

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MARMARA BÖLGESİNDE RUMİNANTLARDA GÖRÜLEN
ENTEROTOKSEMİ OLGULARININ HİSTOPATOLOJİK VE
İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULARININ
ARAŞTIRILMASI VE ELISA İLE TİPLENDİRİLMESİ**

Osman DOĞAN

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Mustafa ORTATATLI

KONYA-2023

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MARMARA BÖLGESİNDE RUMİNANTLARDA GÖRÜLEN
ENTEROTOKSEMİ OLGULARININ HİSTOPATOLOJİK VE
İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULARININ
ARAŞTIRILMASI VE ELISA İLE TİPLENDİRİLMESİ**

Osman DOĞAN

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Mustafa ORTATATLI

Bu araştırma, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 20212015 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2023

ÖNSÖZ

Doğada ve bağırsak florasında bulunan *C. perfringens*, ürettiği güçlü toksinleri ile insan ve hayvanlarda intestinal ve histotoksik enfeksiyonlara neden olan önemli bir patojendir. Bu mikroorganizma, ruminantlarda enterotoksemi ve klostridiyal miyozitise sebep olur. *C. perfringens* tip A, B, C, D ve E tarafından oluşturulan enterotoksemiler ruminantlarda ölümlere ve önemli ekonomik kayıplara neden olur. Enterotokseminin kesin teşhisi için bağırsak içeriğinde toksin varlığını belirleyen in-vivo Toksin Nötralizasyon Testi (TNT), ELISA, Lateks Aglütinasyon Testi ve PCR kullanılır.

Bu çalışmada Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü (PVKE)'ne gönderilen ruminantlara ait olgularda ELISA ile *C. perfringens* tiplerinin belirlenmesi, bu olguların histopatolojik ve etken düzeyinde immunohistokimyasal bulgularının araştırılması amaçlandı.

Bu doktora tez çalışması, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 20212015 proje numarası ile desteklenmiştir.

Doktora tez çalışmamın her aşamasında yardımcı olan, bilgi, tecrübe ve desteğini esirgemeyen başta danışman hocam Prof. Dr. Mustafa ORTATATLI olmak üzere; bu süreç içerisinde değerli görüş ve tecrübeleri ile bana ışık tutan Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri; Prof. Dr. Fatih HATİPOĞLU, Prof. Dr. Ertan ORUÇ, Prof. Dr. Mehmet TUZCU, Prof. Dr. Özgür ÖZDEMİR, Doç. Dr. M. Burak ATEŞ ve Arş. Gör. Zeynep ÇELİK'e; Yozgat Bozok Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde görevli Dr. Öğr. Üyesi Gökhan AKÇAKAVAK'a; tez çalışmam boyunca verdikleri her türlü destek için PVKE Müdürü Dr. Fahriye SARAÇ ve Teknik Birimler Koordinatörü Dr. Ayşe ATEŞOĞLU DEMİRCİ'ye; Clostridium Referans Laboratuvar Şefi Veteriner Hekim Demet YAMAN AYDOĞAN, Dr. Esra SATIR ve Dr. M.Engin MALAL'a; Viroloji Laboratuvarından Dr. Serol KORKMAZ'a; Patoloji Laboratuvar Şefi Veteriner Hekim Zeynel ARSLAN, Veteriner Hekim Murat ÇEĞİNDİR ve Laborant Reyhan KÖSTEK'e; doktora eğitimim boyunca her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan anne ve babama; tez projemi destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR	iv
ÖZET.....	vi
SUMMARY	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Etiyoloji	2
1.2. Tarihçe.....	3
1.3. <i>C. perfringens</i> 'in Majör Toksinleri.....	4
1.3.1. Alfa Toksin	5
1.3.2. Beta Toksin	7
1.3.3. Epsilon Toksin	8
1.3.4. Iota Toksin	9
1.3.5. Enterotoksin	10
1.3.6. Nekrotik β -Benzeri Toksin (NetB)	10
1.4. <i>C. perfringens</i> 'in Minör Virülans Faktörleri.....	10
1.5. <i>C. perfringens</i> Kaynaklı Hastalıkların Patogenezi	12
1.6. <i>C. perfringens</i> Kaynaklı Enterotoksemiler.....	16
1.6.1. <i>C. perfringens</i> Tip A Enterotoksemi.....	16
1.6.2. <i>C. perfringens</i> Tip B ve Tip C Enterotoksemi.....	18
1.6.3. <i>C. perfringens</i> Tip D Enterotoksemi.....	20
1.6.4. <i>C. perfringens</i> Tip E Enterotoksemi	24
1.7. Teşhis.....	24
1.8. Tedavi ve Koruma	27

