

PNÖMONİLİ SIĞIR AKCİĞERLERİNDE
***Mycoplasma bovis* ENFEKSİYONUNUN**
PATOLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI

Serdar ALTUN
Veteriner Patoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM

Doktora Tezi - 2015

TC
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PNÖMONİLİ SIĞIR AKCİĞERLERİNDE *Mycoplasma bovis*
ENFEKSİYONUNUN PATOLOJİK VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Serdar ALTUN

**Veteriner Patoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez DANIŞMANI
Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM**

**ERZURUM
2015**

TC
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**PNÖMONİLİ SIĞIR AKCİĞERLERİNDE *Mycoplasma bovis*
ENFEKSİYONUNUN PATOLOJİK VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Serdar ALTUN

Tez Savunma Tarihi: 12.06.2015

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM (Atatürk Üniversitesi)

Jüri üyesi : Prof. Dr. Hüdaverdi ERER (Selçuk Üniversitesi)

Jüri üyesi : Prof. Dr. Enver BEYTUT (Kafkas Üniversitesi)

Jüri üyesi : Doç. Dr. Ertan ORUÇ (Atatürk Üniversitesi)

Jüri üyesi : Yrd. Doç. Dr. Seyda CENGİZ (Atatürk Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM - 2015

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
TEŞEKKÜR.....	III
ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
TABLolar DİZİNİ	VII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2. 1. Solunum Sistemi	4
2.2. Pnömoniler.....	7
2.2.1. Bronkopnömoni.....	8
2.2.1.1. İrinli - Nekrotik Bronkopnömoniler.....	8
2.2.1.2. Fibrinli Bronkopnömoniler.....	9
2.2.1.3. Aspirasyon Pnömonisi	11
2.2.2. İntersitisyel Pnömoni.....	12
2.2.3. Granülomatöz Pnömoni.....	13
2.3. Plöra Yangıları.....	14
2.4. <i>Mycoplasma bovis</i>	15
2.4.1. Tarihçe ve Taksonomi.....	15
2.4.2. Epidemiyoloji.....	16
2.4.3. Patogenez.....	16
2.4.4. Klinik Bulgular.....	18
2.4.5. Tanı.....	18
3. MATERYAL VE METOT.....	20
3.1. Çalışma Materyali.....	20
3.2. Makroskopik İnceleme.....	20

3.3. Dokuların İşlenmesi.....	20
3.4. Mikroskopik İncelemeler.....	21
3.4.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi.....	21
3.4.2. PAS (Periodic Acid Schiff) Boyama Yöntemi.....	21
3.4.3. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi.....	22
3.4.4. İmmüfloresans Boyama Yöntemi.....	23
3.5. Dondurulmuş dokularda PZR uygulaması.....	25
3.5.1. DNA ekstraksiyon basamağı.....	25
4. BULGULAR.....	27
4.1. Makroskopik Bulgular.....	27
4.1.1. İrinli-nekrotik Bronkopnömoni.....	27
4.1.2. Fibrinli-nekrotik Bronkopnömoni.....	28
4.1.3. İntersitisiyel Pnömoni.....	30
4.1.4. Granülomatöz Pnömoni.....	30
4.2. Mikroskopik Bulgular.....	31
4.2.1. İrinli-nekrotik Pnömoniler.....	31
4.2.2. Fibrinli-nekrotik Bronkopnömoniler.....	33
4.2.3. İntersitisiyel Pnömoniler.....	35
4.2.4. Granülomatöz Pnömoniler.....	37
4.3. PAS Boyama Bulguları.....	37
4.4. İmmunohistokimyasal Boyama Bulguları.....	39
4.5. İmmüfloresan Boyama Bulguları.....	43
4.6. PZR sonuçları.....	46
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	56

KAYNAKLAR.....	58
EKLER.....	67
EK-1. ÖZGEÇMİŞ.....	67
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU.....	68

TEŞEKKÜR

Başta, danışman hocam sayın Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM olmak üzere bölüm hocalarım Doç. Dr. Ertan ORUÇ, Doç Dr. Kübra A. TERİM KAPAKİN ve Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÖZKARACA' ya şükranlarımı sunarım. Çalışmam boyunca bana verdikleri destek ve yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Seyda CENGİZ, Yrd. Doç. M. Özkan TİMURKAN ve Yrd. Doç. Dr. Orhan AKMAN hocalarıma teşekkürü borç bilirim. Meslektaşım ve arkadaşım Araş. Gör Selim ÇOMAKLI' ya teşekkür ederim. Ayrıca, çalışmamda yardımcı olan ve materyal sağlayan Et ve Balık Kurumu ve Özel Özser Et Kombinası İşletme yöneticilerine teşekkürü bir borç bilirim.

Serdar ALTUN

ÖZET

PNÖMONİLİ SIĞIR AKCİĞERLERİNDE *Mycoplasma bovis* ENFEKSİYONUNUN PATOLOJİK ve MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Amaç: Bu çalışmada; Erzurum ilinde yer alan mezbahalarda kesilen sığırların akciğerlerinde *Mycoplasma bovis*'in varlığı ve yaygınlığının PZR, immunohistokimya ve immunfloresan yöntemlerle saptanması, ayrıca histopatolojik incelemeler ışığında bu enfeksiyonun oluşturduğu yangısal yanıtın karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmada mezbahada kesilen toplam 836 sığırın akciğerleri incelenmiş, bunların 100'ünde (%11.96) makroskobik olarak pnömoni bulguları gözlenerek örnekler alınmıştır. Kesilen hayvanlara ait tür, yaş, cinsiyet ve akciğerde görülen lezyon lokalizasyonu gibi bilgiler, hazırlanan formlara işlenerek veriler toplandı. Toplanan dokuların rutin histopatolojik ve immunohistokimyasal boyamaları Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim dalı ve PZR uygulamaları ise Mikrobiyoloji Anabilim dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Bulgular: Pnömoniler, eksudatın karakteri ve lezyonların organdaki lokalizasyonu dikkate alınarak 5 grupta sınıflandırılmıştır. Pnömonili akciğerde ve etken pozitif örneklerde lezyonlara en sık kranial loplarda rastlandı. En yaygın tespit edilen pnömoni tipleri sırasıyla intersitisyel pnömoni (42 hayvan), irinli-nekrotik bronkopnömoni (28 hayvan), bronkointersitisyel pnömoni (16 hayvan), fibrinli-nekrotik bronkopnömoni (8 hayvan), granülomatoz pnömoni (6 hayvan) olarak tespit edilmiştir. PZR testi sonuçlarına göre 36 akciğer örneğinde (%36) *M. bovis* etken pozitif bantlar görüldü. Bunun yanında pozitif vakalar; interstisyel pnömonili (16 adet), irinli - nekrotik pnömonili (9 adet), bronkointersitisyel pnömonili (7 adet) ve fibrinli-nekrotik pnömoni (4 adet) bulguları gösteren olgularda tespit edilmiştir. İmmunohistokimya ve immunfloresan boyamalar sonucunda pozitif olan 30 örnekte PZR pozitifliğide saptandı. Bu olgular içerisinde immün-pozitif reaksiyonlara çoğunlukla yangı hücrelerinin sitoplazmaları başta olmak üzere, bronş ve bronşiyol epitelleri ve yine nekroz alanlarında rastlandı.

Sonuç: Elde edilen bu veriler değerlendirildiğinde, sığır pnömonilerinde *M. bovis*' in oldukça yaygın olduğu görülmüştür. *M. bovis*' in PZR yöntemi kullanılarak ortaya konulması açısından yapılan ekstraksiyon yöntemlerinde optimizasyon işleminin, sağlıklı sonuçlar elde edilmesi açısından önemli bir yer tuttuğu kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Sığır, Pnömoni, PZR, *Mycoplasma bovis*, İmmunohistokimya, İmmunfloresans.

ABSTRACT

Investigation of *Mycoplasma bovis* infection in pneumonic lungs of cattle with Pathological and molecular methods.

Aim: The aim of this study was to determine presence and prevalence of *Mycoplasma bovis* by immunohistochemistry, immunofluorescence stain and PCR methods in cattle lungs with pneumonia slaughtered in Erzurum province. Furthermore to characterize the inflammatory response against the agent by investigation of the lesions in lungs histopathologically.

Material and Methods: To obtain 100 lung samples showing pneumonic lesions, totally 836 (11.96 %) cows were watched before and after they had been slaughtered. Information about these animals like genus, age, sex and the location of the lesions in lungs were noted on information forms. All routine histopathology process like formalin- fixing, sectioning paraffin embedded lung tissue samples, immunohistochemical staining and PCR, besides examination of slides were undertaken in Pathology and Microbiology Department of Veterinary Medicine Faculty of Atatürk University.

Results: All pneumonic lesions were classified in five groups according to property of the exudative character and affected areas. Pneumonia was detected most frequently in the cranial lobe lesions in the lungs and agents of positive samples. During the evaluation type of interstitial pneumonia was the most common and seen in (42) animals, suppurative - necrotic (Caseo necrotic) bronchopneumonia (28) animals, bronchiointerstitial pneumonia (16), necrotic - fibrinopurulent bronchopneumonia (8) and granulomatous pneumonia (6). According to the PCR test results in 36 (36%) lung specimen yielded positive factors for *M. bovis* band. *M. bovis* positive cases include 16 interstitial, 9 suppurative- necrotic, broncho-interstitial pneumonia 7 and fibrinonecrotic 4 pneumonic cases. Immunohistochemistry and immunofluorescence staining result also PCR positive reaction was observed in 30 (30%) specimens of lung tissue samples showing pneumonic lesions. For positive reactions of immunohistochemistry and immunofluorescence frequently cytoplasm of inflammatory cells were first target also epithelium and exudate in lumen of bronch and bronchiole was too.

Conclusion: According to the results obtained, *M. bovis* pneumonia was found to be quite common in cattle. Optimizing processes in the DNA extraction phase for detecting *M. bovis* factor by using the PCR method hold an important place for obtaining reliable results.

Key Words: Cattle, Pneumonia, PCR, *Mycoplasma bovis*, Immunohistochemistry, Immunofluorescence.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:

Sayfa No:

Şekil.2.1. Mollicutes sınıfının taksonomisi.....	15
Şekil.3.1. PZR jele amplifikasyon ürünü yükleme.....	26
Şekil 4.1. Sağ kranial lopta İrinli-nekrotik bronkopnömoni (ok).....	28
Şekil.4.2. Sol kranial lopta fibrinli pnömoni (ok).....	29
Şekil.4.3. Fibrinli nekrotik bronkopnömoni	29
Şekil.4.4. İntersitisyel pnömoni. Amfizemli alanlar (oklar).....	30
Şekil.4.5. İrinli-nekrotik bronkopnömoni. Bronşiyol lümeninde nötrofil ve deskuame olmuş epitel hücrelerinden oluşan eksudat (ok). HE. 100µm.	32
Şekil.4.6. İrinli-nekrotik bronkopnömoni. Kazeifikasyon nekrozu alanı ve nötrofil lökositler (oklar). HE. 50µm.....	32
Şekil.4.7. İrinli-nekrotik bronkopnömoni. Kazeifikasyon nekrozu alanı ve nötrofillerden zengin hücresel kuşak (oklar). HE. 50µm.	33
Şekil.4.8. Fibrinli-nekrotik bronkopnömoni. Alveol lümeninde fibrinli eksudat ile birlikte nötrofil, lenfosit ve makrofajlar (oklar). HE. 50µm.	34
Şekil.4.9. Fibrinli-nekrotik bronkopnömoni. Plörada kalınlaşma (ok). HE. 100µm.....	34
Şekil.4.10. İntersitisyel pnömoni. İntersitisyel dokuda yoğun mononükleer hücre infiltrasyonları ve bağdoku artışına bağlı interalveoler septumda kanlanlaşma (oklar). HE. 100µm.....	35
Şekil.4.11. İntersitisyel pnömoni. peribronşiyoler lenfoid dokuda hiperplazi (ok). HE. 50µm.....	36
Şekil.4.12. Bronkointersitisyel pnömoni. Alveol ve bronşiyol epitelinde nekroz ve yangısal eksudatın varlığı ile birlikte intersitisyel alanlarda mononükleer hücre artışı (ok). HE. 50µm.....	36
Şekil.4.13. Granülomatöz pnömoni. Nekroz alanı ve bu alanın çevresinde makrofajlar, epiteloid hücreler, Langhans dev hücreleri, lenfosit ve plazma hücrelerinin infiltre olduğu yangısal hücre kuşağı. Fibroz bağ dokudan oluşan kapsül (oklar). HE.100 µm.....	37
Şekil.4.14. Etken pozitif örnekte bronşiol mukoza, Goblet hücrelerinde musin (PAS) pozitifliği ve hiperplazi (oklar). 20 µm.....	38
Şekil.4.15. Bronş epitelinde PAS (Periodic Acid Schiff) pozitifliği. 100 µm.....	38
Şekil.4.16. İrinli-nekrotik bölgede ve çevresindeki yangı hücrelerinde immunpozitiflik (oklar). IHC. 20 µm	40

Şekil.4.17. Bronşiyol epitellerinde ve lamina propriyada bulunan hücrelerde immunpozitif reaksiyon (oklar). IHC. 20 µm.....	40
Şekil.4.18. Lamina propriyada bulunan yangı hücrelerinde immunpozitif reaksiyonlar (oklar). IHC. 10 µm.....	41
Şekil.4.19. Bronşiyol lümeninde aksudatta, epitellerde ve lamina propriyada bulunan yangı hücrelerinde immunpozitif reaksiyonlar (oklar). IHC. 20 µm.....	41
Şekil.4.20. İntersitisyel bölgede makrofajlarda immunpozitiflik (oklar) IHC. 20 µm....	42
Şekil.4.21. Bronş çevresi lamina propriya ve bez yapıları. Makrofajlarda immunpozitiflik (oklar). IHC. 20 µm.....	42
Şekil.4.22. Nekroz bölgesi ve çevresindeki yangı hücrelerinde immunfloresan pozitiflikler (oklar). IF. 20 µm.....	43
Şekil.4.23. Bronşiyol epitellerinde ve lamina propriyada bulunan hücrelerde immunfloresan pozitif reaksiyonlar (oklar). IF.20 µm.....	44
Şekil.4.24. İntersitisyel dokuda makrofajlarda immunfloresan pozitiflik (oklar). IF. 20 µm.....	44
Şekil 4.25. İntersitisyel dokuda makrofajlarda immunfloresan pozitiflik (oklar). IF. 20 µm.....	45
Şekil 4.26. <i>M. bovis</i> 'e spesifik 303 baz çifti uzunluğundaki bantlar gösteren PZR ve agaroz jel elektroforez sonuçları. M; Moleküler belirteç. P; Pozitif kontrol. (3,5,6,7,8,9); pozitif saha örnekleri. (1,2,4,10); negatif saha örnekleri.....	46
Şekil 4.27. <i>M. bovis</i> 'e spesifik 303 baz çifti uzunluğundaki bantlar gösteren PZR ve agaroz jel elektroforez sonuçları. M; Moleküler belirteç. (1,2,4,5); pozitif saha örnekleri. (3,6,7); negatif saha örnekleri.....	46

TABLolar DİZİNİ

Tablo No:

Sayfa No:

Tablo 4.1. Lezyonlu akciğerlerin PZR sonuçlarına göre etken tespit edilen sığırların ırklara göre dağılımı.....27

Tablo 4.2. Etken (PZR) pozitif ve negatif olgularda, pnömoni lezyonlarının anatomik olarak yerleşimi.....31

Tablo 4.3. Görülen pnömoni tipleri ve pozitif örneklerle ait sonuçlar.....39

Tablo 4.4. İHC ve İF pozitif vakalarda, *M. bovis*'in yerleşim yerleri.....45

Tablo 4.6. Karşılaştırmalı test sonuçları.....47

1. GİRİŞ

Sığırlarda solunum sistemi hastalıkları, tüm dünyada olduğu gibi¹⁻⁵ Türkiye’de de sıklıkla rastlanan⁶⁻⁹ ve ciddi ekonomik kayıplara yol açan, bu nedenle de üzerinde önemle durulması gereken bir sağlık sorunudur.^{2,9-13} Özellikle altı aylık buzağılarda sorun olmakla beraber, bir yaşına kadar hayvanlarda da sıklıkla görülebilmektedir.^{2,4,14-16} Sığır pnömonilerinin yaygınlığının ortaya konulması amacıyla yapılan çalışmalarda, pnömoni oranının % 3.6 ile % 65.83 arasında değiştiği bildirilmiştir.^{6,8,15,17,18} Solunum sistemi hastalıklarının oluşmasında enfeksiyöz etkenlerin sayı ve türlerinin yanı sıra bakım, beslenme ve uygun olmayan diğer predispoze faktörler de etkili olmaktadır.¹⁴ Sığırların solunum sistemi hastalıklarında ateş, nazal akıntı, solunum güçlüğü, şiddetli öksürük gibi klinik belirtiler ile birlikte verim kaybının sürekliliği dikkati çekmektedir.^{19,20} Solunum sistemi hastalıklarına sebep olan en önemli etkenler arasında *Bovine Respiratory Syncytial Virus*, *Parainfluenza Virus Type 3*, *Bovine Herpes Virus*, *Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus*, *Bovine Viral Diarrhea Virus* gibi virüsler ile *Mannheimia haemolytica* serotip A, *Pasteurella multocida* ve *Histophilus somni* gibi hücre duvarına sahip bakteriler ve *Mycoplasma* spp. yer alır. Stres faktörlerinin varlığında hücre duvarına sahip etkenlerin tek başına enfeksiyona sebep oldukları bildirilmiştir. Ayrıca virüslerin ve Mikoplazma türlerinin sinerjik olarak enfeksiyona dahil olmalarının, immunsupresyonun bulunduğu durumlarda enfeksiyonu daha şiddetli hale getirdiği rapor edilmiştir.^{10,15,19,21-26} Bu etkenler içerisinde Mikoplazmaların neden olduğu enfeksiyonlar, sığırların en önemli ve en fazla ekonomik kayba sebep olan hastalıkları arasında gösterilmektedir.^{2,15,27} Özellikle *M. bovis* artan prevalans değerleri ile solunum sistemi hastalıkları kompleksi kapsamında üzerinde durulan en önemli etken olarak gösterilmektedir.^{1,16,25,28} Yapılan araştırmalarda *M. bovis*’in

sığırlarda yaygın olarak pnömoni, farenjitis, mastitis, poliartritis, otitis media, keratokonjunktivitis ^{2,13,14,26,29,30,31} vulvovaginitis ve inferilititeye ^{32,33} sebep olduğu bildirilmiştir. ^{2,10,11,27,29,34,35} Ayrıca buzağılarda endokarditis, purulent meningitis ve serebral nekroz olgularında da *M. bovis* izole edildiği rapor edilmiştir. ³⁶

Hastalıktan ölümler, süt üretiminde düşüş, aşılama ve araştırma programları masrafları hastalığın neden olduğu direkt ekonomik kayıplar,⁹ canlı ağırlık kaybı, pazara geç arz ve azalmış döl verimi ise indirekt kayıplar olarak bildirilmiştir. ^{15,37}

Avrupa’da sığır pnömonileri sebebiyle yılda 500-600 milyon € kayıp olduğu, bunun da üçte birinin *M. bovis* tarafından oluşturulan enfeksiyonlara bağlı olduğu rapor edilmiştir. ^{11,12,15,38} Amerika Birleşik Devletleri’nde ise *M. bovis* enfeksiyonu sonucu hayvanlarda sadece canlı ağırlık artışıdaki yıllık ekonomik kaybın 32 milyon \$ olduğu bildirilmiştir.¹ Bunların yanında *M. bovis*’in sebep olduğu mastitislerden dolayı oluşan ekonomik anlamda ciddi kayıplarda bildirilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri’nde yıllık 100 milyon \$ üzerinde olan bu kaybın, solunum sistemi hastalıkları sonucu oluşan kayıptan daha büyük olduğu rapor edilmiştir. ³⁹

Mikoplazma enfeksiyonlarının ağır ekonomik kayıplara neden olmasının sebepleri olarak; hastalığın tüm cins ve yaş grubunda görülmesi, viral, bakteriyel hastalıklar ve stres gibi etmenlerin immun sistemi zayıflatması sonucu sıklıkla nükslerin oluşması, koruyucu ve tedavi edici girişimlere karşı yeterli cevap vermemeleri gösterilmektedir. ^{1,14,20,22}

İspanya, Fransa, Almanya, Danimarka, İsviçre, İsrail ve İngiltere gibi ülkelerde yapılan araştırmalarda sığırlarda solunum sistemi hastalıklarının ortalama %25-33 oranında *M. bovis* tarafından oluşturulduğu bildirilmektedir. ^{11,15} Kanada,⁴⁰ İsviçre ⁴¹ ve Belçika⁴² gibi ülkelerde ise bu oranın % 0-67 arasında olduğuna dair veriler de rapor

edilmiştir.^{12,25} Bununla birlikte ülkemizde sığır pnömonileri üzerinde *M. bovis*' in ne kadar etkin olduğuna dair yapılan araştırmaların az olduğu dikkat çekmektedir ^{6-9,43}

Yapılan bu çalışma ile PZR, immunohistokimya ve immunfloresan gibi güvenilir ve güncel tanı metotları kullanılarak, *M. bovis*' in sığırlarda varlığının ve yaygınlığının ortaya konması, etken pozitif akciğer örneklerinin makroskopik ve histopatolojik olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Pnömonili sığır akciğerlerinde gözlenen lezyonların patolojik incelemelerini konu edinen ayrıntılı çalışmalarda, organın morfolojisi ve fonksiyonları hakkında kısa bir bilgi verildikten sonra, etiyoloji ve görülen patolojik değişikliklerin incelenmesi yaygın uygulanan bir yaklaşım olduğu görülmektedir.^{14,22}

2.1. Solunum Sistemi

Solunum sistemi, genel anlamda canlının yaşadığı ortamdaki havayı kapillar damarlarda bulunan kan ile çok yakın temasa getiren, bu şekilde oksijen ve karbondioksit alışverişini sağlayan bir kanallar sistemi olarak tanımlanmaktadır.^{14,22,44} Solunum sistemi anatomik olarak üst ve alt solunum yolları olmak üzere iki kısımda incelenir. Üst solunum yolları burundan başlayarak akciğerlerde bulunan terminal bronşiyollerin dahil olduğu kısımları içerir. Alt solunum yolları ise respiratorik bronşiyollerden oluşan ve alveollerinde dahil olduğu alanları kapsar.^{22,44} Göğüs boşluğunda yer alan akciğerler sağ ve sol olmak üzere iki ana loptan meydana gelir. Bu iki lobu mediastinum ve kalp birbirinden ayırmaktadır. Akciğerler elastik ve hafif süngerimsi bir yapıda, rengi ise içerdiği kan miktarına ve hayvanın yaşına göre açık kırmızıdan gülgüni pembeye kadar değişiklik göstermektedir.^{44,45,46} Dış yüzü plöra olarak adlandırılan parlak seröz bir zarla örtülüdür.^{21,22} Akciğerlerin anatomik olarak bir tabanı (basis pulmonalis), iki kenarı (margo dorsalis obtutus, margo acutus), bir tepesi (apex pulmonalis) ve dört yüzü (fascies costalis, fascies medialis, fascies diaphragmatica ve fascies interlobares) vardır. Sığırdaki akciğerin sağ lobu üç parça halindedir. Bu loplar lobus cranialis, lobus medius ve lobus caudalis'tir. Lobus cranialis bir yarık ile pars cranialis ve pars caudalis diye iki loba ayrılır. Normal olarak sağ akciğerde var olan lobus accessorius' un katılımıyla sığırın sağ akciğeri beş loptan

meydana gelmektedir. Sol akciğer ise fissura interlobaris ile lobus cranialis ve lobus caudalis diye iki loba ayrılır. Lobus cranialis de yine bir yarık vasıtasıyla pars cranialis ve pars caudalis olarak adlandırılmış iki loba daha ayrılır.⁴⁵

Akciğerin damar ağı toplam dört adet ana damarın kollarından meydana gelmektedir. Bunlar; Truncus pulmonalis, Vena pulmonales, Ramus bronchialis ve Vena bronchialis'tir. Truncus pulmonalis'de kendi arasında iki bölüme ayrılmaktadır. Bunlar; Arteria pulmonalis dextra ve Arteria pulmonalis sinistra'dır. ⁴⁷ V. pulmonalis ise akciğerlerdeki oksijenle yüklü kanı kalbin sol atriumuna taşıyan damarlardır. ⁴⁴

