cells". *N Engl J Med.*, **361(9)**: 888–898.
- MITCHELL MA (2012). Mycobacterial infections in reptiles. *Vet Clin N Am- Exot Anim Pract.*, **15(1)**: 101–111.
- NARNAWARE SD, DAHIYA SS, TUTEJA FC, NAGARAJAN G, NATH K, PATIL NV (2015). Pathology and diagnosis of *Mycobacterium bovis* in naturally infected dromedary camels (*Camelus dromedarius*) in India. *Trop Anim Health Prod.*, **47(8)**: 1633-1636.
- NEBREDA T, ALVAREZ-PRIDA E, BLANCO B, REMACHA MA, SAMPER S, JIMENEZ MS (2016). Peritoneal tuberculosis due to *Mycobacterium caprae*. *IDCases.*, **5(4)**: 50-52.
- NEILL SD, BRYSON DG, POLLOCK JM (2001). Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis (Edinb.)*, **81(1-2)**: 79-86.
- NEILL SD, POLLOCK JM, BRYSON DB, HANNA J (1994). Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol.*, **40(1-2)**: 41-52.
- NICOD LP (2007). Immunology of tuberculosis. *Swiss Med Wkly.*, **137(25-26)**: 357-362.
- NOORDHOEK GT, VAN EMBDEN JD, KOLK AH (1996). Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J Clin Microbiol.*, **34(10)**: 2522-2525.
- NORTH, RJ, JUNG YJ (2004). Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol.*, **22**: 599-623.
- NOVICK D, ORCHANSKY P, REVEL M, RUBINSTEIN M (1987). The human interferon-gamma receptor. Purification, characterization, and preparation of antibodies. *J Biol Chem.*, **262(18)**: 8483-8487.
- O'BRIEN DJ, SCHMITT SM, LYASHCHENKO KP, WATERS WR, BERRY DE, PALMER MV, MCNAIR J, GREENWALD R, ESFANDIARI J, COSGROVE MK (2009). Evaluation of blood assays for detection of *Mycobacterium bovis* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Michigan. *J Wildl Dis.*, **45(1)**: 153-164.
- OLEA-POPELKA F, MUWONGE A, PERERA A, DEAN AS, MUMFORD E, ERLACHER-VINDEL E, FORCELLA S, SILK BJ, DITIU L, EL IDRISSE A, RAVIGLIONE M, COSIVI O, LOBUE P, FUJIWARA PI (2016). Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis*-a call for action. *Lancet Infect Dis.*, **17(1)**: e21-e25.
- OSTERTAGOVÁ E, OSTERTAG O, KOVÁČ J (2014). Methodology and Application of Kruskal-Wallis Test. *Appl Mech Mater.*, **611**: 115-120.
- O'REILLY LM, DABORN CJ (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis.*, **76**: 1-46.
- OZMEN O, KURŞUN O, OZCELIK M (2005). Bovine tuberculosis in Burdur, southern Turkey: epidemiological, pathological and economic study. *Int J Tuberc Lung Dis.*, **9(12)**: 1398-1402.