2. GEREÇ VE YÖNTEM	29
2.1. Gereç	29
2.2. Yöntem	30
2.2.1. Makroskobik İnceleme	30
2.2.2. <i>C. perfringens</i> Toksinlerinin Tespiti.....	31
2.2.3. Histopatolojik İnceleme	31
2.2.4. İmmunohistokimyasal İnceleme	32
2.2.5. İstatistiksel İnceleme.....	33
3. BULGULAR	34
3.1. <i>C. perfringens</i> Toksinlerinin Tespiti	34
3.2. Makroskobik Bulgular	37
3.3. Histopatolojik Bulgular	51
3.4. İmmunohistokimyasal Bulgular	63
3.5. İstatistiksel Bulgular	74
4. TARTIŞMA	75
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	88
6. KAYNAKLAR	91
7. TURNİTİN RAPORU.....	102

SİMGELER VE KISALTMALAR

≈: Yaklaşık

BEC: *C. perfringens* binary enterotoksin

Ca⁺²: Kalsiyum iyonu

CFU: Colony-forming unit

Cl⁻: Klor iyonu

CPA/α: *Clostridium perfringens* alfa toksin

CPB/β: *Clostridium perfringens* beta toksin

CPB2: *Clostridium perfringens* β2 toksin

CPE: *Clostridium perfringens* enterotoksin

DAB: 3,3'-Diaminobenzidin

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ETX/ε: *Clostridium perfringens* epsilon toksin

FSE: Fokal simetrik ensefalomalasi

H&E: Hematoksilen eozin

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

HRP: Horseradish Peroxidase

IHC: İmmunohistokimya

ITX/ι: *Clostridium perfringens* iota toksin

K⁺: Potasyum iyonu

iK⁺: İntrasitoplazmik potasyum

kDa: Kilodalton

LC-MS: Sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi

LD₅₀: Lethal doz 50

MALDI-TOF: Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight

μm : Mikrometre

n: Örnek sayısı

Na^+ : Sodyum iyonu

NetB: *C.perfringens* nekrotik B-benzeri toksin

PAF: Trombosit aktive edici faktör

PBS: Fosfat Tamponlu Tuzlu Su

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PFO/ θ : Perfringolizin O/Theta

PFT: Gözenek oluşturan toksin (Pore forming toxin)

pH: Asitlik değeri

PLA_2 : Fosfolipaz A_2

PVCI: Pendik Veterinary Control Institute

PVKE: Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü

$\text{TNF-}\alpha$: Tümör nekroz faktör alfa

TNT: Toksin Nötralizasyon Testi

TpeL: *Perfringens* büyük toksin

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Bölgesinde Ruminantlarda Görülen Enterotoksemi Olgularının Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Bulgularının Araştırılması ve ELISA ile Tiplendirilmesi

Osman DOĞAN
Veterinerlik Patolojisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ /KONYA-2023

Bu çalışma, Marmara Bölgesi'ne bağlı 12 ilden (Balıkesir, Bilecik, Bursa, Çanakkale, Düzce, Edirne, İstanbul, Kırklareli, Kocaeli, Sakarya, Tekirdağ ve Yalova) Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne gönderilen enterotoksemi şüpheli farklı yaş ve türden (koyun, keçi ve sığır) toplam 150 adet ruminant üzerinde yapıldı. ELISA ile *C. perfringens* toksini tespit edilerek enterotoksemi olduğu doğrulanan olgularla toksin tespit edilemeyen hayvanlarda gözlenen makroskopik, mikroskopik ve etken düzeyinde immunohistokimyasal bulguların araştırılması ve karşılaştırılması, özellikle lezyonlu bölgelerdeki etken varlığının pozitif olgularla ilişkisinin saptanması amaçlandı.