Solunum sisteminin üst yapılarından olan trake dallanarak bronşlara, bronşiyollere, terminal ve respiratorik bronşiyollere ayrılır. Terminal respiratorik bronşiyoller ise alveoler kanallar ve alveolar keselere açılarak alveollerde sonlanırlar. ^{14,44,48} Trake ve bronşlar hyalin kıkırdak halkaya sahiptirler ve bu kıkırdak halkalar trake ve bronşları deformasyonlara ve tıkanmalara karşı korurlar. Bronşiyol duvarlarında ise hava yollarının kollabe olmasını önleyen kıkırdak halkalar bulunmaz ve bez yapısı da ortadan kalkar. Kıkırdak halkalar yerlerini bronşiyol duvarında ince bağ dokusu şeklinde interalveoler septumlara bırakırlar ve bronşiyollerde bu yapı hava yollarını korur. ^{14,21,22,48}

Trake ve bronşlar mukozası yalancı çok katlı silyumlu silindirik epitel ile döşenmiştir. ^{21,22,48} Trake, bronş ve bronşiyollerin lamina propriya ve submukozalarında bronşlarla ilişkili lenfoid doku (BALT) bulunur. Bu dokuyu ise B ve T lenfositler oluşturur. ^{14,44}

Akciğerin gaz değişim ünitesi olan bir asinus yapısı respiratorik bronşiyollerin bütün kolları ile alveol duktuslarını, alveol keselerini ve ilgili kan damarlarını kapsamaktadır. Sığır, at ve koyunlarda bağ dokusu septumları ile çevrilmiş olan asinuslar,

primer lobülüs denilen gruplar oluştururlar ve bunlar makroskopik olarak görülebilirler.^{44,48}

Alveol parankiminin önemli hücrelerini tip I ve tip II pnömositler oluşturur. Alveol yüzeyinin % 95'ini ve sayı olarak da hücrelerin % 60'ını tip I hücreler oluşturur.⁴⁸ Tip I pnömositlerin sitoplazmaları 0.2-0.5 nanometre büyüklüğünde gaz değişimine imkan verir.⁴⁴ Bu hücreler solunan hava ve kan yoluyla gelen zararlı etkenlere karşı oldukça duyarlıdır.²² Bu epitel hücreleri arasındaki interalveoler Kohn delikleri alveoller arası ventilasyonu sağlar.⁴⁴ Tip II pnömosit kübik şekillidir ve interalveoler septumları döşerler. Sitoplazmalarında karakteristik ozmiyofilik lamellar inklüzyon bulunduran bu hücrelerin birincil görevleri pulmoner surfaktan sentezlemektir.^{14,21,44} Bu lipit tabiatındaki madde alveoller içerisine salgılanır ve alveollerin yüzey gerilimlerini değiştirerek ekspirasyon sırasında alveollerin tamamen kollabe olmalarını engeller.²² Sayı olarak alveoler hücrelerin %40'ını bu hücreler oluştursa da yüzey olarak az bir yer kaplarlar. Tip I pnömositlerin doğurucusu olan bu hücreler, tip I'ler yıkımlandıklarında hemen sonra tam rejenerasyonla tip I' e dönüşerek alveol tip I hücrelerinin yerini alırlar. Böylece tip II pnömositler kök hücre görevi de yapmaktadırlar.^{14,22,44} Bu olay alveoler membranda hücrelerin artmasıyla kendini belli eder ve alveoler epitelizasyon, alveoler fütalizasyon veya alveoler epitel hiperplazisi olarak isimlendirilir.^{14,21,22}

Akciğerin makrofajlarını; alveoler makrofajlar, intersitisyel makrofajlar, pulmoner intravasküler makrofajlar ile dentritik hücreler oluşturmaktadır. Fizyolojik koşullarda alveol makrofajları kan monositlerinden gelişir ve daha sonra intersitisyel boşlukta olgunlaşarak akciğere göç ederler. Yangısal olaylarda ise direkt olarak kan monositleri alveollere geçerek alveol makrofajlarını oluştururlar.^{14,21} Solunum sisteminin solunan havanın ısı ve neminin ayarlanması, koku alma, ses çıkarma, asit-baz

dengesinin düzenlenmesi, kan depolama, embolilerin süzülmesi ve biyoaktif maddeleri metabolize etmek gibi görevleri de vardır.^{21,22,44}

2.2.Pnömoniler

Akciğer alveoler parankiminin yangısına genel olarak pnömoni denir.^{14,21,22} Bununla birlikte akciğerde gelişen kronik proliferatif ya da alerjik yangılar için pnömonitis, alveollerin akut eksudatif yangıları için ise alveolitis ifadeleri kullanılmaktadır.^{14,21} Solunum sistemi hastalıklarına enfeksiyöz (bakteriler, mantarlar, mikoplazmalar, virüsler, parazitler) etkenler veya enfeksiyöz olmayan (ahır gazları, irrite edici gazlar vb.) maddeler sebep olmaktadır.^{2,10,14,21,22} Solunum sistemindeki enfeksiyonlar zedelenmenin yeri, etkenin giriş kapısı, etkenin konsantrasyonu, dozu, tabiatı ve etkilenen dokunun duyarlılığı gibi faktörlere bağlı olarak gelişir. Bu faktörler arasında giriş kapısı en önemli rolü oynar.^{14,21,22} Akciğerlere kanla gelen etkenler akciğer intersitisyumu ve interalveoler septumları etkiler. Aerojen enfeksiyon ise genellikle solunum yollarının zedelenmesinden kaynaklanır.^{14,22} Solunum sisteminin alt bölümleri daha çok küçük partiküllerden, daha az eriyebilir gazlardan ve alveol ile bronş epitellerine affinite gösteren enfeksiyöz ajanlardan etkilenir. Bunun nedeni üst solunum yollarında bulunan özel savunma sistemleridir.¹⁴ Solunum sistemi zedelenmelerinin daha az rastlanan diğer tipleri travmatik veya komşu organ ya da dokulardaki lezyonların akciğerlere yayılması yoluyla olur. Travmatik sebeplerin arasında yabancı cisimlerin perforasyonları önemlidir.^{14,22}

Pnömoniler sürelerine göre akut, subakut ya da kronik olarak sınıflandırılabilirdiği gibi etiyolojilerine göre de gruplandırılabilirler.¹⁴ Günümüzde akciğer yangıları eksudatın karakterine göre ve doku reaksiyonlarına göre iki ana başlık altında incelenir. Eksudatif pnömoniler alveolleri dolduran eksudatın özelliklerine göre;

kataral, fibrinli, irinli ve hemorajik olarak tanımlanırlar.²¹ Proliferatif pnömoniler ise tip II hücrelerinde, fibroblastlarda ve makrofajlarda hücre artışı ile karakterizedir.^{12,14,22,29} Diğer bir yaklaşım ise pnömonileri akciğerdeki yayılımına ve lokalizasyonuna göre sınıflandırmadır. Bu sınıflandırmada ise bronkopnömoni (lobuler), lobar pnömoni ve intersitisyel pnömoni olmak üzere üç ana kategori vardır.^{14,21}

2.2.1. Bronkopnömoni

Evcil hayvanlarda en çok rastlanan pnömoni tipi olup bakteriler tarafından oluşturulur.^{14,21,22} Bu tip pnömonilerde lezyonlar genellikle kranial loplarda görülür. Yangı bronşiyoller ve alveollerin sınırında başlar ve yukarı doğru bronşlara ayrıca aşağı doğru alveoler parankime yayılım gösterir. Bu tarz pnömonilerde eksudat bronş, bronşiyol ve alveol lümeninde birikim gösterir.^{6,10,12,14,21} Akciğer yangılarında biriken eksudat veya hücre infiltrasyonları bu organın hava tutma kapasitesini azaltır. Yangısal olaylar odaklar halinde yayılmış ise lobuler pnömoniden söz edilir. Bu lobuler odaklar birleşerek genişler ve lobun tamamını veya akciğerlerin önemli bir kısmını kapsayan geniş pömoni alanları (bronkopnömoni-lober pnömoni) oluştururlar. Çünkü lobuler bir yayılma gösteren değişiklikler bronş ve bronşiyollerin yangılarından kaynaklanır. Bu şekilde endobronşiyal yayılma sonucu bronkopnömoni tablosu şekillenir.^{14,21,22} Bronkopnömoniler eksudatın karakterine göre kataral, irinli ve fibrinli pnömoniler olarak ayırt edilir. Histopatolojik değerlendirmelerde kataral-irinli, irinli-nekrotik ya da fibrinli-nekrotik tarzda pnömoni tabloları ile karşılaşılabılır.^{4,10,12}

2.2.1.1. İrinli - Nekrotik Bronkopnömoniler

Bronş, bronşiyol ve alveollerde purulent ya da mukopurulent eksudatın varlığı ile karakterize olan pnömoni tipidir. Sebepleri genellikle bakteriyel enfeksiyonlar olup,^{10,14,21,22} *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp.,

Corynebacterium pyogenes, *Escherichia coli* ve *Bordetella bronchiseptica* en çok izole edilen bakteri türleri olarak bildirilmektedir. Hastalık etkenleri akciğere genellikle kan yoluyla gelir. Endarteritis, metritis ve omphaloflebitis gibi primer yangı odaklarından sağ kalp yoluyla akciğerlere ulaşırlar. Bu tip pnömoniler bazen primer, bazen viral enfeksiyondan sonra sekonder komplikasyon şeklinde de gelişir.^{21,22,49} Makroskopik olarak akciğerin kranioventral loblarında düzensiz yayılmış, yaygın hiperemik odaklar halinde göze çarpan lezyonların bulunduğu dikkati çeker. Ayrıca akciğerin kesit yüzünde özellikle bronşlardan bol miktarda eksudat sızdığı görülür.^{12,14,21,29} Hastalığın başlangıcı, lümenlerinde şiddetli nötrofil lökosit eksudasyonları ile karakterize bronşitis ve bronşiolitis tablosudur.^{8,14} Yangı endobronşioler ve peribronşioler olarak alveoler parankime yayılır.^{8,21,22} Alveollerde seröz bir eksudasyon ile yayılan bu yangı kısa zamanda nekrozlaşır ve irinleşir.^{8,11,22,29} Akciğerde zamanla yaygın irinli odaklar halinde alanlar şekillenir. Bu odaklar arasında normal atelektatik veya amfizematöz akciğer dokusu alanları da bulunabilir.^{4,6,8,14,22} Şiddetli olgularda bronş ve bronşiyolleri döşeyen epitel hücreleri ile alveoler epitel hücrelerinin nekroze olup lümene dökülmüş olduğu görülür.^{6,8,21,22} Hastalıkta plöra genellikle etkilenmez.¹⁴ İrinli-nekrotik bronkopnömoniler tamamen iyileşebilirler. Ancak apseleşme, atalektazi, fibrözleşme ve saprofit bakterilerin bulunmasıyla gangren tablosu gelişebilir.^{21,22}

2.2.1.2. Fibrinli Bronkopnömoniler

Bu tip pnömoniler, eksudatta fibrin bulunması ile karakterize olarak tanınmaktadır.^{6,8,14,22} Etiyolojik olarak *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* gibi bakteriyel etkenler bazen primer bazende viral enfeksiyonları takiben sekonder olarak rol oynarlar.^{8,12,14,15,22} Hastalıklı akciğer loblarının üzerini örten plöra genellikle yangısal değişikliklere katılır ve bir plöropnömoni tablosu vardır.^{14,22} Olguların çoğunda nekroz gelişir.^{4,6,8,50}

Fibrinli pnömonilerde birbirini izleyen yangısal hiperemi, kırmızı hepatizasyon, gri hepatizasyon ve lizis evreleri olmak üzere dört dönem görülür.²² Yangısal hiperemi döneminde hastalıklı akciğer lobları volümünöz ve kıvamı artmış bir halde olup koyu kırmızı renktedir. Kesit yüzünde ise bol miktarda kırmızı-gri renkte eksudat mevcuttur.^{8,14,21,22} İçeriği fibrince zengin olan bu eksudat pıhtılaştığı için akciğerin kesit yüzünden sızması söz konusu değildir.^{8,14} Histopatolojik incelemede akciğer kapillar damarlarının dolgun olduğu dikkati çeker, alveollerde hafif kırmızı renkte homojen veya ince granüllü seröz bir sıvı toplanır. Bu sıvı içerisinde eritrosit, nötrofil lökosit ve dökülmüş epitel hücreleri de bulunabilir.^{4,6,8,12,14} Kırmızı hepatizasyon döneminde kapiller damarlar yine eritrositler ile doludur. Bu sebeple makroskopik olarak etkilenen akciğer lopları kırmızı renkte görünür.²² Hastalıktan etkilenen akciğer loplarında yoğun hücrel infiltrasyon ve fibrin birikimi nedeni ile bu lopların hacminin ve kıvamının artması sonucu karaciğer kıvamını alması durumuna hepatizasyon denir.²¹ Kesit yüzü kırmızı renkte kuru ve kolayca parçalanır. Sığırlarda interlobuler septal doku belirgin bir hal almıştır.^{6,8,12,14,21} Histolojik olarak kapillar damarlarda hipereminin yanı sıra alveollerde yoğun bir fibrin ağı arasında az sayıda eritrosit, nötrofil, lökosit ve dökülmüş epitel hücreleri bulunur. İntersitisyumda lenf damarları genişlemiş ve trombozlar meydana gelmiştir.^{14,22}

Gri hepatizasyon evresinde, hastalıklı akciğer dokusu gri-sarımsı renkte, volümünöz, kuru ve kıvamlıdır. Gri renkli olmasının sebebi, bu evrede lökositlerin artması ve eksudatla dolan alveollerin kapillarlara yaptığı basınç sonucu oluşan iskemidir.^{14,21} Bu bölgelerden alınan doku parçaları bundan önceki devrede olduğu gibi suda batar. Histolojik olarak kapiller damarlar nötrofil lökositlerden oldukça zengindir. Bu nötrofil lökositler zamanla alveol eksudatı içerisine doğru sızarlar ve mevcut fibrin

kitlesini enzimatik olarak eritirler. Kırmızı hepatizasyon evresinde trombozlaşan damarların tekrar açılması da bu devrede gerçekleşir.²²

Evcil hayvanlarda nadir olarak görülen lizis evresinde lökositlerden salınan proteolitik enzimler pnömoni lezyonu görülen alanlardaki eksudatı eritir.¹⁴ Bu evrede akciğerin etkilenen lobu yangısal hiperemi evresinde olduğu gibi koyu kırmızı bir renk alır. Eriyen eksudat kitleleri lenf damarları ve kapiller damarlar vasıtasıyla rezorbe edilir.²² Sağlam kalan alveol epitelleri rejenere olarak etkilenen loplarda yeniden ventilasyonu sağlar.^{14,22} Bu şekilde iyileşme sığırlarda az görülür.²² Evcil hayvanlarda etkilenen akciğer kısımları çoğunlukla organizasyona uğrar. Hiyalin kitleleri haline dönüşmüş olan alveollerdeki eksudat içine, rezorbsiyon amacıyla damarlardan zengin bir granülasyon dokusu üreyerek organizasyon meydana gelir.¹⁴ Hastalıktan etkilenen akciğer lopları küçülür, et rengini ve kıvamını alır. Bu duruma karnifikasyon denir. Granülasyon dokusu daha sonra kollojen ipliklerden zengin bir nedbe dokusu halini alır. Bu duruma da akciğer indurasyonu ya da sklerozu denir.^{14,21}

2.2.1.3. Aspirasyon Pnömonisi

Yabancı maddelerin akciğere aspirasyonu ile oluşan pnömonilerdir.¹⁴ Özellikle farinks felci ve yutkunma güçlükleri ile seyreden Kuduz, Botilusmus gibi hastalıklarda, baş travmaları ve özefagus tıkanmaları gibi durumlarda yabancı cisimlerin ve sıvıların bakterilerle birlikte aspire edilmesi en sık rastlanan durumlardır.^{14,22} Şuur kaybı sırasında meydana gelen kusmalarda mide içeriği aspire edilebilir. Ayrıca üst solunum yolunun irinli veya nekrotik yangılarında eksudatın aspire edilmesi durumlarında da özellikle akciğerlerin kranioventral loblarında irinli-apseli bronkopnömoniler meydana gelir.¹⁴ Bunların yanında hatalı sondalama uygulamalarında verilen ilaçların doğrudan akciğere gönderilmesi sonucunda da bu tip pnömoniler şekillenir. Aspire edilen maddeler öncelikle irinli-ülseratif bronşitis, daha sonra da irinli-apseli gangrenöz pnömoniler

oluştururlar. Bu sırada içleri kirli ve fena kokulu kitleler ile dolu kavernler oluşur. Bunlar bazen göğüs boşluğuna açılırlar ve sonuçta empiyem meydana gelir. Akciğerde gazlı gangren genelde ölümle sonuçlanır.^{14,21,22}

2.2.2. İntersitisyel Pnömoni

İntersitisyel pnömoni; interalveoler septumlarda görülen proliferatif olaylardır.^{14,15,21,22} Bu tip pnömoninin meydana gelmesinde arojen virüs enfeksiyonları önemli rol oynar.^{14,21} Bunun dışında Klamidya, Mikoplazma ve parazitler de intersitisyel pnömoniye sebep olabilir.²² Ayrıca solunan kimyasal maddeler, sindirilen toksin ya da prokürsorleri (L-triptofandan oluşan 3-metil-indol toksikasyonu vb.) bu tip pnömoniye sebep olurlar.^{14,22} Bunların yanında ilaç reaksiyonları, aşırı duyarlılık reaksiyonları, endojen metabolik toksik maddelerin açığa çıkması gibi durumlarında da (üremi, pankreatitis, şok, disemine intravasküler pıhtılaşma) intersitisyel pnömoniler görülebilmektedir.¹⁴ Bu pnömotoksinlerden bazıları klara hücrelerinde bulunan monooksijenaz enzim sistemi tarafından daha toksik olabilen reaktif metabolitlere dönüşmektedir.²² Bu toksikasyonlarda kronik intersitisyel pnömoni görülür. Alveol epitel hücrelerinin proliferasyonu, metaplazisi ve fibroplazi ile karakterizedir.^{12,14,22} Ancak sekonder bakteriyel enfeksiyonlar temeldeki intersitisyel pnömoni tablosunu maskeleyebilirler.²¹

İntersitisyel pnömonilerin makroskopik olarak tanısını koymak oldukça güçtür. Buna karşın kıvamlı ve sönmemiş akciğer bölgeleri dikkati çeker. Kronik olgularda bağ dokusu artışı sebebiyle kalınlaşmış bir intersitisyum, peribronşial düğümçükler ve yaygın amfizem tablosu görülebilir.^{4,12,14} Makroskopik lezyonlar akciğerin tüm loblarında görülebilsede özellikle kaudo-dorsal bölgelerde daha sık rastlanır. Küçük hava yolları ve çevresinde belirgin bir lezyon bulunmaz.²² Lezyonların bu lokalizasyonu

intersitisyel pnömonilerin bronkopnömonilerden ayırt edilmesini sağlar. Enfeksiyöz lobar ve lobuler (bronkopnömoni) pnömoniler kranioventral lobları etkilemektedir.²¹

Histopatolojik olarak; akut dönemde alveollerin lümeni seröz-fibrinli bir eksudatla doludur. Alveol duvarları da ödemli ve konjesyonedir. Bu dönemde alveoler lümende biriken fibrin ve diğer serum proteinleri ile hücrel artıklar yoğunlaşarak hiyalin membranlar oluştururlar. Yangısal infiltrasyonlar lenfosit, histiyosit ve plazma hücrelerinden ibarettir. Nötrofil lökositler tek tük görülür.^{12,14,22} Peribronşial formda bronşların çevresinde kalınlaşmış hücre manşetleri dikkat çeker bu görünüm peribroşiyoler lenfoid hücre hiperplazisi olarak adlandırılır.^{4,8,12,14,21,22,29}

Eksojen ve endojen (metabolik) toksik maddeler ya da enfeksiyöz etkenler özellikle alveol duvarının kapillar endotel hücrelerinde ve alveol duvarını döşeyen epitel hücrelerinde akut zedelenme-yıkım oluştururlar. Akut zedelenmeye öncelikli olarak alveol tip I hücreleri daha hassastır. Çünkü bu hücrelerin onarım özelliği zayıf, rejenerasyon kapasitesi de yetersizdir. Alveol duvarındaki tip II epitel hücreleri sağlam bazal membran üzerinde proliferasyon olarak dejenere olmuş tip I epitel hücrelerinin yerini alır.^{21,44} Bu olay, yani alveol tip II epitel hücrelerinin proliferasyonu, intersitisyel pnömonilerin akut eksudatif devreden proliferatif devreye geçtiğini gösterir. Alveollerin bu şekilde tip II epitel (kübik) hücreleriyle döşenmesi epitelizasyon ya da fütalizasyon olarak tanımlanır ve subakut-kronik devrede görülen bir özelliktir.^{14,22}

2.2.3. Granülomatöz Pnömoni

Granülomatöz ifadesi akciğerde tipik granülom varlığının anatomik olarak görünümünün tanımlanması için kullanılmaktadır.¹⁴ Evcil hayvanlarda granülomatöz pnömonilere normal fagositoz yoluyla elimine edilemeyen organizmalar sebep olmaktadır.^{14,21,22} Genel bir kural olarak etkenin fagositoza dayanıklı ve dokuda uzun süre kalabilen özellikte olması gerekmektedir.^{14,21,22} Bu özelliği taşıyan başta gelen

sebepler arasında mantar enfeksiyonları *Cryptococcosis*, *Actinobacillus* spp., *Actinomyces* spp., *Nocardia* spp., *Histoplasmosis* ve *Mycobacterium* spp. sayılabilir.²² Ayrıca, aspire edilen çözünmeyen partiküller de granümatöz pnömoniye neden olabilmektedir.²¹ Meydana gelecek yangının daha çok eksudatif ya da produktif karakterde olması hastalanan hayvan türüne, vücudun immünolojik reaksiyon verebilme durumuna ve etkenin patojenitesine bağlıdır. ^{14,17,21,22}

Granümatöz pnömonilerde, akciğerlerde farklı büyüklük ve yerleşim gösteren, kazeöz veya kazeöz olmayan granülomlara rastlanılmaktadır. Bu granülolara kesit yapıldığında çevreleri soluk beyaz renkte bağ doku kuşağı ile çevrili olan nekroz alanlarıyla karşılaşılır.^{8,14,21,50} Bazen bu nekroz alanlarının merkezinde yer yer kalsifikasyonlara da rastlanılmaktadır. ^{4,14, 22,29}

Histopatolojik olarak geniş nekroz alanı, bu alanı çevreleyen bölgede makrofajlar, epitelooid hücreler, dev hücreleri, lenfosit ve plazma hücrelerinin infiltre olduğu yangısal hücre kuşağı mevcuttur. Tüm bu yapı fibroz bağ dokudan oluşan bir kapsülle sınırlandırılmış haldedir. ^{8,10,14,21,23}