- ÖZMEN Ö (2009). Immunohistochemical detection of C-Reactive protein, serum Amyloid-A, caspase and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in mediastinal lymph nodes in cattle with tuberculosis. *Rev Med Vet (Toulouse)*, **160(6)**: 288-292.
- ÖZTÜRK CE, ŞAHİN İ, ÖKSÜZ Ş, KILIÇ N, KILINÇEL Ö, AYDIN L, ATİK D, AFŞİN E (2016). Investigation of *Mycobacterium bovis* subsp. Bovis among the strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated in Düzce Province, Turkey. *Mikrobiyol Bul.*, **50(3)**: 392-400.
- ÖZTÜRK-GÜRGEN H, RIESEBERG B, LEIPIG-RUDOLPH M, STRAUBINGER RK, HERMANN S W (2020). Morphology of Naturally-Occurring Tuberculosis in Cattle Caused by *Mycobacterium caprae*. *J Comp Pathol.*, **174**: 120-139.
- PAHARI S, NEGI S, AQDAS M, ARNETT E, SCHLESINGER LS, AGREWALA JN (2020). Induction of autophagy through CLEC4E in combination with TLR4: an innovative strategy to restrict the survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *Autophagy*, **16(6)**: 1021-1043.
- PALMER MV, KANIPE C, BOGGIATTO PM (2022). The bovine tuberculoid granuloma. *Pathogens*, **11(1)**: 61.
- PALMER MV, THACKER TC, KANIPE C, BOGGIATTO PM (2021). Heterogeneity of Pulmonary Granulomas in Cattle Experimentally Infected With *Mycobacterium bovis*. *Front Vet Sci.*, **8**: 671460.
- PALMER MV, THACKER TC, WATERS WR (2015). Analysis of Cytokine Gene Expression using a Novel Chromogenic In-situ Hybridization Method in Pulmonary Granulomas of Cattle Infected Experimentally by Aerosolized *Mycobacterium bovis*. *J Comp Pathol.*, **153(2-3)**: 150-159.
- PALMER MV, THACKER TC, WATERS WR (2016). Differential Cytokine Gene Expression in Granulomas from Lungs and Lymph Nodes of Cattle Experimentally Infected with Aerosolized *Mycobacterium bovis*. *PLoS One*. **11(11)**: e0167471.
- PALMER MV, WATERS WR, THACKER TC (2007). Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Pathol.*, **44(6)**: 863-874.
- PALMER MV, WATERS WR, WHIPPLE DL, SLAUGHTER RE, JONES SL (2004). Evaluation of an in Vitro Blood-Based Assay to Detect Production of Interferon- $\gamma$  by *Mycobacterium Bovis*—Infected White-Tailed Deer (*Odocoileus Virginianus*). *J Vet Diagn Invest.*, **16(1)**: 17-21.
- PALMER MV, WHIPPLE DL, PAYEUR JB, ALT DP, ESCH KJ, BRUNING-FANN CS, KANEENE JB. (2000). Naturally occurring tuberculosis in white-tailed deer. *J Am Vet Med Assoc.*, **216(12)**: 1921-1924.
- PALMER MV, WHIPPLE DL, WATERS WR (2001). Experimental deer-to-deer transmission of *Mycobacterium bovis*. *Am J Vet Res*, **62(5)**: 692-696.
- PANCIERA RJ, CONFER AW (2010). Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, **26(2)**: 191-214.

- PARKIN J, COHEN B (2001). An overview of the immune system. *Lancet.*, **358(9270)**: 1777-1789.
- PEARCE-DUVET JM (2006). The origin of human pathogens: evaluating the role of agriculture and domestic animals in the evolution of human disease. *Biol Rev Camb Philos Soc.*, **81(3)**: 369-382.
- PÉREZ DE VAL B, GRAU-ROMA L, SEGALÉS J, DOMINGO M, VIDAL E (2014). Mycobacteriosis outbreak caused by *Mycobacterium avium* subsp. *avium* detected through meat inspection in five porcine fattening farms. *Vet Rec.*, **174(4)**: 96.
- PERRY BD, GRACE D, SONES K (2013). Current drivers and future directions of global livestock disease dynamics. *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, **110(52)**: 20871-20877.
- PERSSON S (2010). In: *Smallpox, Syphilis and Salvation: Medical Breakthroughs That Changed the World*. ReadHowYouWant, Sydney.
- PETROVSKI K (2015). *Vade Mecum of Cattle Conditions*. In: *Bovine Medicine*, 3rd Edition, Ed: Peter Cockcroft. Wiley-Blackwell.
- POLLOCK JM, MCNAIR J, WELSH MD, GIRVIN RM, KENNEDY HE, MACKIE DP, NEILL SD (2001). Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis.*, **81(1-2)**: 103-107.
- QUINN PJ, MARKEY BK, LEONARD FC, HARTIGAN P, FANNING S, FITZPATRICK E. (2011). *Mycobacterium* species. In: *Veterinary microbiology and microbial disease*. John Wiley & Sons.
- RAFFETSEDER J (2016). In: *Interplay of human macrophages and Mycobacterium tuberculosis phenotypes*. Linköping University Electronic Press, Linköping, Sweden.
- RAMAKRISHNAN L (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol.*, **12(5)**: 352-366.
- RATCLIFFE HL (1952). Tuberculosis induced by droplet nuclei infection. *Am J Hygiene.*, **55**: 36-48.
- REAVILL DR, SCHMIDT RE (2012). Mycobacterial lesions in fish, amphibians, reptiles, rodents, lagomorphs, and ferrets with reference to animal models. *Vet Clin N Am- Exot Anim Pract.*, **15 (1)**: 25-40.
- ROTHEL JS, JONES SL, CORNER LA, COX JC, WOOD PR (1990). A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust Vet J.*, **67(4)**: 134-137.
- ROTHSCHILD BM, MARTIN LD, BERCOVIER H, BAR-GAL GK, GREENBLATT C, DONOGUE H, SPIGELMAN M, BRITAIN D (2001). *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. *Clin Infect Dis.*, **33(3)**: 305-311.
- ROURA-MIR C, WANG L, CHENG TY, MATSUNAGA I, DASCHER CC, PENG SL, FENTON MJ, KIRSCHNING C, MOODY DB (2005). *Mycobacterium tuberculosis*