ELISA ile enterotoksemi şüpheli hayvanlarda %12,67 (19/150) oranında *C. perfringens* toksinlerinden (alfa, beta ve epsilon) en az biri yönünden pozitiflik tespit edildi. Bu örneklerden 10 (%52,63)'u *C. perfringens* tip A, 1 (%5,26)'i *C. perfringens* tip C ve 8 (%42,11)'i *C. perfringens* tip D olarak tiplendirildi.

Pulmoner ödem, subepikardiyal peteşiyel kanama, karaciğerde diffuz solgun renk değişikliği ve kıvamında gevreklik, mezenteriyel lenf düğümlerinde büyüme ve bağırsaklarda sulu-gazlı içerikle birlikte serozal hiperemi enterotoksemili hayvanlarda makroskopik olarak yaygın şekilde gözlemlendi. Tip A ve tip C enterotoksemili hayvanlarda hemorajik enteritis; tip D enterotoksemili hayvanlarda ise beyinde hiperemi, serebellumun konikleşmesi ve kardiyopulmoner lezyonların daha sık görüldüğü dikkati çekti. Enterotoksemili hayvanlarda histopatolojik olarak hemorajik ya da fibrino-nekrotik enteritis, alveol lümeninde eozinofilik sıvı eksudasyonu ile karakterize pulmoner ödem, böbrek tubul epitellerinde dejenerasyon ve nekroz, hepatositlerde vakuoler dejenerasyon bulguları sıklıkla gözlemlendi.

Enterotoksemili ruminantlarda abomasum ve bağırsaklarda lezyonlu alanlarda çok sayıda kümelenmiş bakteriler görüldü. İndirekt immunohistokimyasal boyama metodu ile lezyonlu bağırsak bölümlerinde intralezyonel çubuk şeklindeki bakterilerin *C. perfringens* olduğu doğrulandı. Toksin tespit edilmeyen hayvanlarda %87,79, enterotoksemili hayvanlarda %100 oranında IHC pozitif reaksiyon belirlendi. Toksin tespit edilemeyen ruminantlarda pozitif reaksiyonlar lümeninde dökülmüş epitellerin olduğu alanlarda daha sık görülürken, enterotoksemili ruminantlarda nekrotik villus uçlarında, psödomembranlarda, lamina propria ve kriptlerde pozitif boyanmaların yoğunlaştığı belirlendi.

Sonuç olarak, ELISA ile toksin tespit edilen hayvanlarda gözlemlenen makroskopik lezyonlar ve histopatolojik bulgular klostridiyal enterotoksemi ile uyumlu bulundu. Bağırsaklarda gözlenen intralezyonel çubuk şeklindeki bakterilerin *C. perfringens* olduğu IHC ile doğrulandığı için, özellikle histopatolojik bulgular eşliğinde immunohistokimyasal incelemenin, üzerinden zaman geçmiş ve toksin tespiti yapılamayan şüpheli olgularda enterotoksemi teşhisine önemli katkı sağlayacağı kanaatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: *C. perfringens*; ELISA; Enterotoksemi; İmmunohistokimya; Patoloji.

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation of Histopathological and Immunohistochemical Findings of Enterotoxemia Cases in Ruminants in the Marmara Region and Typing them with ELISA

Osman DOĞAN
Department of Veterinary Pathology

PhD THESIS / KONYA-2023

This study was performed on a total of 150 ruminants of different ages and species (sheep, goats and cattle) with suspected enterotoxaemia sent to Pendik Veterinary Control Institute (PVCİ) from 12 provinces (Balıkesir, Bilecik, Bursa, Çanakkale, Düzce, Edirne, İstanbul, Kırklareli, Kocaeli, Sakarya, Tekirdağ and Yalova) of Marmara Region. It was aimed to investigate and compare the macroscopic, microscopic, and agent-level immunohistochemical findings observed in enterotoxemia cases in which *C. perfringens* toxin was detected by ELISA and in animals in which the toxin could not be detected and also aimed to determine in particular the relationship between the presence of the agent in the lesioned areas and positive cases.