2.3. Plöra yangıları

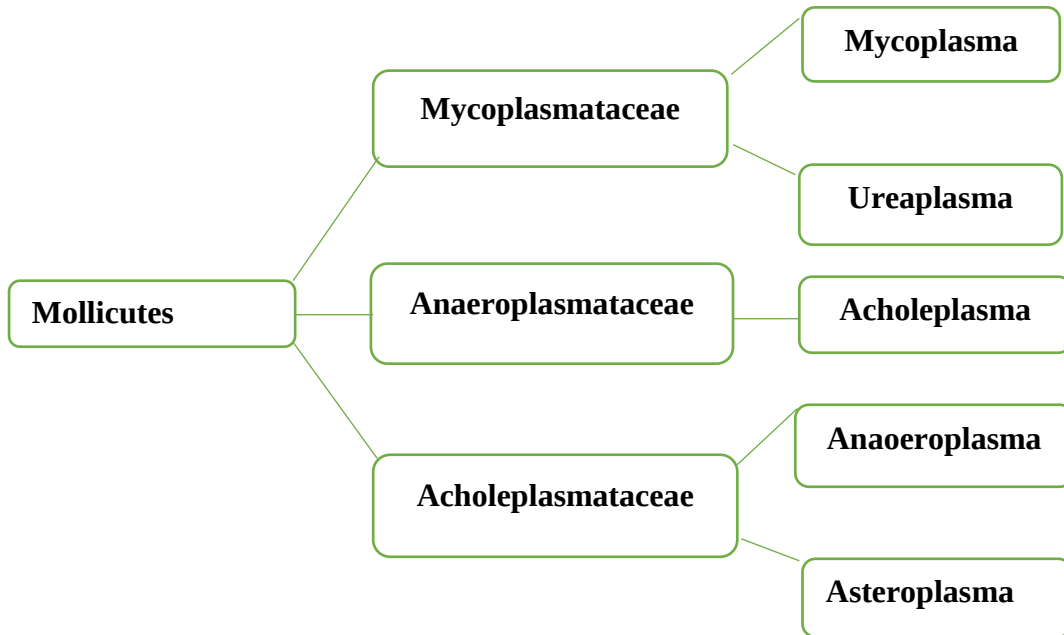
Plöra yangıları (plöritis) genellikle komşu organlardaki (akciğer, kalp ve kalp kesesi) yangıların plöraya geçmesiyle meydana gelir. Yangı yersel ya da yaygındır. Tabiatına göre seröz purulent, fibrinöz veya gangrenöz tabiattadır. Plöritisler tamamen iyileşebilir ya da uzun sürdüğü hallerde kalp ve akciğer hareketlerini engelleyen yapışmalara ve hatta akciğerin kollaps indurasyonuna sebep olurlar. ^{14,21}

Plöra boşluğunun seröz zarlarında enfeksiyöz ve sepsisemik hastalıkların seyri sırasında diapedezis kanamaları görülür. Uzun süre göğüs boşluğunda kalan eksudatlar akciğerde kompresyon atelektazisine ve yapışmalara sebep olan kronik plöritise yol açar. ^{21,22}

2.4. *Mycoplasma bovis*

2.4.1. Tarihçe ve Taksonomi

Mikoplazma ismi ilk olarak Frank tarafından 1889'da bu etkenlerin mantarlara olan morfolojik benzerliklerinden dolayı (mykes-fungus: plasma formunda) kullanılmıştır. Daha sonra Novak 1973 yılında bu etkenleri sığırlarda bulaşıcı plöropnömoni etkeni olarak tanımlamıştır.²⁷ Günümüzde hücre duvarları olmamaları nedeniyle Mollicutes grubu içinde 100 kadar Mikoplazma türü tanımlanmıştır.^{17,18,51} Hücre duvarı yerine lipid, karbonhidrat ve proteinlerden oluşan unit membrana sahiptirler.^{8,17,51} Mikoplazmalar en küçük serbest yaşayan prokaryotlardır. Sporsuz ve kapsülsüz olup hareket kabiliyetleri yoktur. Gram (-) olmalarına karşın gram boyama yöntemi ile boyanmayıp, Castenada veya Giemsa yöntemiyle boyanırlar. Bu mikroorganizmalar aerobik ve anaerobik ortamlarda ürerler.^{2,17,18,22,51,52}



Şekil.2.1. Mollicutes sınıfının taksonomisi.(Quinn PJ, Markey BK ⁵²)

2.4.2. Epidemiyoloji

Klinik olarak hastalık belirtisi göstermeyen hayvanların etkeni ağız, burun, konjunktiva, bağırsak ve genital kanal mukozasında taşıyabildikleri bildirilmiştir.^{8,17,18,37,51} Hayvanlar *M. bovis* enfeksiyonuna kontamine ortamda bulunmakla ya da enfeksiyona sahip hayvanlarla doğrudan temas sonrası yakalanırlar.^{15,17,18,51}

M. bovis solunum sisteminde bronkoalveolar bölgeye yerleşir ve damlacık enfeksiyonu tarzında çevreye yayılır.^{8,18,22} Solunum sisteminde enfeksiyonun gelişmesinden sonraki 24 saat içerisinde hasta hayvanlar burun akıntılarıyla etkeni hızlı şekilde çevreye yaymaya başlarlar.^{15,53,54} Klinik herhangi bir belirti göstermeyen inekler taşıdıkları etkeni sütleriyle yayarlar ve süt emen buzağılar enfeksiyona yakalanabilirler.⁵⁴⁻⁵⁶

2.4.3. Patogenez

Etkenin enfekte hayvanların süt, kolostrum, ekstret ve sekretleriyle yayıldığı bildirilmiş olmasına ve hastalık hakkında yapılan çalışmalara rağmen patogenezis hakkında tam açıklığa kavuşturulamamış hususlar bulunmaktadır.^{15,17,18,22,51}

Hastalığın akut devresinde ölen hayvanların akciğerleri normal lobuluslar ile birlikte kırmızı ve gri konsolidasyon sahaları ile nekroz alanlarının birbirine karıştığı tipik alacalı mermer görünümündedir. Akciğerlerde mermer görünümü, interlobüler septum ve damarlar ile hava yollarının çevresindeki interstisyumun genişlemesi ve fibrinli eksudatın çevresindeki kalın fibröz bandın etkisiyle belirgin hale gelir. *M. bovis*, akciğerlerde seröz-fibrinli, fibrinli-purulent bronkopnömoniye veya intersitisyel pnömoniye sebep olmaktadır.^{14,15,17,29} Bununla birlikte yapılan araştırmalarda *M. bovis* ' e bağlı irinli-nekrotik pnömoni olgularıda bildirilmiştir.^{4,6,8,11,12,22,29} Nekroz oluşumunun

patogenezi tam olarak açıklanmamakla birlikte çeşitli hipotezler ileri sürülmüştür. Schott⁴⁹ ve arkadaşlarının yaptıkları immunohistokimyasal yöntemlerle oksidatif stres ve nitrativ stres markerleri araştırılarak yapılan bir çalışmada *M. bovis*'in dokularda H₂O₂ (Hidrojen peroksit) üretimini arttırarak bu stres faktörlerinin oluşmasını sağladığı ve bu yolla hücrelerde nekroza yol açtığı dolayısıyla irinli - nekrotik bronkopnömoniye sebep olduğu bildirilmişlerdir. Yine Wiggins ve ark.⁵⁷ deneysel bir çalışmada *M. bovis* enfeksiyonunun hücrel metabolizmayı yavaşlattığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, nötrofil degranülasyonunu ve ROS (Reaktif Oksijen türleri) faktörlerinin azalmasına sebep olarak lökositlerin çoğalmasını azalttığı^{22,57} görülmüş ve bundan dolayı *M. bovis* enfeksiyonlarının kronik seyirli olduğu ortaya konmuştur.⁵⁷ Akciğer dokusunda yapılan deneysel çalışmalarda *M. bovis* etkenlerinin alveoler makrofajlar gibi fagositik hücrelerin sitoplazmalarına yerleştiği burada haftalarca kalıp, makrofajların yüzeyine tutunabildiği ve burada çoğalabildiği tespit edilmiştir.^{11,22} Bu durum sayesinde etkenlerin immun sistemden kaçmayı başardığı tespit edilen söz konusu çalışmada fagositik hücrelerin *M. bovis* ile enfekte olan akciğer dokusunda bu etkenleri elemine edecek kapasiteye sahip olmadığı rapor edilmiştir.¹¹ Ayrıca etkenlerin patojenitesinin membran proteinlerinin özelliklerine bağlı olduğu düşünülmüş ve bununla ilişkilendirilmiştir. Membran proteinlerindeki genomik uyumluluk özelliğinin bu etkenlerin kronik enfeksiyonlara sebep olabilmesinin altında yatan en önemli nedenler arasında olduğu bildirilmiştir.^{22,29,58}

Histopatolojik olarak alveolar alanlar başlıca lenföfoliküler birikim ve lümendeki eksudatla oluşan bronşiyoler tıkanmadan dolayı atelektaziktir. Ayrıca, peribronşiyoler lenfoid hiperplazi ve mononükleer yagısal hücre infiltrasyonlarıyla birlikte yaygın nekrotik lezyonlara da rastlanır. Nekrotik dokuda *M. bovis*'in varlığı

immunohistokimyasal olarak saptanmaktadır. İmmunpozitifliklerin, bronşiyol ve terminal bronşiyollerin epitelyal yüzlerinde rastlandığı rapor edilmiştir.^{8,12,14, 17,21,29,37}

M. bovis' in normal genital kanal florasında mevcut olduğu, ayrıca bu etkenlerin deneysel ya da doğal enfeksiyon yoluyla oluşan kronik endometritis, irinli salpingitis, infertilite ve abortlara neden olduğu bildirilmiştir.³⁷

Sığırlarda *M. bovis*'e bağlı otitis media olguları bildirilmektedir.^{1,12,29,59} Otitis medianın nasıl geliştiğinin patogenezi hakkında kontamine süttten şüphelenilmesine rağmen net bir bilgi edinilmemiş ve kanıtlanamamıştır. Ancak yapılan deneysel bir çalışmada *M. bovis* oral yolla inokule edilmiş ve tonsillerde yoğun etken kolonizasyonlarına rastlanmıştır. Belirtilen çalışmada üst solunum yolları enfeksiyonlarının ve otitis media'nın bu şekilde geliştiği şeklinde bilgiler sunulmuştur.⁵⁹

M. bovis'e bağlı mastitisler, genel olarak kötü bakım besleme ve hijyenik olmayan ahır şartlarının bulunduğu büyük sürülerde ve çoğunlukla etkenin meme başından girmesi sonrasında meydana geldiği ifade edilmiştir.^{8,15,39,53}

2.4.4. Klinik bulgular

M. bovis enfeksiyonlarında yüksek ateş, iştahsızlık, hızlı kilo kaybı, depresyon, hiperventilasyon, dispne, burun akıntısı, öksürük gibi çeşitli semptomlar görülebilmektedir. Ancak görülen semptomlar spesifik değildir.^{20,60,61}

2.4.5. Tanı

M. bovis enfeksiyonunun tanısı için; burun, göz, genital kanal ve kulaktan svap, taze süt, sinoviyal sıvı, bronkoalveoler lavaj sıvısı örnek olarak alınarak etkenin izolasyonu yoluna gidilebilmektedir. Mikoplazmaların besi yerlerinde koloni yapısının 'sahanda yumurta' şeklinde olduğu görülmektedir.^{8,9,54}

Lezyonlu akciğer dokusundan, lenf yumrularından ve plöra sıvısından etkeni izole etmek mümkündür.⁴² Ayrıca etkenin ELISA, SDS-PAGE, Western Blot, PZR ve immunohistokimya gibi yöntemlerle ortaya konduğu bildirilmiştir.^{2,6,9,12,43,55,59}

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışma materyali

Çalışma materyalini oluşturan akciğer örnekleri 2014 yılı içerisinde Erzurum ilinde faaliyet gösteren mezbahalardan sağlandı.

3.2. Makroskopik İnceleme

Hayvanların yaş, cinsiyet, ırk özelliklerine ait bilgileri ve lezyon rastlanan lopların anatomik lokalizasyonunu işlemek için akciğer şeması içeren formlar hazırlandı. Kesim öncesi ve sonrası hayvanlara ait bilgiler bu formlara işlendi. Çalışmada planlanan 100 pnömonili akciğer örneğini elde etmek için makroskopik olarak renk, kıvam ve kesit yüzeyi bakımından 836 sığır akciğeri incelendi.

Makroskopik incelemede, pnömoni teşhisi konulan 100 akciğerin her birinden alınan doku örneklerinin bir kısmı PZR ile teşhis için -20 °C' ye, bir kısmı ise immunohistokimyasal, immunfloresan yöntemle teşhis ve histopatolojik incelemeler için %10 luk tamponlu formalin solüsyonuna alındı.

3.3. Dokuların İşlenmesi

Mezbahalardan kesim sonrası makroskopik olarak muayene edilerek alınan akciğer örnekleri % 10'luk tamponlu formalin solüsyonu içerisinde 1 gün süre ile tespit olması için bekletildi. Daha sonra doku örneklerinin küçültme işlemleri yapılarak, kasetlere alındı. Tespit sonrası dokular en az bir gece akan çeşme suyunda yıkandı. Sonra dokuların dehidrasyon ve şeffaflaştırma işlemleri için otomatik takip cihazı (Shandon Citadel 2000, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak sırasıyla %70, %80, %90 ve %100'lük alkolde 2' şer saat, yine ksilol solüsyonlarında birer saat ve parafinde (56 °C) 2'şer saat bekletildikten sonra bloklama işlemi yapıldı. Bloklanan dokulardan

mikrotomda (Leica RM 2255, Almanya) 5 mikronluk kesitler alındı. Kesitler normal ve polilizinli lamlara alındı.⁶²

3.4. Mikroskopik İncelemeler

3.4.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi

Lamlar 1 saat süre ile 56 °C etüvde parafinin erimesi için bekletildi. Bu işlem sonunda etüvden çıkarılarak şalelerde sırasıyla 5 dakika. ksilol I' de, 5 dk. ksilol II' de, 3'er dk. %100, %96, %80, %70, %60 alkolde, sonra 5 dk. distile suda bekletilerek Mayer's Hematoksilen (Merck) solüsyonuna batırıldı ve 3 dk. bekletildi. Çeşme suyu ve asit alkol solüsyonu kullanılarak fazla boya deklöre edildi. Daha sonra Eozin (Riedel Haen) solüsyonuna alındı 3 dk. bekletildikten sonra sırasıyla %60, %70, %80, %96, %100 lük alkollerden 3'er dk. geçirilerek 10 dk. ksilole alındı ve entellan damlatılarak, lamelle kapatıldı.⁶² H-E ile boyanan preparatlar Olympus BX51 (DP72 kamera ataçmanlı) marka ışık mikroskopunda incelendi. Pnömoniler histopatolojik olarak intersitisyel pnömoni, bronkointersitisyel pnömoni, irinli – nekrotik pnömoni, fibrinli – nekrotik pnömoni ve granüloamatöz pnömoni şeklinde sınıflandırıldı.²²

3.4.2. PAS (Periodic Acid Shiff) Boyama Yöntemi

Kesitler 1 saat süre ile 56 °C etüvde bekletildi. Daha sonra 5 dk. ksilol I' de, 5 dk. ksilol II' de, 3'er dk. %100, %96, %80, %70, %60 alkolde sonra 5 dk. distile suda bekletilerek boyamaya hazır hale getirildi. PAS boyama ADR marka tanı kiti kullanılarak yapıldı (Cat No: 5001010). Boyama yöntemi; Periyodik asit çözeltisi lamların üzerinin kaplayacak şekilde damlatıldı ve 5 dk. süre ile bekletildi ve süre sonunda distile su ile lamlar yıkandı. Schiff reaktif solüsyonu lamlara damlatılarak 15 dk. süre ile bekletildi ve akan çeşme suyunda 5 dk. süre ile yıkandı. Hematoksilen (Gill) solüsyonu ile 90 saniye zıt boyama yapılarak lamlar tekrar akan musluk suyunda

yıkandı. Bu işlemler sonrasında sırasıyla %60, %70, %80, %96, %100'lük alkol serilerinden geçirilen lamalar, 10 dk. ksilole alındı ve entallen yardımıyla lamelle kaplandı.

3.4.3. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi

Dehidrasyon, şeffaflandırma ve parafinizasyon işlemlerinin ardından parafin bloklardan 4-5 mikron kalınlığında kesitler alınarak polilizinli lamalar üzerine yerleştirildi. Parafinin eritilerek uzaklaştırılması amacıyla lamalar preparat taşıma aparatına alındı ve 56°C'de 1 saat etüvde bekletildi. İmmunohistokimyasal boyama Expose Kit (Abcam: ab80436, İngiltere) üretici firmanın önerdiği şekilde yapıldı. Bu amaçla;

- 1- Ksilolde (3 defa) 15 er dk.
- 2- %100 etanol (2 defa) 5 er dk.
- 3- %96 etanol (1-2 defa) 5 er dk.
- 4- %90 etanol (1 defa) 5 dk.
- 5- %80 etanol (1 defa) 5 dk.
- 6- %70 etanol (1 defa) 5 dk.
- 7-Phosphate buffer solution (PBS) ile yıkama 5 dk.
- 8- Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla %3 lük hidrojen peroksit (300 ml distile su + 9ml H₂O₂) solüsyonunda 10 dk. bekletildi.
- 9- Antijen retrival aşaması için sodyum sitrat solüsyonu (pH = 6.0) ile mikrodalga fırında 15 dakika (600 watt) kaynamaya bırakıldı.
- 10- Solüsyondan çıkarmadan oda ısısında soğuması için 15 dk. bekletildi ve süre sonunda PBS ile yıkandı.

- 11- Protein bloktan (Abcam: ab80436) her lam üzerine dokuyu kapatacak oranda damlatıldı ve 30-60 dakika nemlendirilmiş kap içerisinde bekletildi. (Non spesifik antikor bağlanmasını bloke etmek için)
- 12- 1\100 oranında sulandırılan primer antikordan (Anti-tavşan *M. bovis* poliklonal antikor-Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü) her bir lam üzerine mikropipet kullanarak 100 µl eklendi, 1 saat 37°C etüvde nemlendirilmiş kap içerisinde inkübe edildi.
- 13- Etüvden çıkarılan preparatlara PBS ile 3 defa 5'er dk. süreyle yıkama işlemi uygulandı.
- 14- Sekonder antikordan (komplement) her doku üzerine 1-2 damla eklendi ve 20 dk. oda ısısında nemlendirilmiş kapta inkübe edildi.
- 15- Bu süre sonunda PBS ile 3 defa 5'er dk. süreyle yıkandı.
- 16- HRP konjugat her bir dokuya 1-2 damla eklendi ve 30 dk. oda ısısında nemlendirilmiş kapta inkübe edildi.
- 17- PBS ile 3 defa 5'er dk. süreyle yıkandı
- 18- Kromojen olarak 3-3' Diaminobenzidine (DAB) kullanıldı.
- 19- Distile su ile yıkandı.
- 20- Hematoksilen (Mayer's) ile 15-20 saniye zıt boyama uygulandı.
- 21- Çeşme suyu hematoksilenin fazlası uzaklaşınca kadar yıkandı.
- 22- Bu işlemden sonra sırasıyla; 3'er dk. %80 etanol, %96 etanol, %100 etanol ve ksilolde bekletilerek lamalar entallen yardımıyla lamelle kapatıldı.

3.4.4. İmmüfloresans Boyama Yöntemi

Dehidrasyon, şeffaflandırma ve parafinizasyon işlemlerinin ardından parafin bloklardan 5 mikronluk kesitler alınarak polilizinli lamalar üzerine yerleştirildi. Lamalar 56°C'de 30-60 dk. etüvde bekletildi. Etüvden çıkarılan preparatlar sırasıyla;

- 1- Ksilolde 3 defa 15 er dk.
- 2- %100 etanol (2 defa) 5 er dk.
- 3- %96 etanol (1-2 defa) 5 er dk.
- 4- %80 etanol (1 defa) 5 dk.
- 5- %70 etanol (1 defa) 5 dk.
- 6-PBS ile yıkama 5 dk. süreyle uygulandı.
- 7- Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla %3 lük hidrojen peroksit (300 ml distile su + 9ml H₂O₂) solüsyonunda 10 dk. bekletildi.
- 8- Antijen retrieval aşaması için sodyum sitrat solüsyonu (pH = 6,0) ile mikrodalga fırında 15 dk. (600 watt) kaynamaya bırakıldı.
- 9- Solüsyondan çıkarmadan dışarıda soğuması için 15 dk. bekletildi ve süre sonunda PBS ile yıkandı.
- 10- Protein blok (abcam: ab80436) her lam üzerine dokuyu kapatacak oranda damlatıldı ve 30-60 dk. nemlendirilmiş kap içerisinde bekletildi.
- 11- 1\100 oranında sulandırılan primer antikordan (Anti-tavşan *M. bovis* poliklonal antikor-Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü) her bir lam üzerine mikropipet kullanarak 12- µl eklendi, 1 saat 37°C etüvde nemlendirilmiş kabin içerisinde inkübe edildi ve PBS ile yıkandı.
- 13- İmmunfloresans antikor (Cat No: Goat Anti-Rabbit IgG H&L (FITC)) preparatların üzerine 1\50 oranında sulandırılarak eklendi ve karanlık ortamda 45 dk. bekletildikten sonra distile su ile yıkandı.
- 14- 9 kısım distile su ve 1 kısım oranında gliserol karışımı dokular üzerine damlatılarak, lamel ile kapatıldı.
- 15- Hazırlanan preparatlar (ZEISS Almanya) floresans ataçmanlı mikroskopta incelendi.

3.5. Dondurulmuş dokularda PZR uygulaması

3.5.1. DNA ekstraksiyon basamağı

M. bovis' in belirlenmesi için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanılarak bu etkenin primer tanımlı DNA moleküllerinin çoğaltılması ve belirlenmesi esasına dayalı yöntemle ortaya konması sağlanmıştır. Önceden -20 °C' de dondurulmuş olan doku numuneleri çözündükten sonra ticari olarak satın alınan **QIAGEN** marka Blood & Tissue (Cat. No. 69504) ekstraksiyon kitinin protokolüne göre 25 mg civarında doku alınarak homojenize edildi ve eppendorf tüpe alındı. Bu işlemten sonra ticari kit protokolü uygulandı. Satın alınan kitte bulunan eritici solüsyonlar dokuların bulunduğu tüplere eklendi ve 48 saat boyunca 57°C etüvde bekletildi. Bu aşamadan sonra tüm basamaklar bazı modifikasyonlar dışında yine kit protokolüne uyularak yapıldı. Elde edilen ekstraktlardan *M. bovis*'e ait 16S DNA'nın PZR ile amplifikasyonu Righter DJ'nin ⁵ tarifine göre yapıldı ve bu amaçla; forward primer olarak Mb-F GCTTCAGTATTTTGACGG ve reverse primer olarak ise Mb-R GGTTCAGCTCCATAACCAGA (Lee ve ark. ⁵⁶) 1 µl ekstrakte edilmiş DNA 49 µl reaksiyon karışımına (Taq buffer- 5 µl, (10 mM) dNTP- 1 µl, (25mM) MgCl₂- 3 µl, Taq- 0,5 µl, Forward primer- 0,35 µl, Reverse primer- 0,35 µl, DNA – 5 µl, dH₂O- 34,8 µl) ilave edildi. Bu aşamadan sonra PZR reaksiyon tüpleri aşağıdaki programın yüklendiği PZR makinesine (Applied-Veriti 384 Thermal Cyclers) yerleştirilip çalıştırıldı ve amplifikasyon sağlandı.

95°C - 5 dk. (Denatürasyon)

95°C - 30 saniye

60°C - 30 saniye. (Primer bağlanması) × 35 siklus

72°C - 30 saniye

72°C - 5 dk. (DNA sentezi)

Bu program sonunda PZR ürünleri amplifikasyonunun başarısını kontrol için etidyum bromürlü %2' lik agaroz jele yüklenerek elektroforeze tabi tutuldu. *M. bovis* için 303 bp' lik bantların görülmesi pozitif olarak kabul edildi.

Bu çalışmada kullanılan pozitif kontrol Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından temin edilmiştir.



Şekil.3.1. PZR jele amplifikasyon ürünü yükleme.

4. BULGULAR

Çalışma kapsamında mezbahada kesimi yapılan 836 adet sığira ait akciğerler makroskopik olarak incelendi ve lezyon görülen 100 adet (%11.96) akciğer üzerinde patolojik incelemeler yapıldı.

Tablo.4.1. Lezyonlu akciğerlerin PZR sonuçlarına göre etken tespit edilen sığırların ırklara göre dağılımı.