- regulates CD1 antigen presentation pathways through TLR-2. *J Immunol.*, **175(3)**: 1758-1766.
- RYAN TJ, BUDDLE BM, DE LISLE GW (2000). An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Res Vet Sci.*, **69(1)**: 57-61.
- SALGUERO FJ, GIBSON S, GARCIA-JIMENEZ W, GOUGH J, STRICKLAND TS, VORDERMEIER HM, VILLARREAL-RAMOS B (2017). Differential cell composition and cytokine expression within lymph node granulomas from BCG-vaccinated and non-vaccinated Cattle Experimentally Infected with *Mycobacterium bovis*. *Transbound Emerg Dis.*, **64(6)**: 1734-1749.
- SANCHEZ D, ROJAS M, HERNANDEZ I, RADZIOCH D, GARCIA LF, BARRERA LF (2010). Role of TLR2- and TLR4-mediated signaling in *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage death. *Cell Immunol.*, **260(2)**:128-136.
- SAVIC B, SJOBRING U, ALUGUPALLI S, LARSSON L, MIORNER H (1992). Evaluation of polymerase chain reaction, tuberculostearic acid analysis, and direct microscopy for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum. *J Infect Dis.* **166**: 1177-1180.
- SCHÖNLEIN JL (1832). Allgemeine und specielle pathologie und " therapie; nach vorlesungen niedergeschrieben und hrsg. Von einem seiner zuhorer. W " urzburg, Germany: Etlinger, 1832. Erişim Adresi: <http://books.google.com/books?vid¼BCUL1092805487>. [German], Erişim Tarihi: 01/08/2018.
- SHARMA M, SHARMA S, ROY S, VARMA S, BOSE M (2007). Pulmonary epithelial cells are a source of interferon-gamma in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol Cell Biol.*, **85(3)**: 229-237.
- SHIELDS T (2009). In: General Thoracic Surgery 7. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- SHIVAPRASAD HL, PALMIERI C (2012). Pathology of Mycobacteriosis in Birds. *Vet Clin N Am- Exot Anim Pract.*, **15**: 41-55.
- SHU D, HEISER A, WEDLOCK DN, LUO D, DE LISLE GW, BUDDLE BM (2014). Comparison of gene expression of immune mediators in lung and pulmonary lymph node granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Immunol Immunopathol.*, **160**: 81–89.
- SOKOL CL, BARTON, GM, FARR AG, MEDZHITOV R (2008). A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat. Immunol.*, **9(3)**: 310.
- SPELLBERG B, EDWARDS JR JE (2001). Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis.*, **32(1)**: 76-102.
- ST CROIX CM, SHAND SH, WATKINS SC (2005). Confocal microscopy: comparisons, applications, and problems. *Comparative Study.*, **39(6 Suppl)**:S2-5.
- STAMP JT (1948). Bovine pulmonary tuberculosis. *J Comp Pathol.*, **58**: 9-23.