In this study, positivity for at least one of the *C. perfringens* toxins (alpha, beta, and epsilon) was detected in %12,67 (19/150) of animals with suspected enterotoxemia by ELISA. Of these samples, 10 (%52.63) were typed as *C. perfringens* type A, 1 (%5.26) as *C. perfringens* type C, and 8 (%42.11) as *C. perfringens* type D.

Pulmonary oedema, petechial haemorrhage in the epicardium, diffuse pale discoloration and friable consistency in the liver, enlargement of mesenteric lymph nodes and serosal hyperaemia with watery-gaseous content in the intestine were commonly observed macroscopically in enterotoxaemic animals. It was observed that animals with type A and type C enterotoxemia were more hemorrhagic enteritis whereas animals with type D enterotoxemia were hyperemia in the brain, cerebellar coning and cardiopulmonary lesions. Histopathologically, hemorrhagic or fibrino-necrotic enteritis, pulmonary oedema characterised by eosinophilic fluid exudation in the alveolar lumen, degeneration and necrosis in renal tubule epithelium and vacuolar degeneration lesions in hepatocytes were frequently observed in animals with enterotoxaemia.

Numerous clustered bacteria were seen in the lesioned areas of the abomasum and intestines in ruminants with enterotoxemia. Indirect immunohistochemical staining confirmed that the intraluminal rod-shaped bacteria in the lesioned intestinal sections were *C. perfringens*. In animals without toxin detection and animals with enterotoxaemia, the IHC positive reaction rate was % 87,79 and %100 respectively. In ruminants without toxin detection, positive reactions were observed more frequently in areas with shed epithelium in the lumen, whereas in ruminants with enterotoxaemia, positive staining was concentrated in necrotic villus tips, pseudomembranes, lamina propria and crypts.

In conclusion, the macroscopic and histopathological lesions we observed in the animals in which toxin was detected by ELISA test were compatible with clostridial enterotoxaemia. Since the intraluminal rod-shaped bacteria observed in the intestines were confirmed to be *C. perfringens* by IHC, it was concluded that immunohistochemical examination, especially in the presence of histopathological findings, would make an important contribution to the diagnosis of enterotoxaemia in suspected cases in which time has passed since the death and toxin detection could not be performed.

Key Words: *C. perfringens*; ELISA; Enterotoxaemia; Immunohistochemistry; Pathology.

1. GİRİŞ

Enterotoksemi, terminolojik olarak bağırsaklarda üretilen toksinlerin kan dolaşımına geçmesiyle oluşan, genellikle perakut ve akut yüksek derecede ölümcül bağırsak kaynaklı bir toksemiye ifade eder. Bu hastalığa çeşitli mikroorganizmalar neden olabilir, ancak bu terim genellikle patojenik *Clostridium* türleri tarafından üretilen toksinlerin absorpsiyonu ile ilgili olarak sıklıkla kullanılır. Ruminantlarda enterotoksemiler *Clostridium perfringens* tiplerinin çeşitli toksinleri tarafından oluşturulur (Songer 1996, Popoff 1998). Enterotoksemi dünya üzerindeki koyun, keçi ve sığırları %24,13 ile %100 arasında değişen oranlarda etkiler (El Idrissi ve Ward 1992, Greco ve ark 2005). Ülkemizin farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda hastalığın prevalansının %5,3 ile %84,6 arasında değiştiği bildirilmiştir (Gökçe ve ark 2007, Arslan ve ark 2016). Enterotoksemi, yüksek ölüm oranı ve aşılama maliyetiyle hayvancılık işletmelerinde önemli ekonomik kayıplara neden olur.

Sahada enterotokseminin tanısında; klinik ve patolojik bulgular, uygun örneklerin mikrobiyolojik olarak incelenmesi ve bağırsak içeriğinde toksin saptanması gibi yöntemlerden yararlanılır. Kesin teşhiste en çok tercih edilen yöntem ise bağırsak içeriğinde *C. perfringens* toksinlerinin tespit edilmesidir. Toksinlerin belirlenmesi için Toksin Nötralizasyon Testi (TNT), PCR, ELISA ve Lateks Aglütinasyon Testi (LAT) kullanılır (Martin ve Naylor 1999, Uzal ve Songer 2008).