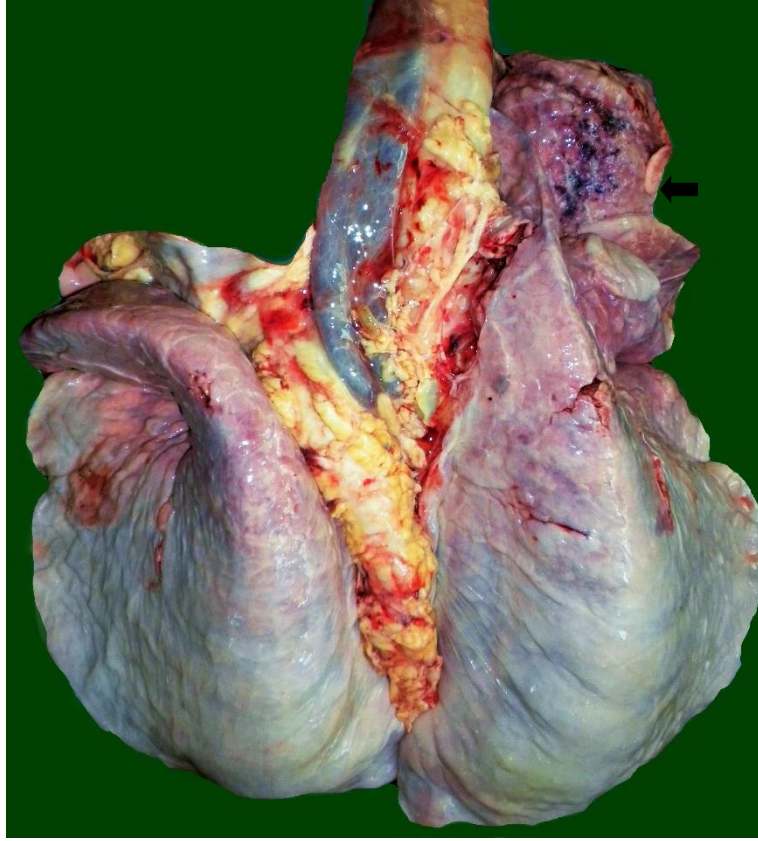
İrk	Alınan örnek sayısı	<i>M. bovis</i> PZR (+)	Toplam incelenen organ sayısına oranı (%)
n: 100 - %			
Montafon	32	11	% 11
Melez	26	9	% 9
Holştayn	20	10	% 10
Simental	16	6	% 6
Yerli kara	6	-	-
Toplam	100	36	% 36

4.1. Makroskopik Bulgular

İncelenen organlarda makroskopik olarak en belirgin lezyonlar akciğerlerin sağ ve sol kranial loplarda gözlemlendi.

4.1.1. İrinli-nekrotik Bronkopnömoni

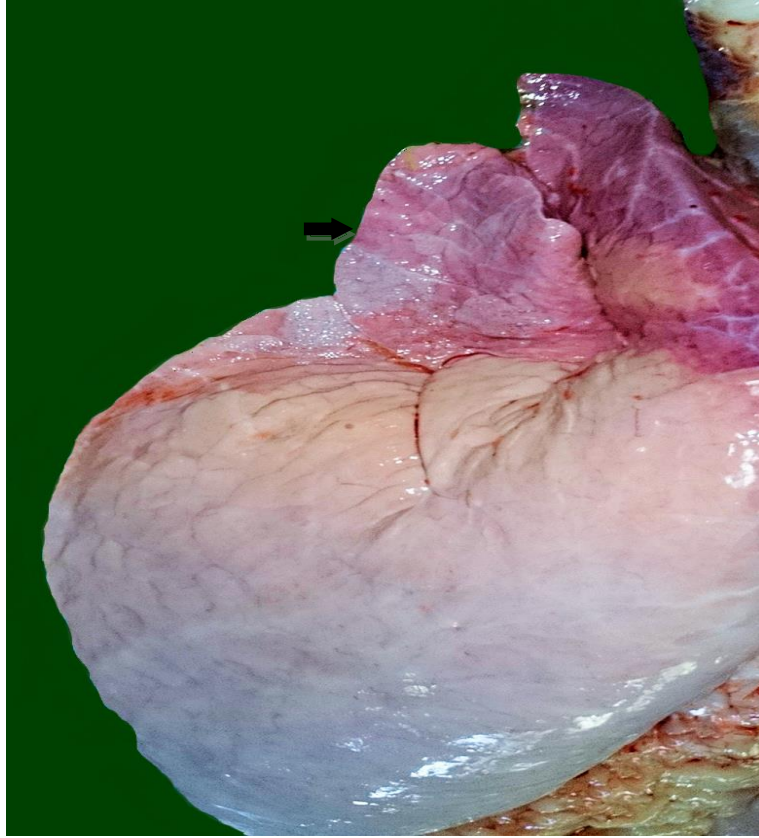
İrinli-nekrotik bronkopnömoni olarak değerlendirilen organların normalden daha sert kıvamda olduğu ve lezyonlu bölgelerin kesit yüzeylerinde ise irinli bir eksudatın varlığı gözlemlendi.



Şekil. 4. 1. Sağ kranial lopta irinli-nekrotik bronkopnömoni (ok).

4.1.2. Fibrinli-nekrotik Bronkopnömoni

Fibrinli-nekrotik bronkopnömoni olarak değerlendirilen örneklerde akciğerlerin lobar düzeyde etkilendiği, bu bölgelerin kıvamlı ve volümünöz olduğu görüldü (şekil.4.2). Bununla birlikte etkilenen akciğer loblarının dış ve kesit yüzeylerinde tipik alacalı mermer görünümünde konsolidasyon sahaları ile gri krem renkte, multifokal nekroz alanları görüldü. Organa yapılan kesitlerde sıyan eksudata rastlanmadı. Bu tip pnömoniyle karakterize örneklerde plöranın kalınlaştığı görüldü.



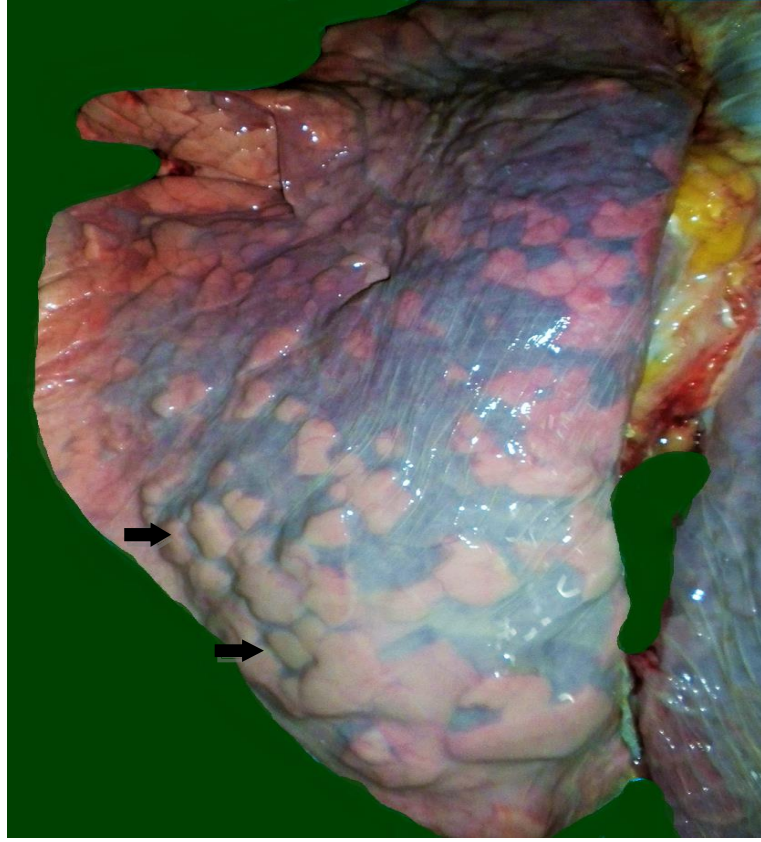
Şekil.4.2. Sol kranial lopta fibrinli pnömoni (ok).



Şekil.4.3. Fibrinli nekrotik bronkopnömoni

4.1.3. İntersitisyel pnömoni

İntersitisyel pnömoni olarak değerlendirilen organlarda belirgin olarak hacim artışı dikkat çekti. Kesit yüzünde bronş ve bronşiyollerin çevresinde lenfoid doku artışına bağlı gri-beyaz oluşumlara rastlandı. Eksudasyon ile komplike olmuş örnekler bronkointersitisyel pnömoni olarak değerlendirildi.



Şekil.4. 4. İntersitisyel pnömoni. Amfızemli alanlar (oklar).

4.1.4. Granülomatöz Pnömoni

Granülomatöz özellik gösteren pnömoni olgularında, dış bakıda çeşitli büyüklükte ve yaygınlıkta granümlara rastlandı. Bu granümlara yapılan kesitlerde bağ doku ile sınırlandırılmış ve kalsifiye halde koagulasyon nekrozları gözlemlendi.

Tablo.4.2. Etken (PZR) pozitif ve negatif olgularda, pnömoni lezyonlarının anatomik olarak yerleşimi.

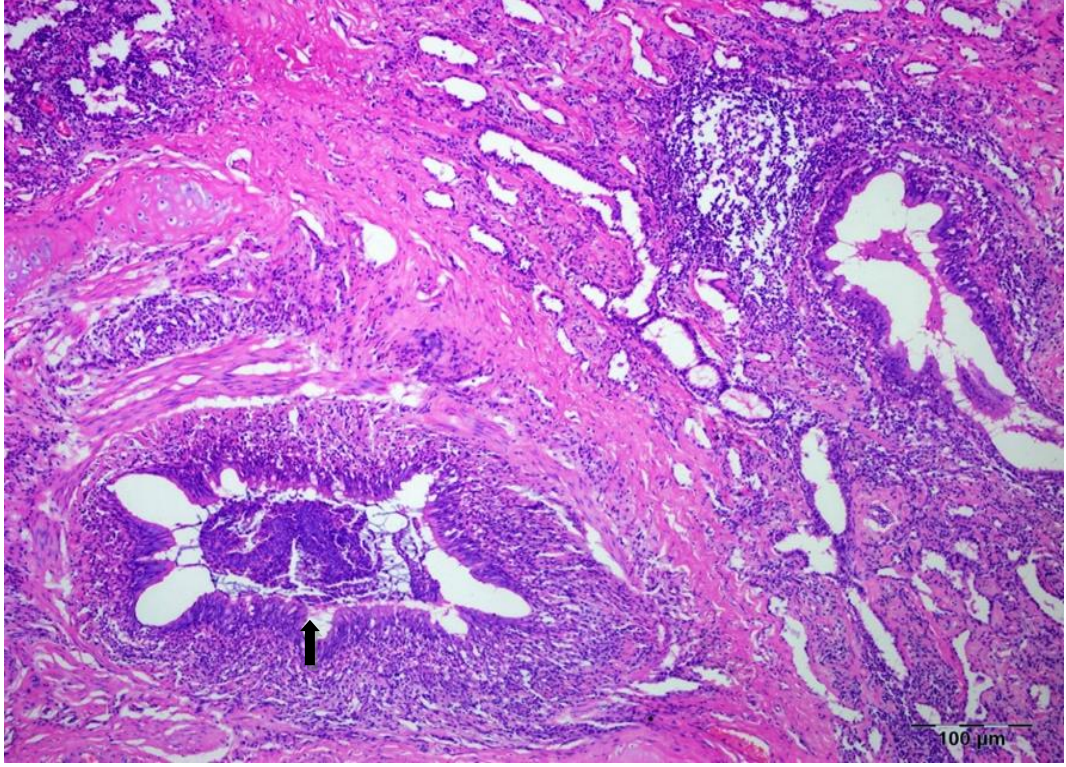
	<i>M. bovis</i> (+) hayvanlar	<i>M. bovis</i> (-) hayvanlar
Loplar	Hayvan Sayısı	Hayvan Sayısı
Pars cranialis dextra	26	42
Pars caudalis dextra	8	36
Medialis dextra	10	16
Caudalis dextra	12	18
Lobus accessorius	6	8
Pars cranialis sinistra	21	54
Pars caudalis sinistra	8	38
Caudalis sinistra	9	22

4.2. Mikroskopik Bulgular

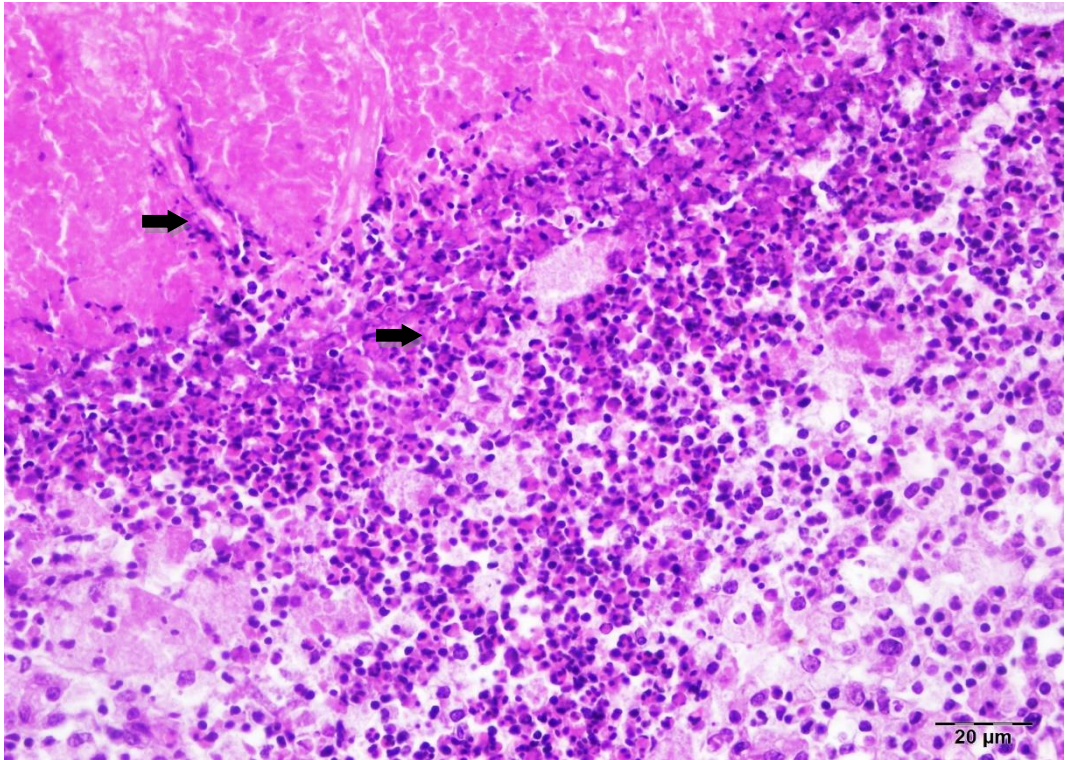
İncelenen organlara ait mikroskopik bulgular değerlendirilerek pnömoniler sınıflandırıldı.

4.2.1. İrinli-nekrotik Pnömoniler

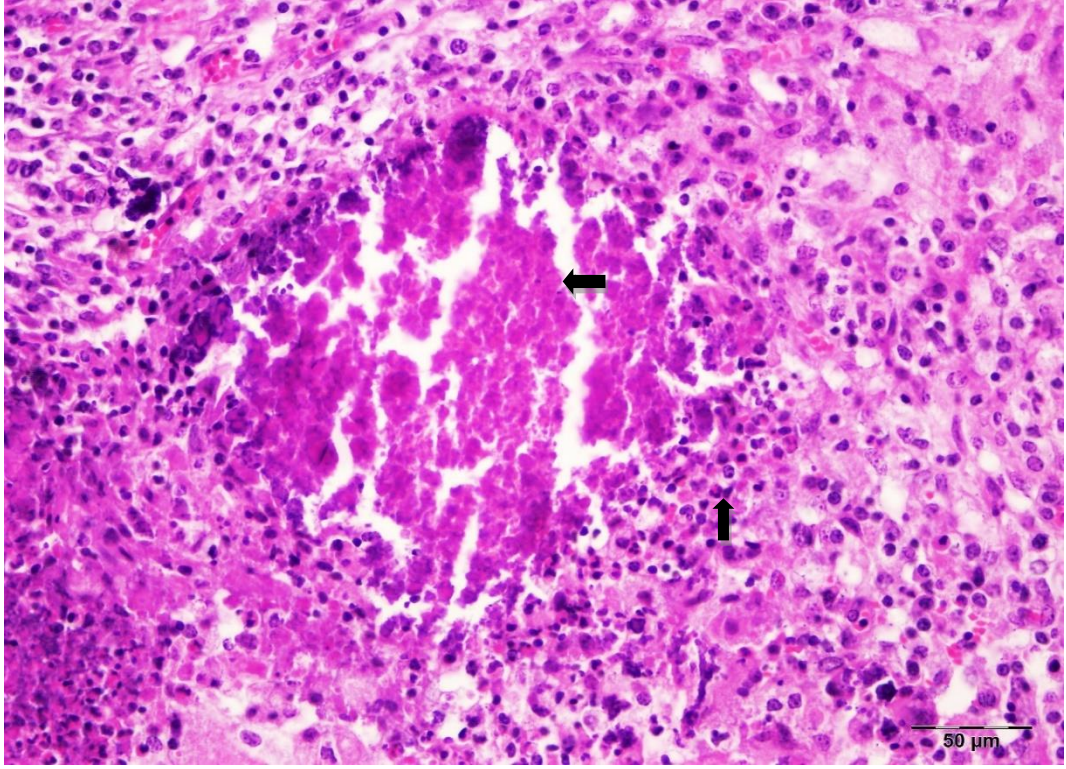
Histopatolojik incelemeler sonucunda 28 (%28) olguda irinli-nekrotik bronkopnömoni tablosu saptandı. Bronş, bronşiyol ve alveol epitellerinde dejenerasyon ve nekroz gözlemlendi. Ayrıca, bu yapıların lümenlerinde yoğun olarak nötrofil ve deskuame olmuş epitel hücrelerden oluşan bir eksudatın varlığı dikkati çekti (şekil.4.5). Bununla birlikte eksudatta daha az oranda makrofaj, lenfosit ve plazma hücrelerine de rastlandı. Bazı olgularda fokal odaklar halinde kazeifikasyon nekrozu alanları (şekil.4.6) nötrofillerden zengin bir hücresel kuşak ile çevriliydi (şekil.4.7).



Şekil.4.5. İrinli-nekrotik bronkopnömoni. Bronşiyol lümeninde nötrofil ve deskuame olmuş epitel hücrelerinden oluşan eksudat (ok). HE. 100µm.



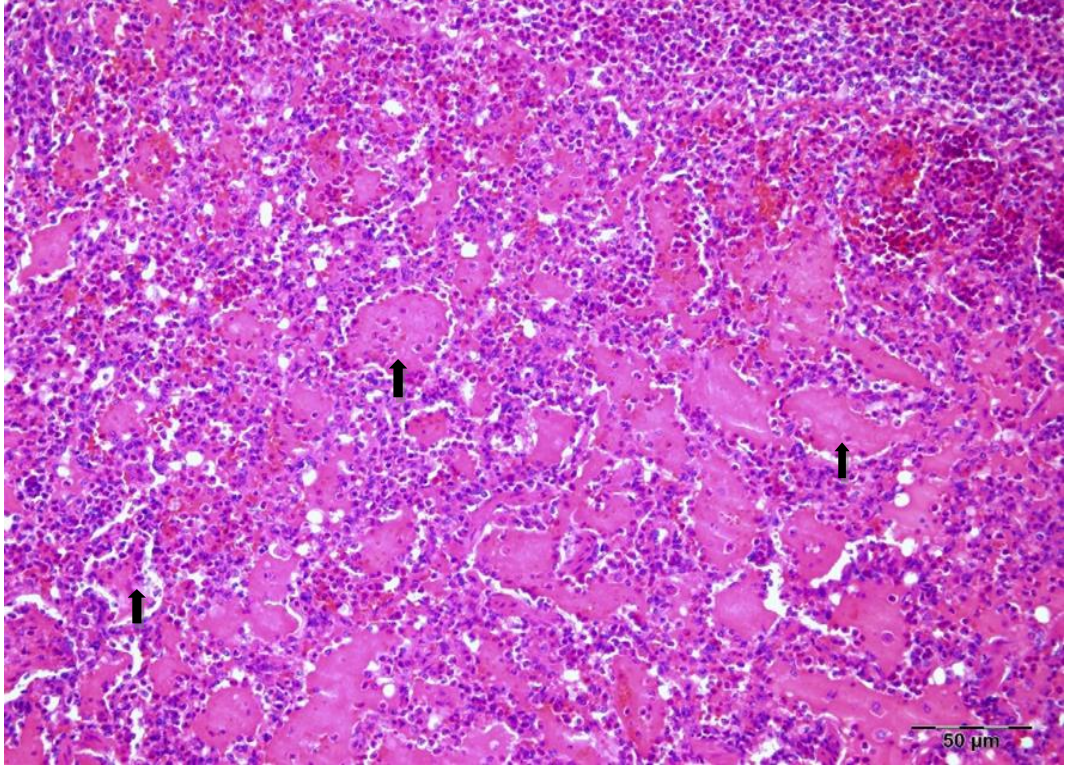
Şekil.4.6. İrinli-nekrotik bronkopnömoni. Kazeifikasyon nekrozu alanı ve nötrofil lökositler (oklar). HE. 50µm.



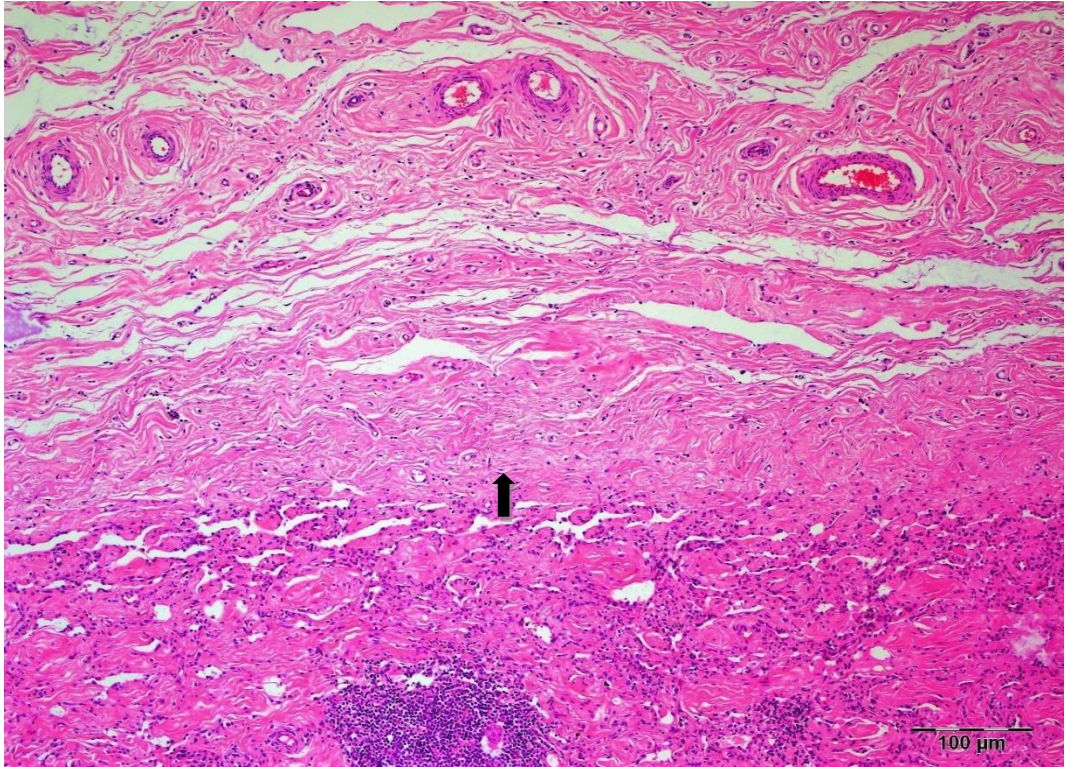
Şekil.4.7. İrinli-nekrotik bronkopnömoni. Kazeifikasyon nekrozu alanı ve nötrofillerden zengin hücresel kuşak (oklar). HE. 50µm.

4.2.2. Fibrinli-nekrotik Bronkopnömoniler

Histopatolojik incelemeler sonucunda 8 (% 8) olguda fibrinli-nekrotik pnömoni saptandı. Bronş, bronşiyol ve alveol epitellerinde nekroz ve deskuamasyon ve bu yapıların lümeninde fibrinli eksudat ile birlikte nötrofil, lenfosit ve makrofajlardan oluşan hücre varlığı gözlemlendi (şekil.4.8). Plörada kalınlaşma (şekil.4.9) ve interlobuler septal dokunun fibrin birikimiyle belirginleşmesi mikroskopik olarak dikkati çeken karakteristik bulgularıdır.



Şekil.4.8. Fibrinli-nekrotik bronkopnömoni. Alveol lümeninde fibrinli eksudat ile birlikte nötrofil, lenfosit ve makrofajlar (oklar). HE. 50µm.