- TAILLEUX L, SCHWARTZ O, HERRMANN JL, PIVERT E, JACKSON M, AMARA A, LEGRES L, DREHER D, NICOD LP, GLUCKMAN JC, LAGRANGE PH, GICQUEL B, NEYROLLES O (2003). DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J Exp Med.*, **197(1)**: 121-127.
- TEREFE D (2014). Gross pathological lesions of bovine tuberculosis and efficiency of meat inspection procedure to detect-infected cattle in Adama municipal abattoir. *J Vet Med Anim Health.*, **6(2)**: 48-53.
- THACKER TC, PALMER MV, WATERS WR (2007). Associations between cytokine gene expression and pathology in *Mycobacterium* infected cattle. *Vet Immunol Immunopathol.*, **119(3-4)**: 204-213.
- THACKER TC, PALMER MV, WATERS WR (2009). T-Cell mRNA Expression in Response to *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination and *Mycobacterium bovis* Infection of White-Tailed Deer. *Clin Vaccine Immunol.*, **16(8)**: 1139-1145.
- THOEN C, LOBUE P, DE KANTOR I (2006). The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet. Microbiol.*, **112(2-4)**: 339-345.
- THOEN C (2018). Overview of Tuberculosis and other Mycobacterial Infections. Merck Veterinary The Manual (10th Ed. online), Erişim Tarihi: 13/07/2018.
- TRAIL RR (1970). Richard Morton (1637-1698). *Med Hist.*, **14(2)**: 166-174.
- ULRICHS T, KAUFMANN SHE (2006). New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol.*, **208(2)**: 261-269.
- ULRICHS T, LEFMANN K, REICH M, MORAWIETZ L, ROTH A, BRINKMANN V, KOSMIADI GA, SEILER P, AICHELE P, HAHN H, KRENN V, GÖBEL UB, KAUFMANN SHE (2005). Modified immunohistological staining allows detection of Ziehl-Neelsen-negative *Mycobacterium tuberculosis* organisms and their precise localization in human tissue. *J Pathol.*, **205(5)**: 633-640.
- UNAT EK (1979). The Turkish tuberculosis history in the last 40 of years of Ottoman Empire. *Cerrahpasa J Med.*, **10**: 273-284.
- VAN RHIJN I, GODFROID, J, MICHEL A, RUTTEN V (2008). Bovine tuberculosis as a model for human tuberculosis: Advantages over small animal models. *Microbes Infect.*, **10**: 711-715.
- VAN SOOLINGEN D, HOOGENBOEZEM T, DE HAAS PE, HERMANS PW, KOEDAM MA, TEPPEMA KS, BRENNAN PJ, BESRA GS, PORTAELS F, TOP J, SCHOULS LM, VAN EMBDEN JD (1997). A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol.*, **47(4)**: 1236-1245.
- VASANTHAKUMARI R, JAGANNATH K, RAJASEKARAN S (1986). A cold staining method for acid-fast bacilli. *Bull World Health Organ.*, **64(5)**: 741.
- VAURE C, LIU Y (2014). A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol.*, **5**: 316.

- VERMA AK, TIWARI R, CHAKRABORY S, NEHA SAMIATHAN M, DHAMA K, SINGH SV (2014). Insights into bovine tuberculosis (bTB), various approaches for its diagnosis, control and its public health concerns: An update. *Asian J Anim Vet Adv.*, **9**: 323-344.
- VORDERMEIER, HM, JONES GJ, BUDDLE BM, HEWINSON RG, VILLARREAL-RAMOS B (2016). Bovine tuberculosis in cattle: vaccines, DIVA tests, and host biomarker discovery. *Annu Rev Anim Biosci.*, **4**: 87-109.
- VURAL SA, TUNCAR (2001). Generalized tuberculosis in a 45 day-old calf. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.*, **108(11)**: 468-470.
- VURAL SA, ALCIGIR ME (2010). Detection of pathomorphological and immunohistochemical findings of tuberculosis in cattle slaughtered in Ankara and its surroundings. *Ank Univ Vet Fak Derg.*, **57**: 253-257.
- WADDINGTON K (2004). To stamp out "so terrible a malady": bovine tuberculosis and tuberculin testing in Britain, 1890-1939. *Med Hist.*, **48(1)**: 29-48.
- WANG S, DIAO N, LU C, WU J, GAO Y, CHEN J, ZHOU Z, HUANG H, SHAO L, JIN J, WENG X, ZHANG Y, ZHANG W (2012). Evaluation of the diagnostic potential of IP-10 and IL-2 as biomarkers for the diagnosis of active latent tuberculosis in a BCG-vaccinated population. *PLoS One.*, **7(12)**: e51338.
- WANGOO A, JOHNSON L, GOUGH J, ACKBAR R, INGLUT S, HICKS, D, SPENCER Y, HEWINSON G, VORDERMEIER M (2005). Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen,  $\gamma\delta$  (WC1+) T cells and CD 68+ cells. *Journal of comparative pathology*, **133(4)**: 223-234.
- WATERS WR, MAGGIOLI MF, PALMER MV, THACKER TC, MCGILL JL, VORDERMEIER HM, BERNEY-MEYER L, JACOBS JR WR, LARSEN MH (2016). Interleukin-17A as a biomarker for Bovine Tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.*, **23(2)**: 168-180.
- WELLS WF, RATCLIFFE HL, CRUMB C (1948). On the mechanics of droplet nuclei infection. II. Quantitative experimental air-borne infection in rabbits. *Am J Hygiene.*, **47**: 11-28.
- WERNERY U, KINNE J, JAHANS KL, VORDERMEIER HM, ESFANDIARI J, GREENWALD R, JOHNSON B, UL-HAQ A, LYASHCHENKO KP (2007). Tuberculosis outbreak in a dromedary racing herd and rapid serological detection of infected camels. *Vet Microbiol.*, **122(1-2)**: 108-115.
- WHIPPLE DL, BOLIN CA, DAVIS AJ, JARNAGIN JL, JOHNSON DC, NABORS RS, PAYEUR JB, SAARI DA, WILSON AJ, WOLF MM (1995). Comparison of sensitivity of caudal fold skin test and a commercial gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis. **56(4)**: 415-419.
- WOAH (2018). Erişim Adresi: [\[https://wahis-uat.woah.org/#/report-smr/view?reportId=26847&period=SEM02&areaId=231&isAquatic=false\]](https://wahis-uat.woah.org/#/report-smr/view?reportId=26847&period=SEM02&areaId=231&isAquatic=false). Erişim Tarihi: 09/06/2021.