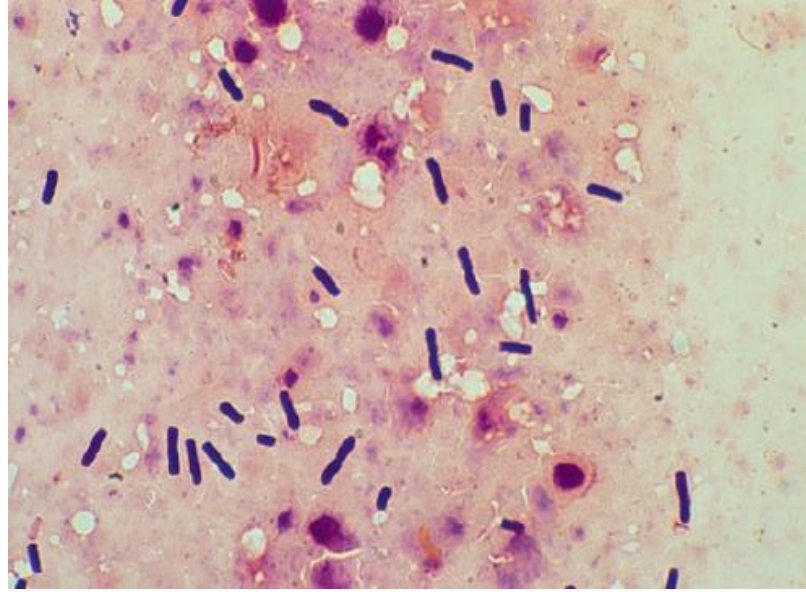
Ölüm sonrası numunelerin laboratuvara geç ya da uygun olmayan koşullarda ulaştırılması *C. perfringens* toksinlerinin hızlı şekilde bozulmasına ve hatalı negatif sonuçlara neden olabilir (Stiles ve ark 2013, Duracova ve ark 2018). İnsan ve hayvanlarda immunohistokimyasal (IHC) boyama yöntemleri ile *C. perfringens* ve toksinleri lezyonlu doku ve organlarda belirlenebilir (Diab ve ark 2012, Munday ve ark 2020).

1.1. Etiyoloji

Clostridium genusu, katalaz ve oksidaz negatif, gram pozitif, fermentatif ve çubuk şeklinde bakterilerden oluşur. Bazı türleri aerotolerant olmasına rağmen patojenik klostridium türlerinin çoğu anaerobiktir. Patojenik klostridiumların çoğunluğu hayvanların ve insanların bağırsak florasında bulunur ve endojen enfeksiyonlara neden olur. Diğer patojen türler ise toprakta daha yaygın olarak bulunur, yara kontaminasyonu veya oral ekzojen enfeksiyonlara yol açar. Patojen *Clostridium* türlerinin ana virulans faktörü, salgıladığı toksinlerdir. Bu patojenik türler, toksinlerin aktivitesi ve etkiledikleri dokulara göre dört kategoride gruplandırılır (Tablo 1.1). Enterotopatojenik türler arasında yer alan *Clostridium perfringens*; geniş çevresel varlığa sahip, insan ve hayvanların bağırsağında canlı kalmaya iyi adapte olan kısa çubuk şeklinde bir bakteridir (Şekil 1.1). Bu mikroorganizmanın optimum şartlardaki jenerasyon süresinin 10 dakikadan az olması; bağırsaklarda, gıdalarda ve yaralarda hızlı şekilde patojenik yüke ulaşmasını sağlar (McClane ve ark 2013).

Tablo 1.1. Patojenik klostridium türlerinin sınıflandırılması (Markey ve ark 2013'ten uyarlanmıştır).

Patojenik Klostridium Türleri			
Nörotoksik	Histotoksik	Enteropatojenik	Atipik
<i>C. tetani</i>	<i>C. chauvoei</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. piliforme</i>
<i>C. botulinum</i>	<i>C. septicum</i>	<i>C. difficile</i>	
	<i>C. novyi</i> tip A	<i>C. colinum</i>	
	<i>C. sordellii</i>	<i>C. spiroforme</i>	
	<i>C. novyi</i> tip B		
	<i>C. perfringens</i> tip A		



Şekil 1.1. Gram pozitif çubuklar. Bir kuzunun ince bağırsak smearında *C. perfringens* (Markey ve ark 2013).