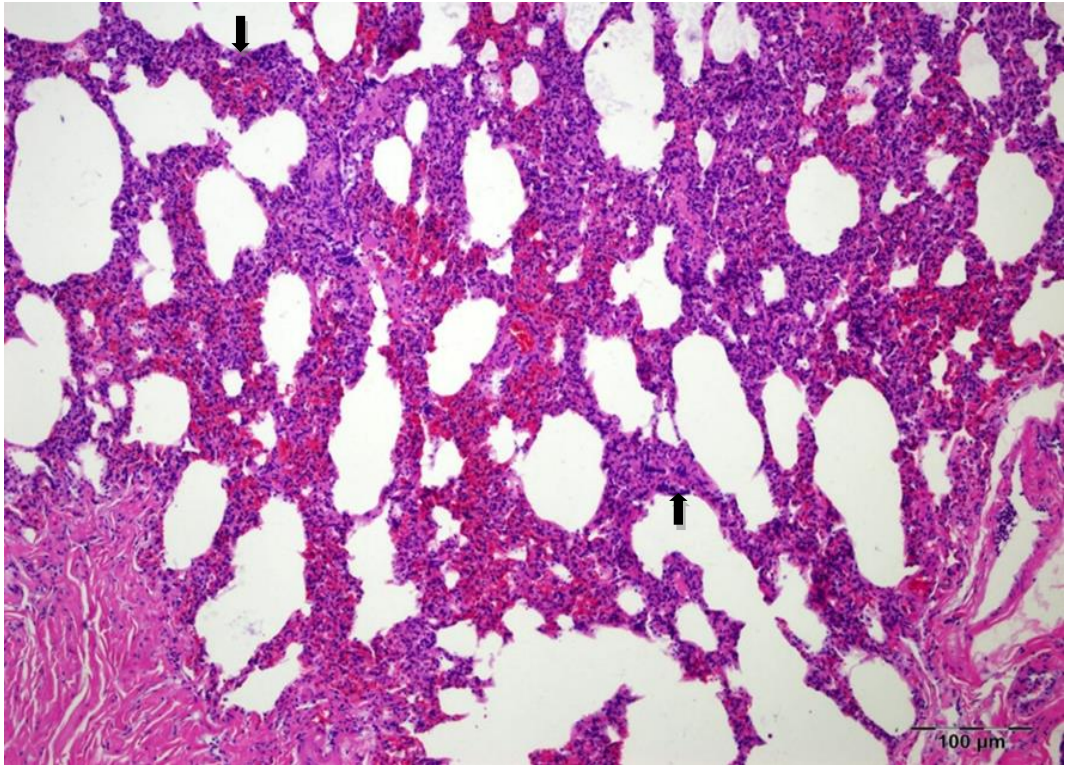


Şekil.4.9. Fibrinli-nekrotik bronkopnömoni. Plörada kalınlaşma (ok). HE. 100µm.

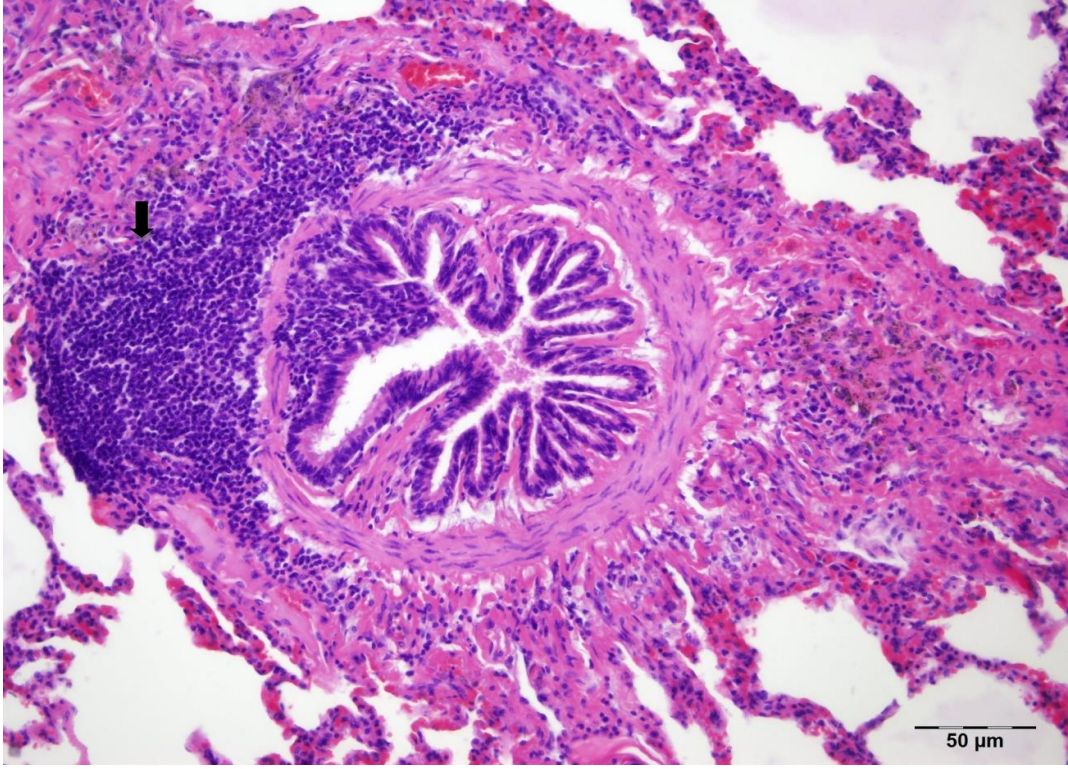
4.2.3. İntersitisyel Pnömoniler

Histopatolojik incelemeler sonucunda pnömonili örneklerin 42'sinde (%42) intersitisyel pnömoni tanısı kondu. İntersitisyel dokuda yoğun mononükleer hücre infiltrasyonları ve bağdoku artışına bağlı interalveoler septumda kanlılaşma görüldü (şekil.4.10). Dikkat çeken histopatolojik diğer bir bulgu ise peribronşiyoler lenfoid dokuda gözlenen hiperplaziydi (şekil.4.11). Bazı olgularda bronşiyol ve alveol epitellerinde dejeneratif ve nekrotik değişiklikler ile birlikte tip II pnömosit artışına bağlı epitelizasyona rastlandı.

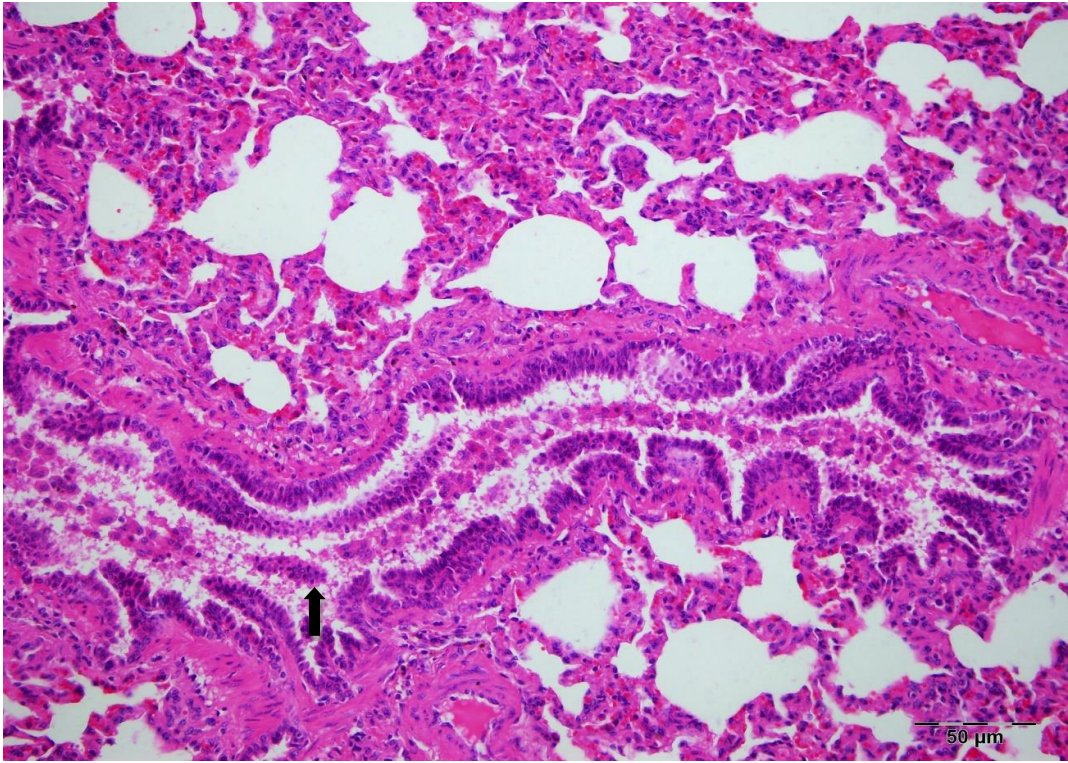
Doku kesitlerinin mikroskopik incelemeleri sonucunda 16 (%16) olguda bronkointersitisyel pnömoni tablosu görüldü. Alveol ve bronşiyol epitelinde nekroz ve yangısal eksudatın varlığı ile birlikte intersitisyel alanlarda mononükleer hücrelerin artışı dikkat çekti (şekil.4.12).



Şekil.4.10. İntersitisyel pnömoni. İntersitisyel dokuda yoğun mononükleer hücre infiltrasyonları ve bağdoku artışına bağlı interalveoler septumda kanlılaşma (oklar). HE. 100µm.



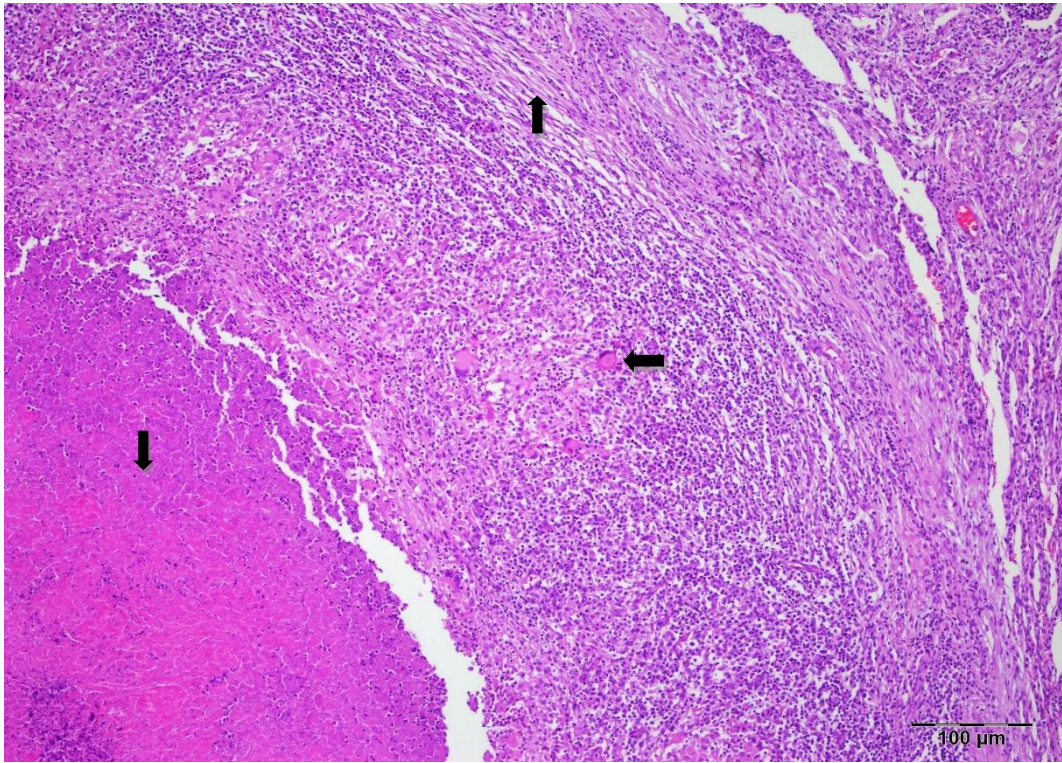
Şekil.4.11. İntersitisyel pnömoni. Peribronşiyoler lenfoid dokuda hiperplazi (ok). HE. 50µm



Şekil.4.12. Bronkointersitisyel pnömoni. Alveol ve bronşiyol epitelinde nekroz ve yangısal eksudatın varlığı ile birlikte intersitisyel alanlarda mononükleer hücre artışı (ok). HE. 50µm.

4.2.4. Granülomatöz Pnömoniler

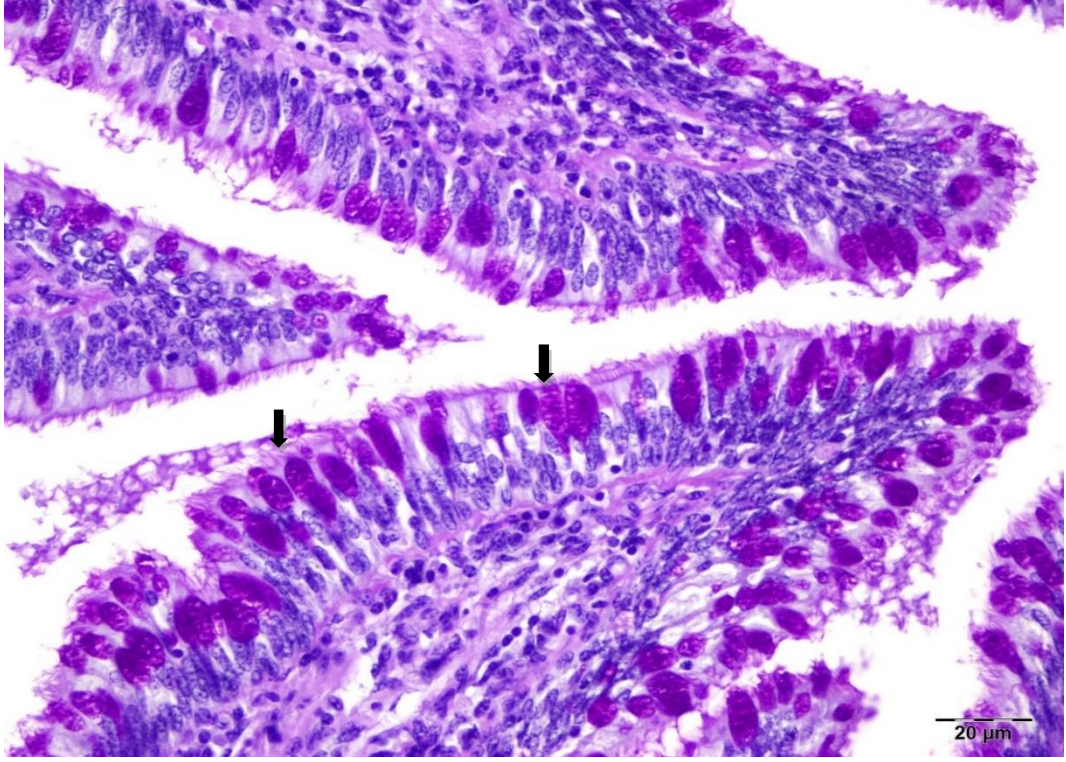
Histopatolojik incelemeler sonucunda 6 örnekte (%6) granülomatöz pnömoni tanısı kondu. Mikroskopik incelemede geniş kazeifikasyon nekroz alanları ve bu alanın çevresinde makrofajlar, epiteloid hücreler, langhans tipi dev hücreleri, lenfosit ve plazma hücrelerinin infiltre olduğu yangısal hücre kuşağı mevcuttu. Tüm bu yapı fibroz bağ dokudan oluşan bir kapsülle sınırlandırılmış haldeydi (şekil.4.13).



Şekil.4.13. Granülomatöz pnömoni. Nekroz alanı ve bu alanın çevresinde makrofajlar, epiteloid hücreler, Langhans dev hücreleri, lenfosit ve plazma hücrelerinin infiltre olduğu yangısal hücre kuşağı. Fibroz bağ dokudan oluşan kapsül (oklar). HE. 100µm.

4.3. PAS Boyama Bulguları

Etken pozitif tespit edilen ve histopatolojik olarak irinli-nekrotik, fibrinli-nekrotik pnömoni tanısı konan olguların tamamında ve intersitisyel pnömoni görülen olguların çoğunda Goblet hücrelerinde musin salgısı artışı (şekil.4.14), hiperplazi gözlemlendi (şekil.4.15).



Şekil.4.14. Etken pozitif örnekte bronşiol mukoza, Goblet hücrelerinde musin (PAS) pozitifliği ve hiperplazi (oklar). 20 µm.



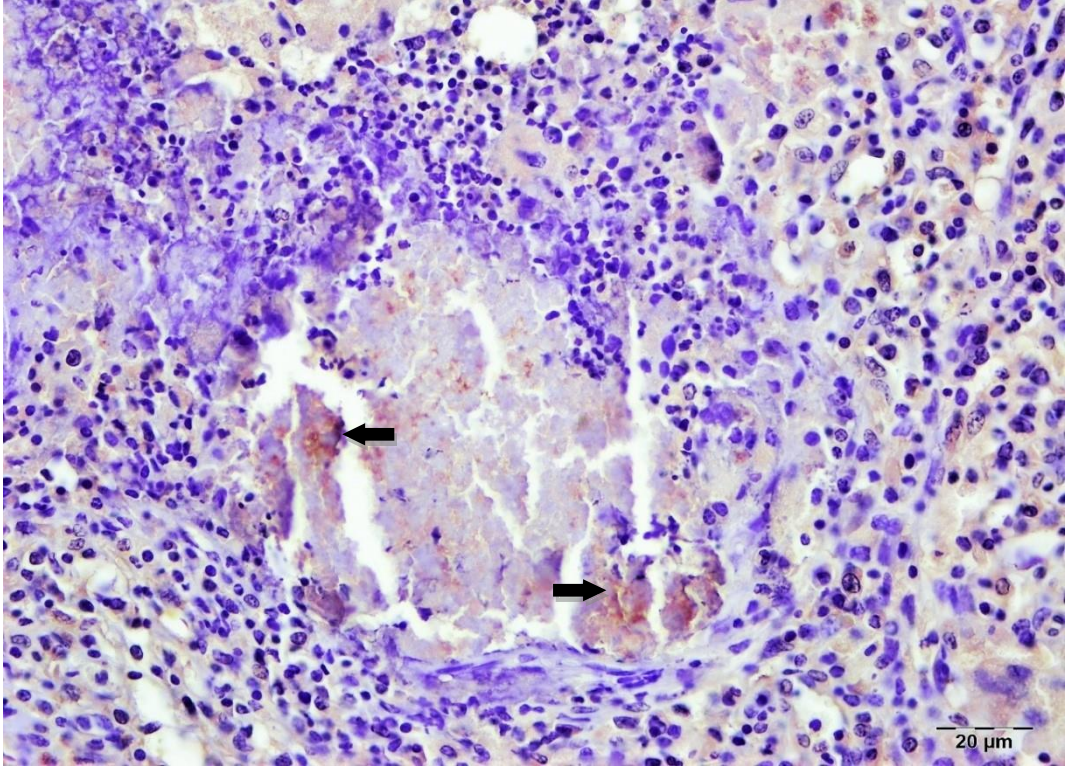
Şekil.4.15. Bronş epitelinde PAS (Periodic Acid Schiff) pozitifliği. 100 µm.

Tablo.4.3. Görülen pnömoni tipleri ve pozitif örneklerle ait sonuçlar.

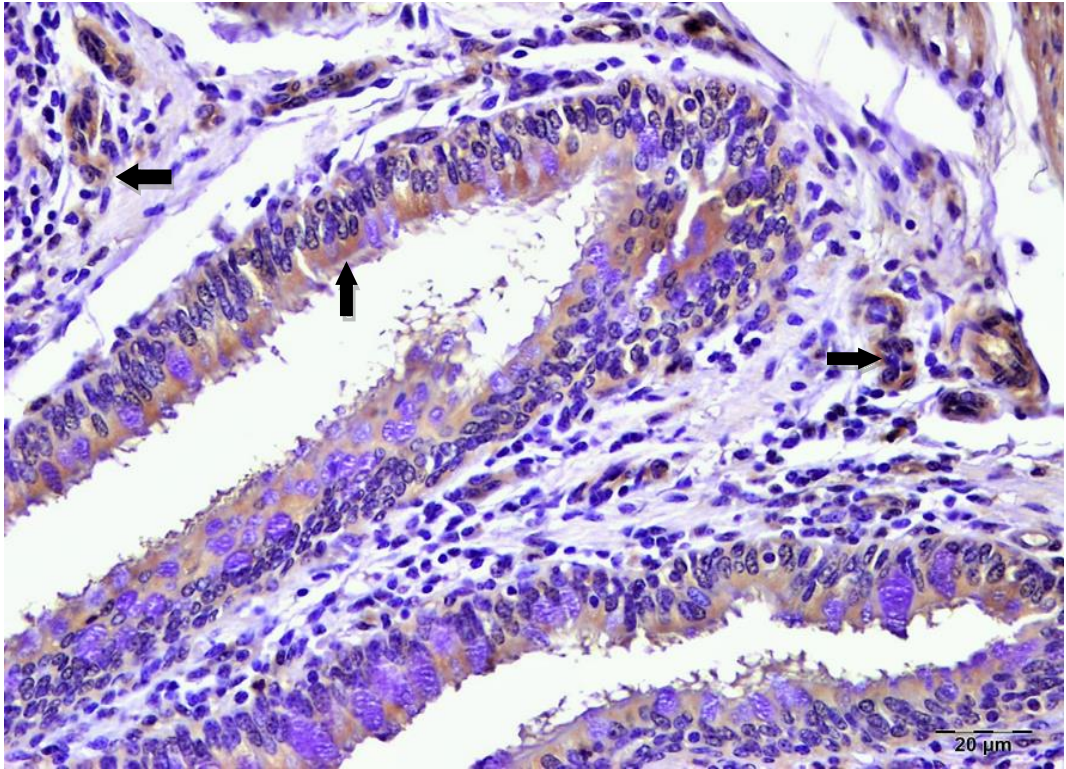
	Tüm örnekler	<i>Mycoplasma bovis</i> + (IHC ve IF)	<i>Mycoplasma bovis</i> + (PZR)
İntersitisyel pnömoni	42	11	16
İrinli-nekrotik bronkopnömoni	28	9	9
Bronkointersitisyel pnömoni	16	6	7
Fibrinli-nekrotik bronkopnömoni	8	4	4
Granülomatöz pnömoni	6	-	-
Toplam	100	30	36

4.4. İmmunohistokimyasal Boyama Bulguları

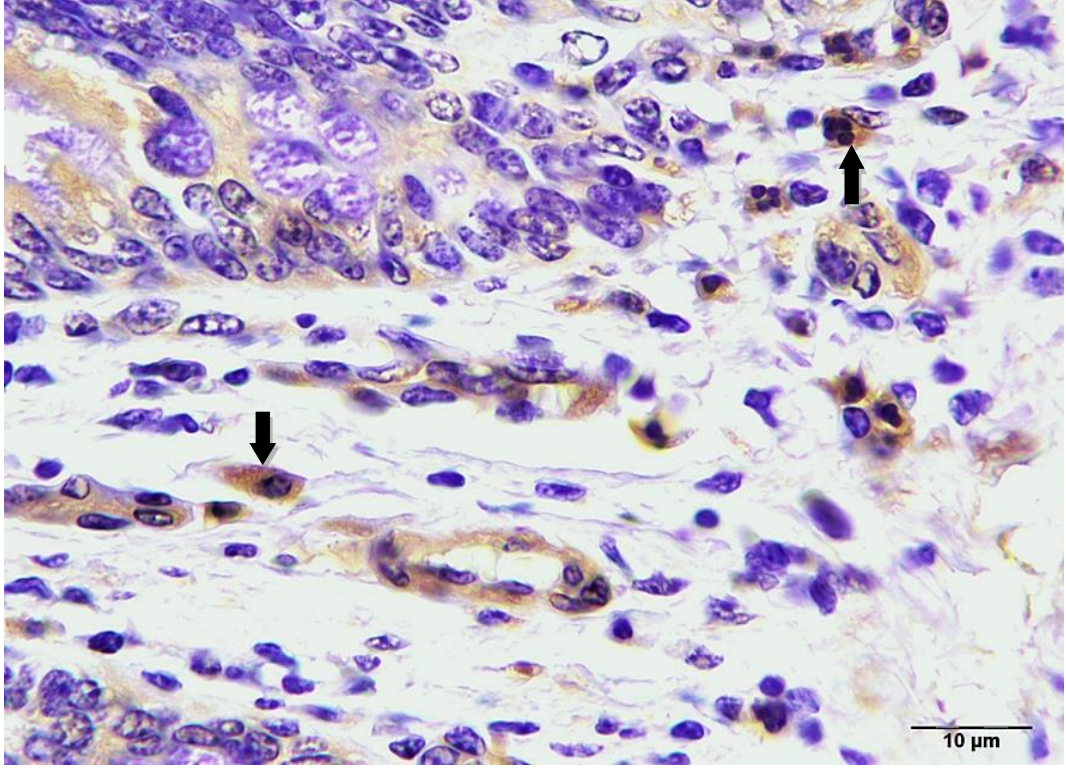
Yapılan immunohistokimya ve immunfloresan boyamalarda 42 intersitisyel pnömoni tanısı konan olguların 11'inde (%26.19), irinli-nekrotik pnömoni tanısı konan 28 olguların dokuzunda (%32.14), bronkointersitisyel pnömoni tanısı konan 16 olgunun altısında (%37.50), fibrinli-nekrotik pnömoni tanısı konan sekiz olgunun dördünde (%50) *M. bovis* pozitif reaksiyonlara rastlandı. Mikroskopik incelemelerde pozitif reaksiyonlara irinli-nekrotik ve fibrinli-nekrotik pnömonilerde; nötrofil ve makrofajların sitoplazmalarında ve nekroz alanında (şekil.4.16), bronş, bronşiyol ve alveol epitel hücrelerinde sitoplazmada (şekil.4.17), lümende bulunan eksudatta (şekil.4.19), intersitisyel pnömonilerde; intersitisyel dokularda bulunan makrofajların sitoplazmalarında (şekil.4.20) ve yer yer bazı bronş, bronşiyol ve alveollerin epitel hücrelerinde rastlandı. Buna karşın hiçbir numunede lenfoid dokuda pozitif reaksiyon izlenmedi. Çalışmada granülomatöz pnömoni tanısı konan 6 örnekte pozitif reaksiyonlara rastlanmadı.