WRAY C (1975). Survival and spread of pathogenic bacteria of veterinary importance within the environment. *Vet Bull.*, **45**: 543–550.

ZANELLA G, DUVAUCHELLE A, HARS J, MOUTOU F, BOSCHIROLI ML, DURAND B (2008). Patterns of lesions of bovine tuberculosis in wild red deer and wild boar. *Vet Rec.*, **163(2)**: 43-47.

ZHANG Y, POST-MARTENS K, DENKIN S (2006). New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. *Drug Discov Today.*, **11(1-2)**: 21-27.

ZINK AR, SOLA C, REISCHL U, GRABNER W, RASTOGI N, WOLF H, NERLICH AG (2003). Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J Clin Microbiol.*, **41(1)**: 359-367.



## EKLER

### Ek-1. Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'ndan alınan etik kurul kararı.

#### ANKARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

TOPLANTI TARİHİ : 05/09/2018  
TOPLANTI NO : 2018-17  
DOSYA NO : 2018-88  
KARAR NO : 2018-17-107

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Sevil ATALAY VURAL'ın yaptığı; araştırmacı olarak Arş. Gör. Özgür ÖZÖNER'in katıldığı "Doğal Sığır Tüberkülozunda Akciğer ve İlgili Lenf Düğümlerindeki Granülomların Patomorfolojik ve İmmunohistokimyasal Yapısı" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi" nin 7-h maddesi kapsamında değerlendirilerek izne tabi olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Geçerlilik Süresi : 01/01/2019-01/01/2024

ASLININ AYNIDIR  
05/09/2018

Prof. Dr. M. Taner KARAÖĞLÜ  
A.Ü. HADYEK Başkanı

## Ek-2. T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'ndan alınan çalışma izni.



T.C.  
GIDA, TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI  
Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü

Sayı : 71037622-604.01.01-E.730276  
Konu : Örnek Talebi

15.03.2018

VETERİNER KONTROL MERKEZ ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi : a) 30.01.2018 tarihli dilekçe.  
b) 01.02.2018 tarihli ve 71037622-604.01.01-E.352011 sayılı yazı.

İlgi (a) kayıtlı dilekçede Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında yürütülmesi planlanan "Tüberkülozis Hastalığı" konulu bir doktora çalışmasının yürütülebilmesi ve Veteriner Kontrol Enstitülerine gelen hastalıktan şüpheli materyallerden örnek alınabilmesi için Genel Müdürlüğümüz izinleri talep edilmiş olup, ilgi (b) yazımız ile söz konusu çalışmanın yürütülmesinin Genel Müdürlüğümüzce uygun görüldüğü ve çalışma sonuçlarının yayımlanması planlanıyor ise elde edilen bulguların Genel Müdürlüğümüz ile paylaşıldıktan sonra yayımlanması hususu araştırmacıya bildirilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

 e-imzalıdır

Doç. Dr. Veli GÜLYAZ  
Genel Müdür Yardımcısı V.

Not: 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.

Eskişehir Yolu 9. Km. Lodumlu Mevkii 06800 Çankaya/ Ankara

Bilgi için: İlkay DEMİRHAN  
Veteriner Hekim  
Telefon No: (312) 258 75 34