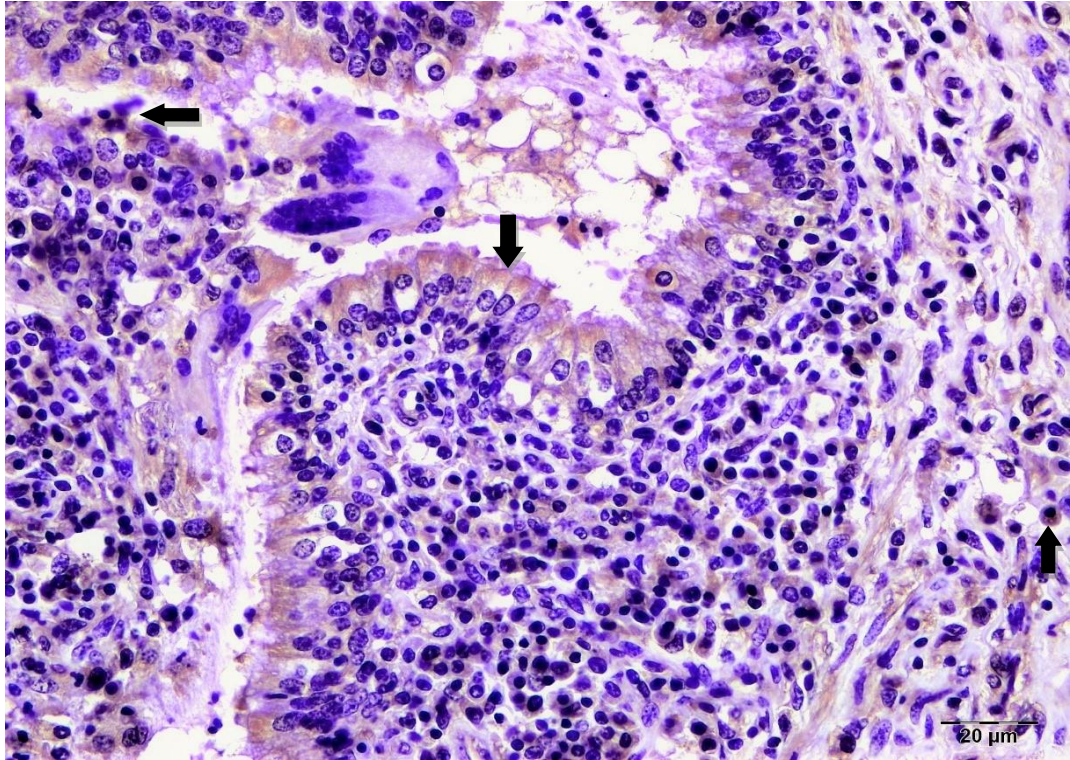
Şekil.4.16. İrinli-nekrotik bölgede ve çevresindeki yangı hücrelerinde immunpozitiflik (oklar). IHC. 20 µm.



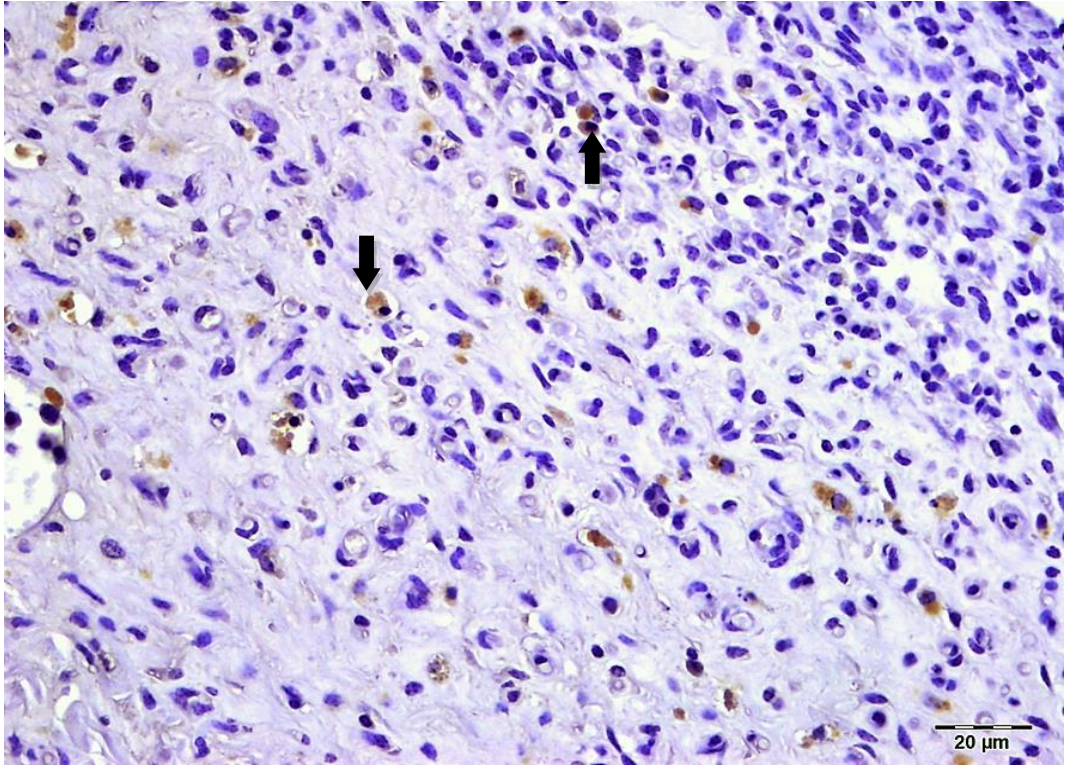
Şekil.4.17. Bronşiyol epitellerinde ve lamina propriyada bulunan hücrelerde immunpozitif reaksiyon (oklar). IHC. 20 µm.



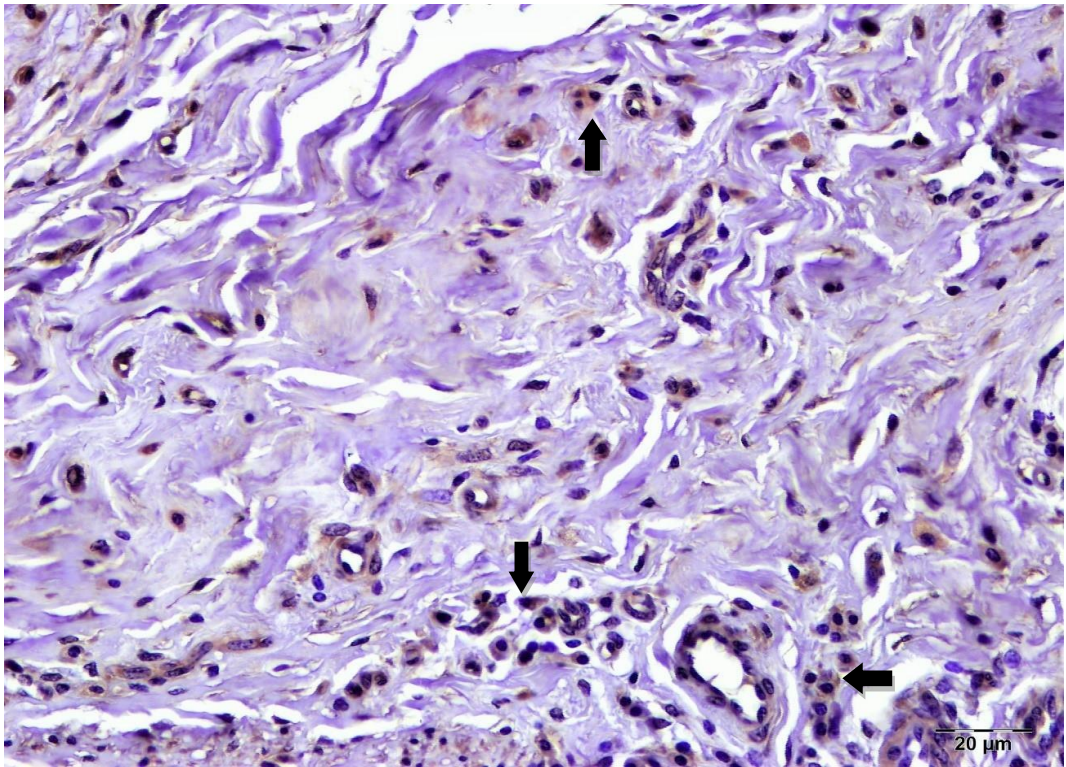
Şekil.4.18. Lamina propriyada bulunan genç hücrelerinde immunpozitif reaksiyonlar (oklar). IHC. 10 µm.



Şekil.4.19. Bronşiyol lümeninde eksudatta, epitellerde ve lamina propriyada bulunan genç hücrelerinde immunpozitif reaksiyonlar (oklar). IHC. 20 µm.



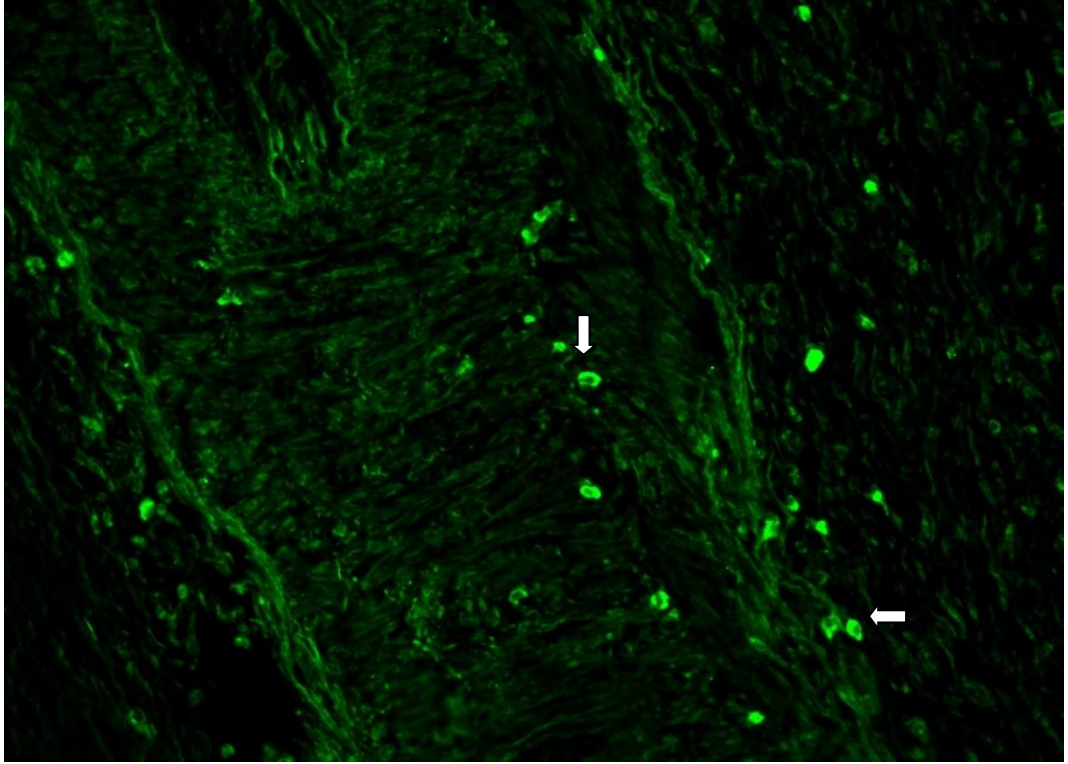
Şekil.4.20. İntersitisyel bölgede makrofajlarda immunpozitiflik (oklar). IHC. 20 μm.



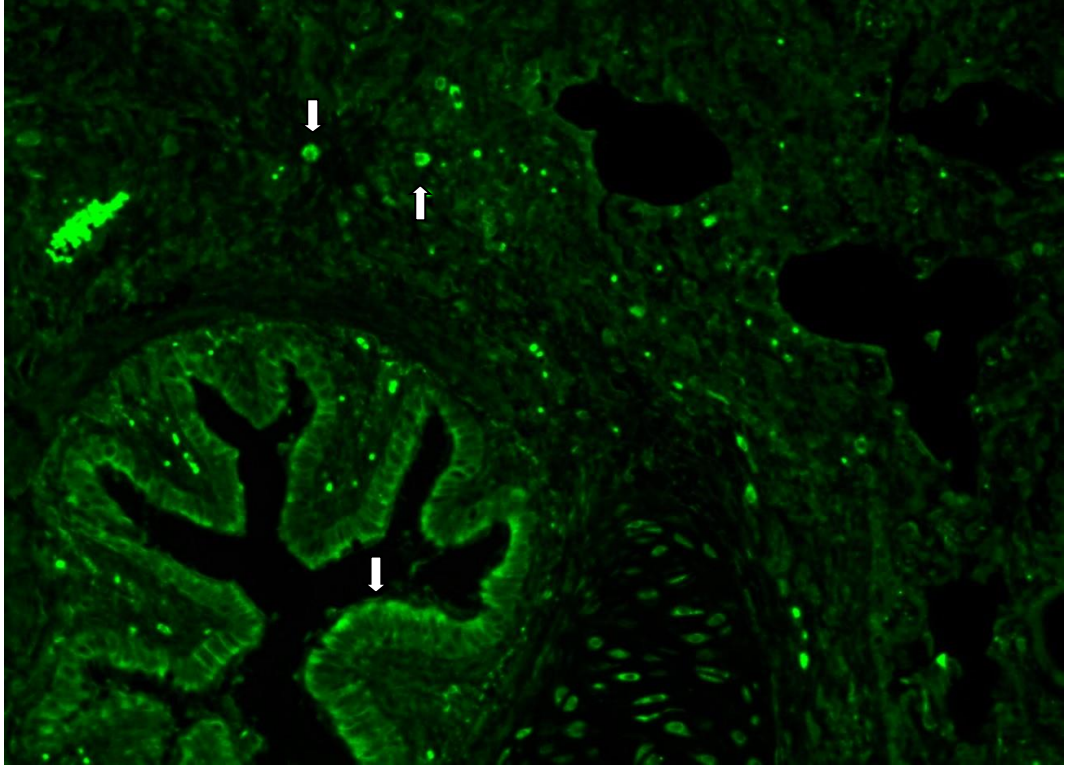
Şekil.4.21. Bronş çevresi lamina propriya ve bez yapıları. Makrofajlarda immunpozitiflik (oklar). IHC. 20 μm.

4.5. İmmunfloresan Boyama Bulguları

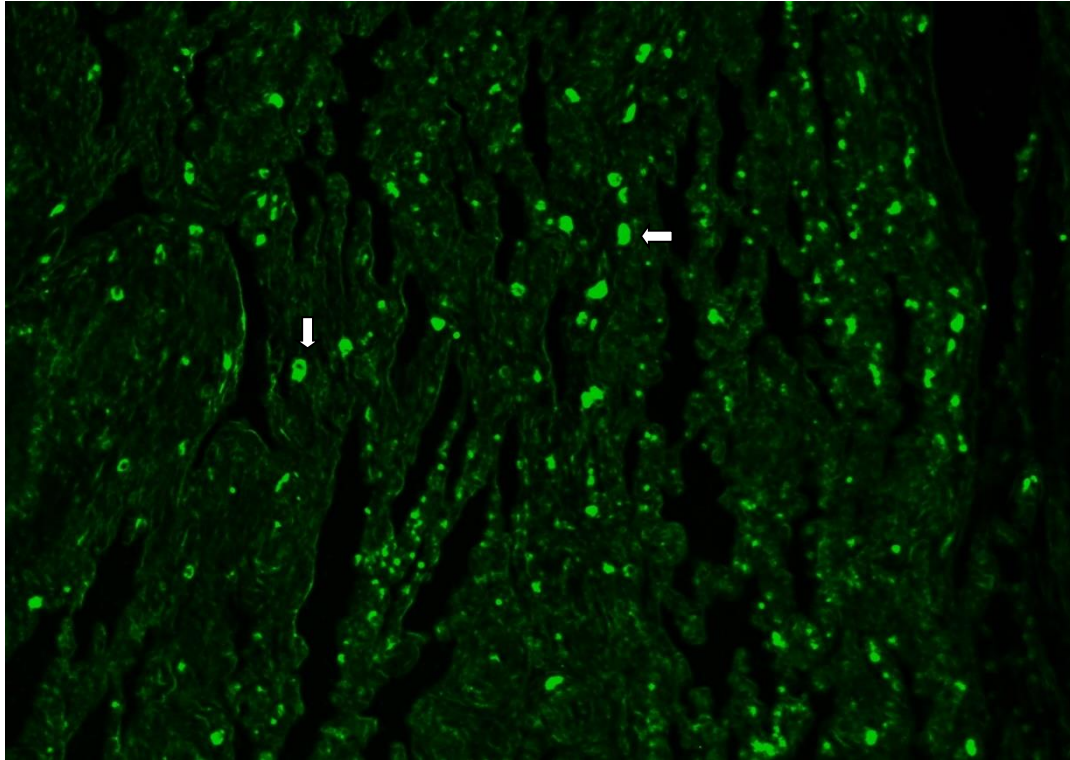
Yapılan immunfloresan boyamalarında immunohistokimyasal boyamada elde edilen verilerle uyumlu olmak üzere; floresan ataçmanlı mikroskopta ışımlar; irinli-nekrotik ve fibrinli-nekrotik pnömonilerde; nekroz bölgesinde, nötrofil ve makrofajların sitoplazmalarında (şekil.4.22), bronş, bronşiyol ve alveol epitel hücrelerinde sitoplazmada (şekil.4.23). İntersitisyel pnömonilerde; intersitisyel dokularda bulunan makrofajların sitoplazmalarında (şekil.4.24) görüldü.



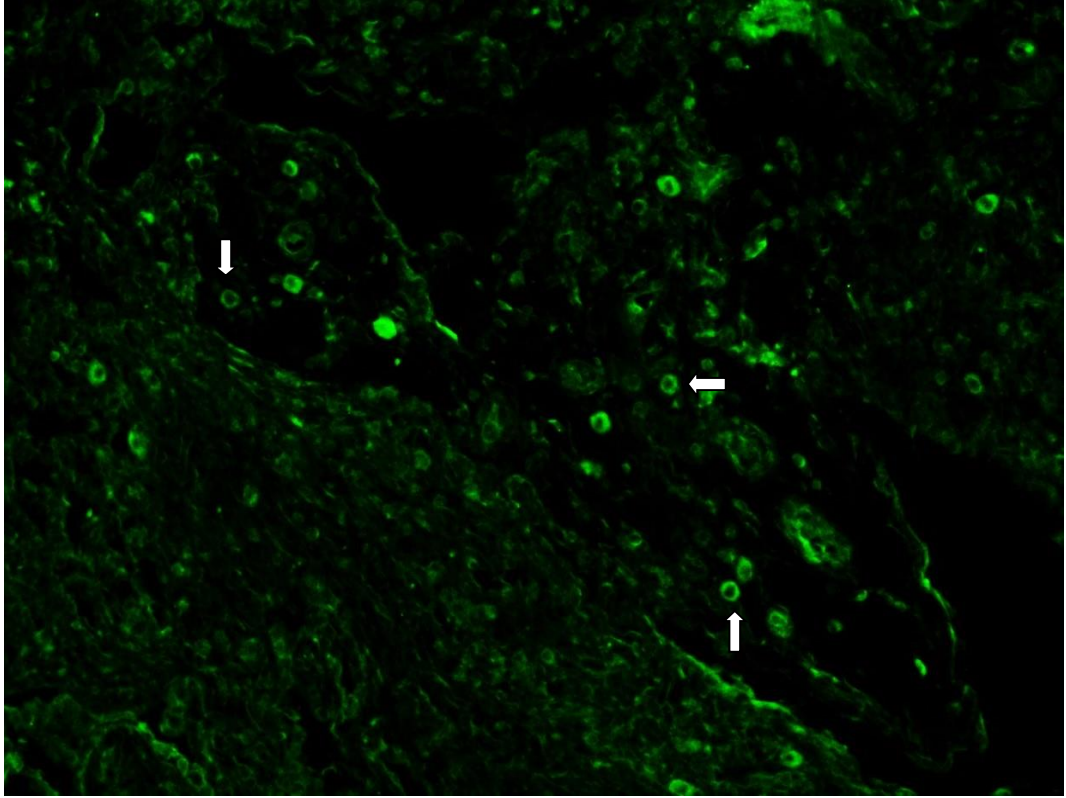
Şekil.4.22. Nekroz bölgesi ve çevresindeki yangı hücrelerinde immunfloresan pozitiflikler (oklar). IF. 20 μ m.



Şekil.4.23. Bronşiyol epitellerinde ve lamina propriyada bulunan hücrelerde immunfloresan pozitif reaksiyonlar (oklar). IF. 20 µm.



Şekil.4.24. İntersisitisel dokuda makrofajlarda immunfloresan pozitiflik (oklar). İF. 20 µm.



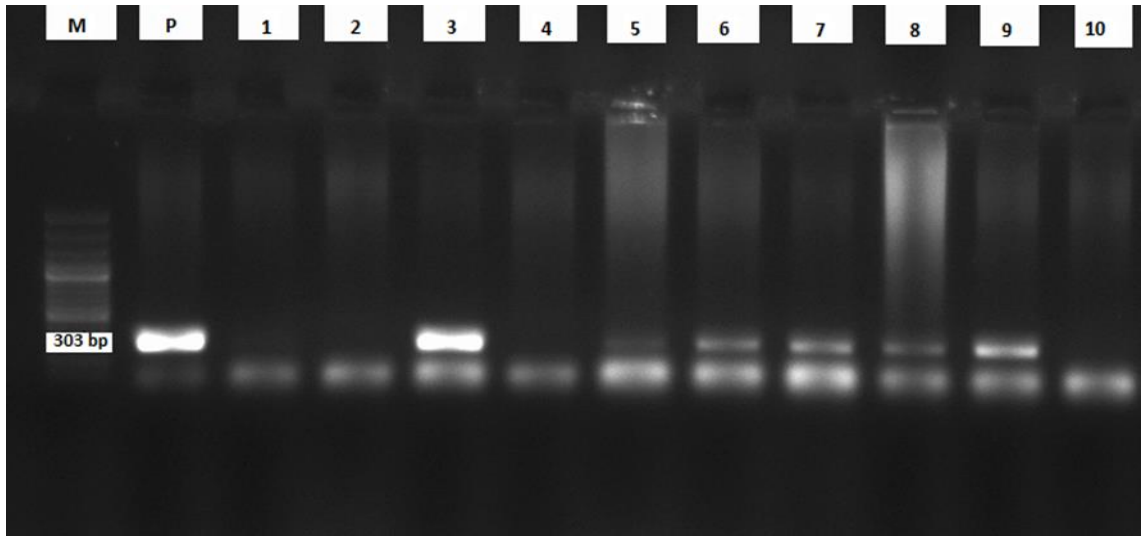
Şekil.4.25. İntersitisyel dokuda makrofajlarda immünfloresan pozitiflik (oklar). İF. 20 µm

Tablo.4.4. İHC ve İF pozitif vakalarda, *M. bovis* etkenlerinin yerleşim yerleri

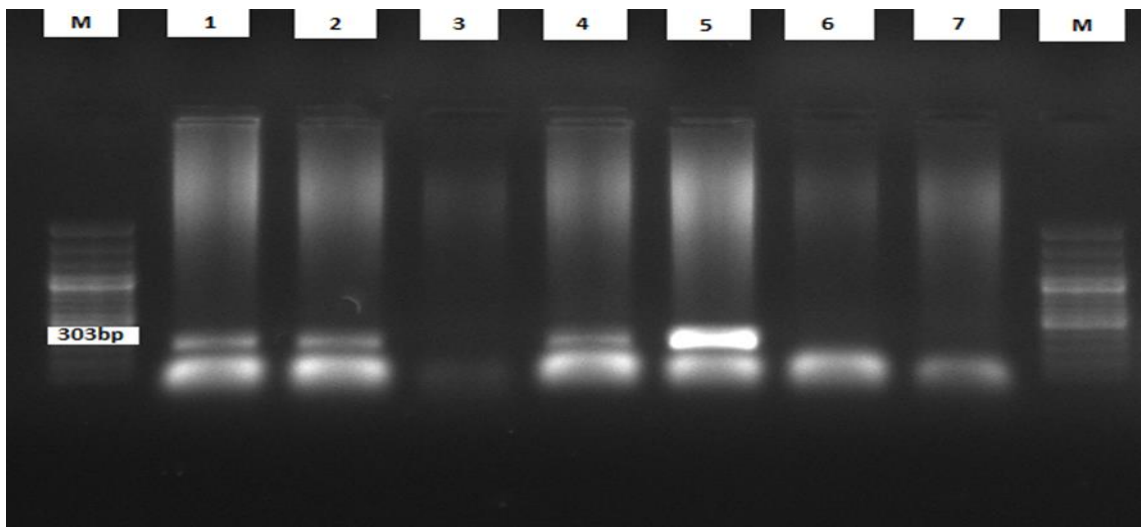
Pnömoni tipi	Pozitif numune sayısı	Alveoler makrofajlar içerisinde	İntersitisyel bölgede Makrofajlarda (sitoplazmada)	Alveol epitel hücrelerinde	Bronş ve bronşiyol epitellerinde	Nekroz alanında	BALT dokusu
İntersitisyel pnömoni	11	+	+	+	+	-	-
İrinli-nekrotik pnömoni	9	-	+	-	+	+	-
Bronkointersitisyel pnömoni	6	+	+	+	+	-	-
Fibrinli-nekrotik pnömoni	4	+	+	-	+	+	-

4.6. PZR sonuçları

PZR test sonuçlarına göre etken pozitif bantlara, 42 intersitisyel pnömoni tanısı konan örneğin 16'sında (%38.09), irinli-nekrotik bronkopnömoni 28 örneğin 9'unda (%32.14), bronkointersitisyel pnömoni 16 örneğin 7'sinde (%43.75) ve fibrinli-nekrotik 8 örneğin 4'ünde (%50) rastlandı. Granülomatöz pnömoni tanısı konan 6 olguda PZR pozitifliğe rastlanmadı.



Şekil.4.26. *M. bovis*'e spesifik 303 baz çifti uzunluğundaki bantlar gösteren PZR ve agaroz jel elektroforez sonuçları. M; Moleküler belirteç. (DNA ladder Plus 100bp Fermantes Litvanya) P; Pozitif kontrol. (3,5,6,7,8,9); pozitif saha örnekleri. (1,2,4,10); negatif saha örnekleri.



Şekil.4.27. *M. bovis*'e spesifik 303 baz çifti uzunluğundaki bantlar gösteren PZR ve agaroz jel elektroforez sonuçları. M; Moleküler belirteç. (1,2,4,5); pozitif saha örnekleri. (3,6,7); negatif saha örnekleri.

Tablo. 4.6. Karşılaştırmalı test sonuçları.

Örnekler.	Pnömoni türü	İHC	İF	PZR
1.	İntersitisyel pnömoni	+	+	+
2.	İntersitisyel pnömoni	+	+	+
3.	İntersitisyel pnömoni	+	+	+
4.	İntersitisyel pnömoni	+	+	+
5.	İntersitisyel pnömoni	+	+	+
6.	İntersitisyel pnömoni	+	+	+
7.	İntersitisyel pnömoni	+	+	+
8.	İntersitisyel pnömoni	+	+	+
9.	İntersitisyel pnömoni	+	+	+
10.	İntersitisyel pnömoni	+	+	+
11.	İntersitisyel pnömoni	+	+	+
12.	İntersitisyel pnömoni	-	-	+
13.	İntersitisyel pnömoni	-	-	+
14.	İntersitisyel pnömoni	-	-	+
15.	İntersitisyel pnömoni	-	-	+
16.	İntersitisyel pnömoni	-	-	+
17.	Brokointersitisyel pnömoni	+	+	+
18.	Brokointersitisyel pnömoni	+	+	+
19.	Brokointersitisyel pnömoni	+	+	+
20.	Brokointersitisyel pnömoni	+	+	+
21.	Brokointersitisyel pnömoni	+	+	+
22.	Brokointersitisyel pnömoni	+	+	+
23.	Brokointersitisyel pnömoni	-	-	+
24.	İrinli-nekrotik bronkopnömoni	+	+	+
25.	İrinli-nekrotik bronkopnömoni	+	+	+
26.	İrinli-nekrotik bronkopnömoni	+	+	+
27.	İrinli-nekrotik bronkopnömoni	+	+	+
28.	İrinli-nekrotik bronkopnömoni	+	+	+
29.	İrinli-nekrotik bronkopnömoni	+	+	+
30.	İrinli-nekrotik bronkopnömoni	+	+	+
31.	İrinli-nekrotik bronkopnömoni	+	+	+
32.	İrinli-nekrotik bronkopnömoni	+	+	+
33.	Fibrinli-nekrotik bronkopnömoni	+	+	+
34.	Fibrinli-nekrotik bronkopnömoni	+	+	+
35.	Fibrinli-nekrotik bronkopnömoni	+	+	+
36.	Fibrinli-nekrotik bronkopnömoni	+	+	+

5. TARTIŞMA

Sığırlarda solunum sistemi hastalıkları, tüm dünyada yaygın olduğu gibi ^{1,6,8,11,25,49,50} Türkiye’de de sıklıkla rastlanan ⁶⁻⁹ ve üzerinde önemle durulması gereken hastalıklardır. ^{6,8,13,20} Sığır pnömonilerinin yaygınlığının ortaya konulması amacıyla yapılan çalışmalarda, pnömoni oranının % 3.6 ile % 65.83 arasında değiştiği bildirilmiştir. ^{6,8,15,25,63}

Sunulan çalışmada akciğerlerde pnömoniye % 11.96 oranında rastlandı. Ortatatlı ve Çiftçi⁶⁴ tarafından Konya ilinde yapılan bir insidens çalışmasında makroskobik olarak lezyonlar lobar, lobuler, lobar-lobuler ve volüminöz-ödematöz olarak sınıflandırılmış olup, pnömoni oranı %11.64 olarak bildirilmiş ve sunulan çalışmada elde edilen değere olan yakınlığı dikkati çekmiştir. Ayrıca bu oranın daha önce yapılan çalışmalarda bildirilen aralıklar içerisinde fakat daha düşük oranda olduğu görüldü. Bu farklılıkların oluşmasında coğrafi ve iklim koşulları, beslenme ve barınmaya bağlı hayvan yetiştiriciliğindeki farklılıklar ve ırk çeşitliliği gibi etmenlerin rol oynadığı belirtilmektedir. ^{2,6,8,15} Bu çalışmada pnömoni olgularına montafon ırkı 32, melez 26, holştayn 20, simental 16 ve yerli 6 hayvanda rastlanılmıştır. Örneklerin toplandığı bölgedeki hayvan popülasyonunun ağırlıklı olarak montafon ırkı hayvanlardan oluştuğu bilinmekle birlikte pnömonili aynı ırk hayvanlarda yüksek oranda yerli ırklarda ise daha düşük oranlarda saptandığı tespit edilmiştir.

Mikoplazma türlerinin izolasyonu ve identifikasyonundaki güçlükler nedeniyle hastalığın erken ve çabuk tanısının zor olduğu bildirilmektedir. ^{1,6,8,25,27,55} Ayrıca, Mikoplazma türlerinin solunum sistemi dışındaki diğer organlarda seyir eden hastalıklarda sürekli olarak izole edilmeleri bu mikroorganizmaların hastalıklardaki gerçek önemini göstermektedir. ¹⁵

Yapılan bu çalışma sonucunda Erzurum ilinde lezyonlu sığır akciğerlerinde PZR yöntemi ile yapılan araştırmada *M. bovis* etkeninin varlığına % 36 oranında rastlanmıştır. Ülkemizde bu konuda yapılan çalışmaların az sayıda olduğu dikkat çekmiştir. Marmara Bölgesi'nde buzağı pnömonileri üzerine yapılan bakteriyolojik bir araştırmada *M. bovis*'in prevalansının %7.5 olduğu bildirilmiştir.⁴³ Özen ve ark.⁶ tarafından 2009 yılında Kars ilinde yapılan başka bir çalışmada 100 pnömonili sığır akciğerinden alınan örnekler patolojik ve moleküler yöntemlerle araştırılmış ve *M. bovis*' e %4 oranında rastlandığı rapor edilmiştir. Bursa ilinde bakteriyolojik ve immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak yapılan bir çalışmada ise *M. bovis* prevalansı %26.71 olduğu bildirilmiştir.⁸ Dünya'da ise *M. bovis* varlığı üzerine yapılmış serolojik çalışmalarda; sığırlarda seropozitiflik oranı İtalya' da¹² %76, Danimarka'da ²⁸ %24, Macaristan'da ⁶⁵ % 11, Amerika Birleşik Devletleri' nde ⁶³ %41.1, Fransa'da ⁶⁶ %10-20 ve İngiltere'de ³⁶ ise % 22 olduğu rapor edilmiştir. Sunulan çalışmada 100 pnömonili örnek içerisinde PZR ile %36 oranında etken DNA' sı, immunohistokimya ve immunfloresan gibi tanı yöntemleri ile de %30 antijen varlığı saptanmış olup Erzurum ilinde kesime alınan sığırlarda lezyonlu akciğerlerde *M. bovis*'in yüksek oranlarda olduğu görülmüştür. Bildirilen bazı verilerin çok yüksek oranda bulunmasında, yapılan araştırmalarda toplanan numunelerin özellikle klinik olarak solunum sistemi hastalıkları belirtileri gösteren ve bu hastalıkların sürü problemi haline geldiği gruplardan temin edildiği dikkati çekmektedir.^{12,63,67} Yapılan bu araştırmada ise bir yıl süreyle mezbahada kesime alınan ve hastalık tablosu gösterip göstermediği bilinmeyen hayvanlar takip edilmiş ve pnömonili akciğer örnekleri toplanmıştır. Benzer şekilde örnek toplanan başka bir çalışmada da ⁸ % 26.71 oranında etken pozitifliği bildirilmiş olup bu sonucun yaptığımız çalışmada elde edilen verilere yakın olduğu dikkati çekmiştir. Özen ve ark.⁶ yaptıkları çalışmada pnömoni oranını %3.89,

pnömoniler içerisindeki *M. bovis* oranını ise %4 olarak bildirilmişlerdir. Araştırmacılar bu oranların düşük bulunmasında, bölge şartlarına uyum sağlamış dirençli yerli ırklardan oluşan hayvan popülasyonuna bağlı olabileceğini rapor etmişlerdir.⁶ Çalışmamızda örnek toplanan yerli ırklarda *M. bovis* pozitifliğe rastlanmamış olması sunulan veriyi desteklemektedir.

Genç hayvanlarda *M. bovis* üzerine yapılan deneysel ve doğal enfeksiyon çalışmalarında, solunum sisteminde hastalığın daha yaygın ve şiddetli görüldüğü bildirilmektedir.^{2,4,14,22,38,67} Bu durumun genç hayvanların immün sistemlerindeki yetersizlik, etkenin süte geçebilme özelliği ile diğer olumsuz predispozisyon faktörlerin etkili olduğu ileri sürülmüştür.^{8,9,14,22,39} Genç hayvanlarda yapılan farklı çalışmalarda; Romanya² 'da %31, İrlanda'da⁶⁸ %18, İtalya'da¹² ise %100 oranında tespit edilmiştir. Türkiye'de buzağı yetiştirme ünitesinden temin edilen 43 pnömonili akciğer örneğinin tamamında etkene rastlandığı rapor edilmiştir.⁷ Çalışmamızda incelenen hayvanların yaşlarına ulaşamamakla birlikte mezbaha kayıtları ve gözlemlerimiz ışığında ortalama 2 ve üzeri yaşlarda olduğu görülmüştür.

Akciğere solunum yoluyla alınan etkenlerin yoğunlukla kranial loplara yayıldığı bilinmektedir.^{14,22} Çalışmamızda da *M. bovis* tespit edilen akciğerlerde en çok kranial lopların etkilendiği tespit edilmiştir (Tablo.4.2). Bu durumun *M. bovis* etkenlerinin damlacık enfeksiyonu şeklinde yayıldığına dair bildirilen verileri^{17,18} destekler nitelikte olduğu düşünülmüştür.

M. bovis etkenlerine rastlanılan akciğer örnekleri üzerinde yapılan çalışmalarda histopatolojik bulguların geniş kazeifikasyon nekrozları ve çevresinde dejenere nötrofillerle çevrili yangısal hücre kuşağı ile karakterize olduğu bildirilmiştir.^{6,8,23,29,49} Bazı kaynaklarda ise *M. bovis* etkenlerine bağlı pnömoni olgularında akciğerde

histopatolojik olarak tipik peribronşiyoler lenfoid hiperplazi ile karakterize olan intersitisyel pnömonilerin ön planda olduğunu belirtmişlerdir.^{14,22,53}

Pnömoni sınıflandırmasında farklı yaklaşımlar mevcuttur. Ortatalı ve Çiftçi⁶⁴ mezbahaya yönelik yaptıkları çalışmada pnömonileri eksudatif pnömoniler (kataral, purulent ve purulent nekrotik bronkopnömoni), fibrinöz pnömoniler (fibrinli ve fibrinli nekrotik pnömoni) ve proliferatif pnömoniler ise; intersitisyel, bronkointersitisyel, atipik intersitisyel pnömoni başlıkları altında incelemiştir. Sunulan çalışmada *M. bovis* etkenlerine rastlanan örneklerin makroskobik ve mikroskobik incelenmesi sonucunda 16 örnekte intersitisyel pnömoni (%16), 7 örnekte bronkointersitisyel pnömoni (%7), 9 örnekte İrinli-nekrotik bronkopönmoni (%9) ve 4 örnekte ise fibrinli-nekrotik bronkopönmoni (%4) saptanmıştır. *M. bovis*' in izole edildiği farklı çalışmaların histopatolojik değerlendirmelerinde de farklı pnömoni tiplerinin gelişebildiği, bunların irinli-nekrotik^{2,8,11,29,49} fibrinli^{6,10,24} ya da intersitisyel pnömoniler olduğu rapor edilmiştir.^{14,22,38} Histopatolojik bulguların farklı seyir etmesinde *M. bovis* ile birlikte *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakteriler, *Parainfluenza tip 3 virus*, *Sığırların respiratorik sinsityal virüsü*, *Sığırların viral diyare virüsü* gibi virüslerle kombine enfeksiyon oluşturmaktan kaynaklandığı,^{2,8,6,14,16,22} ayrıca hayvanın direnci, etkenin miktarı ve patojenitesinin de etkili olduğu bildirilmiştir.^{14,16,22} Son yıllarda yapılan multidisipliner çalışmalarda *M. bovis* pozitif olgularda aynı zamanda *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Manheimia haemolytica*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakteriyel ve yine BVD, BRSV gibi viral etkenlerinde izole edildiği rapor edilmiştir.^{2,23,69,70} Pryslak ve ark.⁶⁹ yaptıkları deneysel bir çalışmada; BVD + *M. bovis* enfeksiyonu oluşturulan hayvanlarda intersitisyel bronkopnömoni tablosu, BHV-1 + *M. bovis* enfeksiyonu oluşturulan hayvanlarda kazeonekrotik bronkopnömoni tablosu, sadece *M.*

bovis ile enfeksiyon oluşturulan hayvanlarda ise fibrinli bronkopnömoni tablosunun mevcut olduğunu rapor etmişlerdir.⁶⁹ Benzer şekilde Shahriar ve ark.²⁴ tarafından yapılan, nekroz ve fibrinli plöritisle ilişkilendirilmiş başka bir çalışmada bakteriyolojik olarak yapılan ekimlerde, 18 adet *M. bovis* pozitif olgunun 6'sında *Pasteurella multocida*, 4'ünde *Histophilus somni*, 3'ünde *Manheimia haemolytica*, 2'sinde *Arconobacterium pyogenes*, 2'inde *Escherichia coli* ve 1'inde *Pseudomonas aeruginosa* izole edilmiştir. Aynı çalışmada *M. bovis* ile birlikte 2 olguda BVDV ve 1 olguda ise BRSV tespit edilmiştir.

Sığırlarda *M. bovis* üzerinde yapılan deneysel bir çalışmada, enfekte akciğer dokularında goblet hücrelerinde hiperplazi ve metaplazi ile birlikte müsin salgısı artışının geliştiği ve bu bulguların enfeksiyonun şiddetiyle doğru orantılı olarak arttığı rapor edilmiştir.¹⁰ Çalışmamızda *M. bovis* pozitif örneklerle yapılan PAS boyamalarda goblet hücrelerinde hiperplazi ve müsin salgısı artışı gibi benzer bulgular dikkati çekmiştir.

Mikoplazma enfeksiyonlarında antibiyotik kullanımı, kontaminasyon ve çapraz reaksiyonlar sonucu elde edilen hatalı sonuçların kültür ve serolojik testlerin güvenilirliğinin sorgulanmasına neden olduğu bildirilmektedir.^{15,71} Yapılan bir araştırmada *M. bovis* izolasyonu için sığırlarda bronşiyö-alveoler lavaj ve nasal swap örneklemede güvenilirlik açısından nasal swap örnekleme yönteminin tercih edilmemesi gerektiği ortaya konulmuştur.⁷¹ Ayrıca, makroskopik lezyon göstermeksizin etkeni akciğerlerinde bulundurabilen hayvanların olabileceği ve hastalığı geçirmiş olan hayvanların uzun süre seropozitif oldukları göz önünde bulundurulduğunda, yapılacak serolojik testlerde sonuçların çok daha yüksek olarak bulunabileceği bildirilmiştir.¹⁵ Güncel çalışmalarda PZR, kültür, ELISA, SDS-PAGE, nükleik asit hibridizasyon tanı yöntemleri kıyaslanmış ve PZR tekniği diğer bütün tekniklerden daha hassas ve spesifik

bir yöntem olarak nitelendirilmiştir. ^{2,6,9,55,72,73} Bununla birlikte *M. bovis*'in referans suşları ile sahada karşılaşılan suşları arasında farklılık bulunduğu PZR ile ortaya konmuştur.⁷⁴

Birçok araştırmacı etkenin lezyonlu bölgede varlığının ortaya konması açısından immunohistokimya yöntemlerini çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanmışlardır.^{8,12,24,37,49,50,75,76}

M. bovis etkenleri irinli nekrotik bronkopnömoni olguları başta olmak üzere fibrinli bronkopnömoni, kronik intersitisyel pnömoni olgularında tespit edilmiş ve özellikle nekrotik bronkopnömoni olgularıyla ilişkilendirmiştir.^{6,8,11,20,24,49} Khodakaram ve ark.²³ immunhistokimyasal yöntemlerle yaptıkları bir çalışmada doğal enfekte olan ve kazeonekrotik bronkopnömoni tanısı konan sığır akciğerlerinde *M. bovis* etkenlerini ortaya koymuşlardır.

İmunohistokimyasal olarak yapılan farklı çalışmalarda *M. bovis* antijenlerine makrofajların sitoplazmalarında,^{8,19,37,50} nekroz alanında ekstraselüler olarak^{8,11,49} eksudat içeren bronş lümenlerinde ^{8,11} ve bronşiyol epitellerinde^{8,12} rastlandığı bildirilmiştir. Sunulan çalışmada 11 intersitisyel, 6 bronkointersitisyel, 9 İrinli-nekrotik ve 4 fibrinli pnömoni tanısı konan toplam 30 örnekte immunohistokimyasal boyamada etken pozitif olarak değerlendirildi. Yapılan incelemelerde pozitif reaksiyonlara başta yangı hücrelerinin sitoplazmaları olmak üzere bronş, bronşiyol ve alveol epitellerinde ve nekrotik alanlarda rastlandı. Bu çalışmada immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak saptanan antijenik lokalizasyonlara ait bulguların önceki çalışmalarla ^{8,10-12} uyumlu olduğu görülmüştür.

İmunohistokimyasal olarak yapılan diğer çalışmalarda genital organlarda, abort fötusun beyinde, karaciğerinde ve doğum yapan hayvanlarda plasentada *M. bovis* antijenlerine rastlandığı bildirilmiştir.^{29,37}

Yapılan literatür taramalarında *M. bovis* için immunofloresan boyama metodu uygulamasına rastlanılmadı. Bu çalışmada floresans boyamada alınan sonuçların immunohistokimyasal sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür. Spesifik olmayan arka plan boyanmalarının ayırt edilmesinde floresans boyama yöntemi, immunohistokimyasal metoda kıyasla daha hassas ve daha kullanışlı bir metod olarak değerlendirilmiştir. Ancak, floresan boyamalarda ışınım şiddetinin hızla azalması dolayısıyla değerlendirmede kısıtlı süreye sahip olunması bu metodun dezavantajı olarak görülmüştür.

Çalışmamızda *M. bovis* etken DNA'sının ekstraksiyonu için farklı süreler uygulandı. Bu amaçla doku eritici lizis buffer solüsyonları eklendikten sonra 6, 12, 24 ve 48 saat süre ile 57°C etüvde bekletilmiştir. 6-12 saat süre ile yapılan ekstraksiyonlarda PZR pozitif bant gözlenmedi. 24 saat süre ile ekstraksiyona tabi tutulmuş, irinli-nekrotik ve fibrinli-nekrotik bronkopnömoni olgularında PZR pozitif bantlara rastlanmıştır. İntersitisel pnömoni örneklerde ise 24 saatlik ekstraksiyon süresinde pozitif bant gözlenmemiştir. Bu örneklerin ekstraksiyon süresi 48 saate çıkartılmış ve intersitisel pnömoni olgularında da PZR pozitifliğe rastlanmıştır. Ekstraksiyon denemeleri 60 saat süreli olarak devam etmiş ancak yeni bir bant oluşumu görülmemiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda *M. bovis* DNA ekstraksiyon süresinin 48 saate kadar sürdürülmesinin uygun olacağı sonucuna varılmıştır. Yapılan çalışmalarda bronkointersitisel pnömonilerde *M. bovis* etkenlerinin sayıca az olduğu bildirilmiştir.^{12,38} Çalışmamızda sunulan immunohistokimyasal veriler dikkate alındığında (Tablo 4.4) İrinli-nekrotik ve fibrinli-nekrotik bronkopnömoni olgularında bronş, bronşiyol ve alveol epitelleri, yargısal eksudat ve nekroz alanlarında antijen lokalizasyonlarına rastlanırken intersitisel ya da bronkointersitisel pnömoni örneklerinde sınırlı lokalizasyonlar gözlenmiştir. *M. bovis* etkenini PZR ile ortaya

konulan çalışmalar incelendiğinde özellikle irinli-nekrotik bronkopnömoni olgularında pozitifliğin rapor edildiği dikkati çekmiştir.^{2,6,8,29,38} Yapılan deneysel bir enfeksiyon modelinde *M. bovis* etkenlerinin irinli-nekrotik pnömonilere neden olduğu izlenmiş ve elektron mikroskopu ile yapılan araştırmalar sonucunda bu tip pnömonilerde *M. bovis* etkenlerine çoğunlukla nekrotik alanlarda serbest halde daha az olarak ise makrofajların sitoplazmalarında rastlandığı rapor edilmiştir.¹¹ Etkenin immunohistokimyasal olarak ortaya konulması için yapılan farklı birçok çalışmalarda da irinli - nekrotik pnömoni gözlenen olgular *M.bovis* ile daha çok ilişkilendirilmiştir.^{2,8,12,27,49}

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, pnömonili akciğer örneklerinin incelendiği bu çalışmada, *M. bovis* etkenine PZR sonuçlarına göre %36, immunohistokimya ve immunfloresan boyamalarda ise aynı zamanda PZR pozitif olan örneklerde %30 oranında rastlandı. Elde edilen bu veriler değerlendirildiğinde, sığır pnömonilerinde *M. bovis* etkeninin oldukça yaygın olduğu görülmüştür. Tanı yöntemleri içerisinde literatürde referans metod olarak gösterilen ve bu çalışmada da kullanılan PZR metodunun güvenilirlik ve hassasiyeti bilinmekle birlikte *M. bovis* etkeninin lezyonlu dokudan alınan numune ile PZR yöntemi kullanılarak ortaya konulması açısından yapılan ekstraksiyon yöntemlerinde optimizasyon işleminin, sağlıklı sonuçlar elde edilmesi açısından önemli bir yer tuttuğu kanısına varılmıştır.

Yeterli havalandırma sistemi ve hijyenik koşullar sahip olmayan barınaklarda yetiştirilen hayvanlar, *M. bovis* ve sinerjik olarak enfeksiyon oluşturan diğer etkenlerin oluşturduğu pnömonilere açık hale gelmektedir. Bu bilgiler ışığında çalışmada Dünya’da giderek artan prevalans değerleri sebebiyle üzerinde durulması gereken hastalık etkenleri arasında gösterilen *M. bovis*’in, ülkemizde de dikkate alınması gereken enfeksiyonlar arasında olduğu kanısına varılmıştır. Söz konusu hastalık etkeninin normal floralarda bulunabilmesi ve enfeksiyon oluşturmak için uygun ortam ve koşulları beklemesi hayvanlar için bu tehditin süreklilik arz ettiğini göstermektedir. *M. bovis* etkenine rastlanan hayvanlarda pnömoni olgularının farklı yaygınlıkta ve farklı patolojik karakterde olduğu ve bu değişikliklerin görülmesinde sinerjik enfeksiyon varlığı, hayvanın yaşı, beslenmesi, yaşadığı çevresel iklim ve sürü sağlığı hizmetlerinin sunulmasına bağlı olarak değişebileceği kanısına varılmıştır. Bununla birlikte yapılan tedavi ve aşılama çalışmalarında istenen etki ve başarı sağlanamadığı bildirilmiştir.⁷⁷⁻

^{80,81,82} Dolayısıyla bu hastalığa karşı koruyucu ve önleyici tedbirlerin daha çok üzerinde

durulması gerekliliği ön plana çıkmaktadır.^{4,6,8,15,80} Bu bağlamda yetiştiricilerin ve veteriner hekimlik hizmeti sunan birimlerin uyarılması ve birbirleri ile koordineli olarak çalışma yapmaları önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Nicholas RAJ, Ayling RD, Stipkovits LP. An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*: clinical, cultural, serological and pathological findings, *Vaccine*, 2002, 20; 3569-3575.
2. Giovannini S, Zanoni MG, Salogni C, Cinotti S, Alborali GL. *Mycoplasma bovis* infection in respiratory disease of dairy calves less than one month age. *Resaerch in Veterinary Sciences*, 2013, 95; 576-579.
3. Amram E, Freed M, Khateb N, Mükula I, Blum S, Spargser J, Sharir B, Ozeri R, Harrus S, Lysnyansky I. Multiple locus variable number tandem repeat analysis of *Mycoplasma bovis* isolated from local and imported cattle, *The Veterianary Journal*, 2013, 197; 286-290.
4. Maunsell FP, Donovan GA, Risco C, Brown MB. Field evaluation of a *Mycoplasma bovis* bacterin in young dairy calves. *Vaccine*, 2009, 27; 2781-2788.
5. Righter DJ, Rurangirwa FR, Call DR, McElwan TF. Develepment of a bead-based multiplex PCR assay for the simultaneous detection of multiple *Mycoplasma* species. *Veterinary Microbiology*, 2011, 153: 246-256.
6. Özen H, Karaman M, Şahin M, Özcan K. Pnömonili sığırlarda *Mycoplasma bovis*, *M. dispar*, *M. bovirhinis* ve *M. mycoides subsp. mycoides* (küçük koloni tipi)' in PZR ile belirlenerek patolojik bulgularının incelenmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2009, 15; 125-133.
7. Özdemir U, Evans D, Türkyılmaz MA, Ateşoğlu A, and Nicholas RAJ, Isolation of *Mycoplasma bovis* and other respiratory disease pathogens from acut an chronic pneumonic lung samples in a calf rearing unit in Turkey. In mycoplasmaology – a review of developments over the las decade, Gran Canary, Canary Islands in Spain 10-12 june 2009.
8. Yılmaz R. Sığırlarda *Mycoplasma bovis* Pnömonilerinde Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Bulgular. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Patoloji Anabilim Dalı. Doktora tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi, 2009
9. Karahan M, Kalin R, Atil E, Çetinkaya B. Detection of *Mycoplasma bovis* in cattle with mastitis and respiratory problems in eastern Turkey. *Veterinary Record*, 2010, 166: 827-829.

10. Wawegama NK, Kanci A, Marenda MS, Mansell PD, Browning GF, Markham PF. Histochemical and morphometric characterization of bronchopneumonia in calves caused by infection with *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Microbiology*, 2012,158: 220-224.
11. Kleinschmidt S, Spargser J, Rosengarten R, Hewicker Trautwein M. Long-term survival of *Mycoplasma bovis* in necrotic lesions and in phagocytic cells as demonstrated by transmission and immunogold electron microscopy in lung tissue from experimentally infected calves. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162; 949-953.
12. Radelli E, Luini M, Loria GR, Nicholas RAJ, Scanziani E. Bacteriological, serological, pathological and immunohistochemical studies of *Mycoplasma bovis* respiratory infection in veal calves adult cattle at slaughter. *Research in Veterinary Sciences*, 2008, 85; 282-290.
13. Tamada Y, Ohura K, Kato K, Kimura K, Maeda T. *Mycoplasma bovis* infection in calves with ear drops. *Journal of the Hokkaido Veterinary Medical Association*. 2002, 46; 308-311.
14. McGavin MD, Zachary JF. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 4th ed. by Mosby inc. 11830 Westline Industrial Drive St. Louis, Missouri 63146, 2007: 500-530.
15. Nicholas R, Ayling R, McAulliffe L. Bovine respiratory disease in: *Mycoplasma Disease of Ruminants*, CAB international, Oxfordshire, UK, 2008; 132-161.
16. Aebi M, Bodmer M, Frey J, Pilo P. Herd-specific strains of *Mycoplasma bovis* in outbreaks of mycoplasmal mastitis and pneumonia. *Veterinary Microbiology*, 2012, 157. 363–368.
17. Whithear KL, Browning GF. *Mycoplasma*. In: Gyles CL, Prescott JF (eds). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 3rd ed. Iowa, Blackwell Publishing, 2004: 397-411.
18. Walker RL. Mollicutes, Editors: Hirsh DC, Zee YC, *Veterinary Microbiology*, 3^{ed}, Blackwell Publishing, Iowa, 1999: 165-172,
19. Stipkovits L, Ripley P, Varga J, Pálfi V. Clinical study of the disease of calves associated with *Mycoplasma bovis* infection. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2000, 48(4):387-95.

20. İssi M, Eröksüz Y, Öngör H, Gül Y, Kaya M, Çevik A. Enzootik pnömoni semptomları görülen bir besi sığırı işletmesinde *Mycoplasma bovis* enzootik enfeksiyonu. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*. 2015 10; 39-45.
21. Milli ÜH, Hazıroğlu R, *Veteriner Patoloji*. 2. Baskı. Ankara. Tamer Matbaacılık. 2001: 2. Cilt. 31-104.
22. Caswel JL, and Willams KJ. Respiratory system in: *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 5th ed. 2007: 523-629.
23. Khodakaram-Tafti A, Lopez A, Immunohistopathological findings in the lungs of calves naturally infected with *Mycoplasma bovis*. *Journal of Veterinary Medicine*, 2004, 51: 10-14.
24. Shahriar FM, Clark EG, Janzen E, West K, Wobeser G. Coinfection with bovine viral diarrhea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia, *The Canadian Veterinary Journal*, 2002, 43: 863–868.
25. Arcangioli MA, Aslan H, Tardy F, Pourmarat F, Le Grand D. The use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Mycoplasma bovis* in French calf feedlots. *Veterinary journal*, 2012, 192: 96-100.
26. Nagatomo H, Shimizu T, Higashiyama Y, Yano Y, Kuroki H, Haman K. Antibody response to *Mycoplasma bovis* of calves introduced to a farm contaminated with the organism. *Journal of Veterinary Medical Sciences*. 1996, 58; 919-920.
27. Adamu JY, Wawegama NK, Browning GF, Markham PF. Membrane proteins of *Mycoplasma bovis* and their role in pathogenesis. *Research in Veterinary Science*, 2013, 95: 321-325.
28. Kuiluka LJM, Ojeniyi B, Friis NF. Increasing prevalence of *Mycoplasma bovis* in Danish cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2000, 41: 139-146.
29. Maeda T, Shibahara T, Kimura K, Wada Y, Sato K, Imada Y, Ishikawa Y, Kadota K. *Mycoplasma bovis*-associated suppurative otitis media and pneumonia in bull calves. *Journal of Comparative Pathology*, 2003, 129; 100-110.
30. Walz PH, Mullaney TP, Render JA, Walker RD, Mosser T, Baker JC. Otitis media in preweaned *Holstein* dairy calves in Michigan due to *Mycoplasma bovis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1997, 9: 250-254.

31. Dyer N, Register KB, Miskimins D, Newell T. Necrotic pharyngitis associated with mycoplasma bovis infections in American bison(Bison bison). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2013, 25; 301-303.
32. Sylla L, Stradaoli G, Manuali E, Rota A, Zelli R, Vincenti L, Monaci M. The effect of *Mycoplasma mycoides ssp. Mycoides* LC of bovine origin on in vitro fertilizing ability of bull spermatozoa and embryo development. *Animal Reproduction Science*, 2005, 85: 81–93.
33. Ghanem EM, Higuchi H, Tezuka E, Ito H, Devkota B, Izaike Y, Osawa T. Mycoplasma infection in the uterus of early postpartum dairy cows and its relation to dystocia and endometritis. *Theriogenology*, 2013, 79:180–185.
34. Wooley L K, Fell S, Gonsalves JR, Walker MJ, Djordjevic SP, Jenkins C, Eamens GJ. Evaluation of clinical, histological and immunological changes and qPCR detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tissue during the eraly stages of mycoplasmal pneumonia in pigs after experimental challenge with two field isolates. *Veterinary Microbiology*, 2012, 161; 186-195.
35. D'Angelo AR, Di Provvido A, Di Francesco G, Sacchini F, De Caro C, Nicholas RA, Scacchia M. Experimental Infection of Goats with an Unusual Strain of *Mycoplasma mycoides subsp. Capri* Isolated in Jordan. *Journal of Compharative. Pathology*, 2009, 141: 121-126.
36. Ayling R, Nicholas R, Hogg R, Wessels J, Scholes S, Byrne W, Hill M, Moriarty J, Brien T. *Mycoplasma bovis* isolated from brain tissue of calves, 2005, 156: 391-392.
37. Hermeyer K, Peters M, Brüggmann M, Jacobsen B, Trautwein MH. Demonstration of *Mycoplasma bovis* by immunohistochemistry and in situ hybridization in an aborted bovine fetüs an neonatal calf, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2012, 24(2); 364-369.
38. Gabinaitiene A, Siugzdaite J, Zilinskas H, Siugzda R, Petkevicius S. *Mycoplasma bovis* and bacterial pathogens in the bovine respiratory tract, *Veterinarni Medicina*, 2011, 56(1); 28-34.
39. Rosengarten R, Citti C. The role of ruminant mycoplasmas in systemic infection. In *Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenecity, Diagnostics, Epidemiology and Moleculer Genetics*. Vol. 3. Eds. L. Stipkovitis J. Frey europen comission. 1999, 71-74.

40. Allen JW, Viel L, Bateman KG, Rosendal S, Shewen PE, Physick-Sheard P. The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: associations between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 1990, 155; 341–346.
41. Tschopp R, Bonnemain P, Nicolet J, Burnens A. Epidemiologische studie der risikofaktoren für *Mycoplasma bovis*-infektionen bei mastkälbern. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 2001,143; 461–467.
42. Thomas A, Ball H, Dizier I, Trolin A, Bell C, Mainil J, Linden A. Isolation of mycoplasma species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium. *Veterinary Record*, 2002; 472–476.
43. Erdağ O, Erdoğan G, Türkaslan J, Gürel A. Buzağı ve dana pneumonilerinde *Mycoplasma* ve bakteriyel etkenlerin izolasyon, identifikasyon ve antibiyotik duyarlılıkları. *Animal Information*, 1995, 112: 115-119.
44. Çakar L, Şahin G, Yemen N. Solunum. İçinde: *Tıbbi Fizyoloji*, Çavuşoğlu H, Yeğen BÇ,(çeviri editörleri) Textbook of Medical Physiology, Guyton AC, Hall JE. 12. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2013: 468-532.
45. Budras KD, Wünsche A. *Veterinary Anatomy*. Tercüme: Beşoluk K: Veteriner Anatomi Atlası. Medipres Matbaacılık Ltd. Şti. Malatya. 2009; 90-100
46. Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. *Veterinary Anatomy*. Saunders Elsevier. Riverport Lane, St Luis, Missouri 63043. 2002: 677-698
47. Bahadır A, Yıldız H. Veteriner Anatomi. Güven Mücellit Matbaacılık Ltd. Şti. Bağcılar- İstanbul. 2010; 241-244
48. Eurell JA, Frappier BL. *Dellman's Text Book of Veterinary Histology*. 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA. Blackwell publishing, 2006.
49. Schott C, Cai H, Parker L, Bateman K G, Caswell L. Hydrogen peroxide production and free radical mediated cell stress in *Mycoplasma bovis* pneumonia. *Journal of Comparative Pathology*, 2013; 1-11.
50. Gagea MI, Bateman KG, Shanahan RA, Dreumel T, McEwan BJ, Carman S, Archambault M, Caswell JL. Naturally occurring *Mycoplasma bovis*-associated pneumonia and polyarthritis in feedlot beef calves, *Journal of Diagnostic Investigation*, 2006, 40; 29-40.

51. Brown DR, Whitcomb RF, Bradbury JM. Revised minimal standards for description of new species of the class mollicutes (Division Tenericutes). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57: 2703-2719.
52. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC. Mycoplasmas, Editors: Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC, Veterinary microbiology and microbial disease, Blackwell Publishing, Iowa, 2002; 189-195.
53. Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4th ed. Blackwell Publishing Professional 2121 State Avenue, Iowa 50014, USA, 2001: 397-411.
54. Pfützner H. Epizootiology of the *Mycoplasma bovis* infection of cattle. *Zentralblatt für Bakteriologie Supplement*, 1990, 20: 394-399.
55. Rosetti BC, Frey J, Pilo P. Direct detection of *Mycoplasma bovis* in milk and tissue samples by real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 2010, 24; 321-323.
56. Lee KH, Lee JW, Wang SW, Liu LY, Lee MF, Chuang ST, Shy YM, Chang CL, Wu MC, Chi CH. Development of a novel biochip for rapid multiplex detection of seven mastitis-causing pathogens in bovine milk samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2008, 20: 463-471.
57. Wiggins MC, Woolums AR, Hurley DJ, Sanchez S, Esley DT, Donovan D. The effect of various *Mycoplasma bovis* isolates on bovine leukocyte responses. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease*, 2011, 34; 49-54.
58. Bailao AM, Parente JA, Pereira M, Soares CMA. Kinases of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and strain of *Mycoplasma synoviae*: an overview. *Genetics and Molecular Biology*, 2007, 30: 219-224.
59. Maunsell F, Brown MB, Powe J, Ivey J, Woolard M, Love W, Simecka JW. Oral inoculation of young dairy calves with *Mycoplasma bovis* results in colonization of tonsils, development of otitis media and local immunity, *Plos ONE*, 2012, 7(9); e44523.
60. Aebi M, Van den Borne BHP, Raemy A, Steiner A, Pilo P, Bodmer M. *Mycoplasma bovis* infections in Swiss dairy cattle: a clinical investigation. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2015, 57:10.

61. Kinde H, Daft BM, Walker RL, Charlton BR, Petty R. *Mycoplasma bovis* associated with decubital abscesses in Holstein calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1993, 5: 194–197.
62. Presnell J, Schreibman MP. *Animal Tissue Techniques*. 5th ed. London. The Johns Hopkins University Press Ltd, 1997: 269-271.
63. Soehnlen MK, Kunze ME, Karunathilake E, Henwood BH, Karyawasam S, Wolfgang DR, Jayarao BM. In vitro antimicrobial inhibition of *Mycoplasma bovis* isolates submitted to the Pennsylvania Animal Diagnostic Laboratory using flow cytometry and broth microdilution method. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2011, 23(3); 547-551.
64. Ortatatlı M, Çiftçi MK. Konya bölgesi mezbahalarında kesilen besi danalarında pnömonilerin insidensi ve patolojisi. *Veterinarium*, 2005, 16; 24-35.
65. Tenk M, Stupkovits L, Hufnagel L. Examination of the role of *Mycoplasma bovis* in bovine pneumonia and a mathematical model for its evaluation. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2004, 52: 445-456.
66. Grand DL, Calavas D, Brank M, Citti C, Rosengarten R, Be'zille P, Poumarat F. Serological prevalence of *Mycoplasma bovis* infection in suckling beef cattle in France *Veterinary Record*, 2002, 150: 268-273.
67. Akan M, Babacan O, Torun E, Müştak HK, Öncel T. Diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cattle by ELISA and PCR. *Kafkas üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2014, 20(2); 249-252.
68. Byrene WJ, McCormack R, Brice N, Egan J, Markey B, Ball HJ. Isolation of *Myoplasma bovis* rom bovine clinical samples in Republic of Ireland. *Veterinary Record*, 2001, 148: 331-333.
69. Prysliak T, Vander Merwe J, Lawman Z, Wilson D, Townsend H, Van Drunen Littel-van den Hurk S, Perez-Casal J. Respiratory disease caused by *Mycoplasma bovis* is enhanced by exposure to bovine herpes virus 1 (BHV1) but not to bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 2. *Canadian Veterinary Journal*, 2011, 52; 1195-1202.
70. Poumarat F, Grand DL, Philippe S, Calavas D, Schelcher F, Cabanie P, Tessier P, Navetat H. Efficacy of spectinomycin against *Mycoplasma bovis* induced pneumonia in conventionaly reared calves. *Veterinary Microbiology*, 2001, 80: 23-35.

71. Thomas A, Dizier I, Trolin A, Mainil J, Linden A. Comparison of Sampling procedures for Isolating pulmonary Mycoplasmas in cattle. *Veterinary Research Communications*, 2002, 26(5): 333-339.
72. Cai HY, Bell-Rogers P, Parker L, Prescott JF: Development of a real-time PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2005,17; 537-545.
73. Butler JA, Pinnow CC, Thomson JU, Levisohn S, Rosenbusch RF. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to investigate *Mycoplasma bovis* outbreaks. *Veterinary Microbiology*, 2001, 78: 175-181.
74. Salam HSH, Hotzel H. Investigation of phenotypic variations amongst *Mycoplasma bovis* field German isolates using SDS-PAGE. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 2013, 2(2): 103-107.
75. Haines DM, Martin KM, Clark EG, Jim GK, Janzen ED. The immunohistochemical detection of *Mycoplasma bovis* and bovine viral diarrhea virüs in tissues of feedlot cattle with chronic, unresponsive respiratory disease and/or arthritis. *The Canadian Veterinary Journal*, 2001, 142:857-860.
76. Thomas A, Sachse K, Farnir F. Adherence of *Mycoplasma bovis* to bovine bronchial epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 2003, 34: 141-148.
77. Soehnlen MK, Aydin A, Murthy KS, Lengerich EJ, Hattel AL, Houser BA, Fenton G. D, Lysczek HR, Burns CM, Townsend AM, Brooks JW, Wolfgang DR, Jayarao BM. Epidemiology of *Mycoplasma bovis* in Pennsylvania veal calves. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95: 247-254.
78. Anon. Chapter 2.1.6. Contagios Bovine Pleuropnömonia. In; Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. OIE ed. 5th ed. World Organizaton for Animal Health(OIE). 2004; [http:// www.oie.int](http://www.oie.int)
79. Zhang R, Han X, Chen Y, Mustafa R, Qi J, Chen X, Hu C, Chen H, Guo A. Attenuated *Mycoplasma bovis* strains provide protection against virulent infection in calves, *Vaccine*, 2014, 32; 3107-3114.
80. Jeff L. Caswell, Archambault M: *Mycoplasma bovis* pneumonia in cattle. *Animal Health Research Reviews*, 2008, 8(2): 161-186.
81. Vanden Bush TJ, Rosenbusch RF. Characterization of the immune response to *Mycoplasma bovis* lung infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2003, 94: 23-33.

82. Mulango M, Prysliak T, Perez Casal J. Vaccination of feedlot cattle with extracts and membrane fractions from two *Mycoplasma Bovis* isolates results in strong humoral immun responses but does not protect against an experimental challenge. *Vaccine*, 2013, 31: 1406-1412.

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı :Serdar ALTUN
Doğum tarihi 09.02.1985
Doğum yeri :Erzurum
Medeni hali : Bekar
Uyruğu : T.C.
Adres : Erzurum Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı
Tel : 0505 342 69 49
Faks :
E-mail : serdar.altun@atauni.edu.tr
Eğitim
Lise :Erzurum Anadolu Lisesi
Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Yüksek lisans : Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Patoloji Anabilim Dalı
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce : 71.25
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler
- Sinema, Tiyatro, Bilgisayar teknolojileri

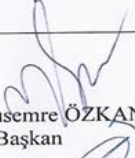
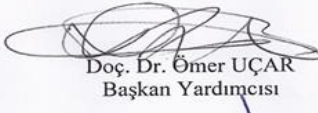
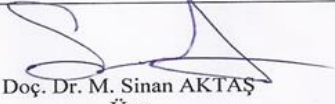
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ
ETİK ALT KURUL BAŞKANLIĞI
(AÜVFEAK)



ETİK KURUL KARARI

Karar Sayısı: 2013/8	Karar Tarihi: 7 Kasım 2013
Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Yavuz Selim Sağlam ve Araş. Gör. Serdar Altun tarafından sunulan “Pnömolini Sığır Akciğerlerinde Mycoplasma bovis Enfeksiyonunun Patolojik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması” adlı teze ait başvuru formu etik kurulumuz tarafından değerlendirilmiştir. Çalışmada 100 adet pnömonili organ mezbahadan toplanarak makroskobik ve mikroskobik incelemeler yapıldıktan sonra PZR yöntemi ile etkenin DNA molekülleri belirlenecektir. Sunulan tez çalışmasının Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi ilkelerine uygun olduğuna karar verilmiştir.	
 Prof. Dr. Yunusemre ÖZKANLAR Başkan	 Doç. Dr. Ömer UÇAR Başkan Yardımcısı
 Doç. Dr. Zekeriya ÖZÜDOĞRU Üye	 Doç. Dr. M. Sinan AKTAŞ Üye
 Yrd. Doç. Dr. Emre KARAKUŞ Üye	