1.2. Tarihçe

C. perfringens ilk kez 19. yüzyılın sonlarında, gaz kabarcıkları bulunan bir insan kadavrasından William Henry Welch ve George Nuttal tarafından izole edilmiştir. Günümüze kadar bu mikroorganizma bilim insanlarının onuruna istinaden ve fazla miktarda gaz oluşturması nedeniyle *Bacillus aerogenes capsulatus*, *Bacillus perfringens*, *Bacillus welchii* ve *Clostridium welchii* olarak adlandırılmıştır (Lucey ve Hutchins 2004, Rood ve ark 2018). 1920'li yılların sonlarında *C. perfringens* ile enterik hayvan hastalıkları arasında ilişki kurulmaya başlanmıştır. Daha sonraki yıllarda bu mikroorganizmanın insanlarda da gastrointestinal hastalıklara neden olabileceği belirtilmiştir (Songer 1996).

Bull ve Pritchett (1917) tarafından, *C. perfringens*'in lethal ekzotoksinler ürettiği gösterilmiştir. Wilsdon (1931) ise bu toksinleri w, x ve z olarak isimlendirmiş, toksin-antitoksin nötralizasyon tekniği temelinde mikroorganizmayı dört tipte sınıflandırmıştır. Bu sınıflandırma sistemi günümüzde halen kullanılan *C. perfringens* tiplendirme şemasının temeli olarak kabul edilir. Wilsdon'un gözlemleri daha sonra yapılan çalışmalarla doğrulanmış ve ilk olarak 1933'te α (w) toksin, β (z) toksin ve ϵ (x) toksin terimleri kullanılmıştır (Glenny ve ark 1933). 1943'te bir

buzağıda antiserumlar (α , β ve ϵ) tarafından nötralize edilemeyen bir toksinin (ι) üretildiği gösterilmiştir (Bosworth 1943). *C. perfringens* geleneksel olarak dört majör toksini (α , β , ϵ ve ι) üretme kabiliyetine göre beş kategoride (A, B, C, D ve E) sınıflandırılmıştır (Songer 1996). İlerleyen zamanlarda bu mikroorganizmanın çok sayıda toksin ve hidrolitik enzim ürettiği keşfedilmiştir. Enterotoksin (CPE) ve nekrotik β benzeri (NetB) toksinin keşfedilmesi ile sınıflandırılma sistemi revize edilerek güncellenmiştir (Keyburn ve ark 2008, Navarro ve ark 2018a) (Tablo 1.2).

Tablo 1.2. *C. perfringens* toksin tiplerinin sınıflandırılması (Navarro ve ark 2018a'den uyarlanmıştır).

Tip	Toksın Üretimi					
	α (CPA)	β (CPB)	ϵ (ETX)	ι (ITX)	CPE	NetB
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-
C	+	+	-	-	+/-	-
D	+	-	+	-	+/-	-
E	+	-	-	+	+/-	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+

CPA: Alfa toksin, CPB: Beta toksin, ETX: Epsilon toksin, ITX: Iota toksin, CPE: Enterotoksin, NetB: Nekrotik β benzeri toksin.

1.3. *C. perfringens*'in Majör Toksinleri

C. perfringens tarafından sayısı 20'yi bulan toksin ve virülans faktörü üretilir. Bu toksinlerden çoğu, hedef hücrelerin membranında bulunan bir reseptöre bağlanmayı, ardından hücre içi yolların aktivasyonu ve sonrasında hücre nekrozuna yol açan sitopatik etkilere sahiptir (Revitt-Mills ve ark 2015). Lokal ve sistemik etkileri bulunan toksinler birkaç dakika ile birkaç saat içinde canlılığın ölümüne neden olabilir (Uzal ve ark 2014). *C. perfringens* tarafından üretilen önemli toksinlere ait bilgiler Tablo 1.3'de özetlenmiştir.

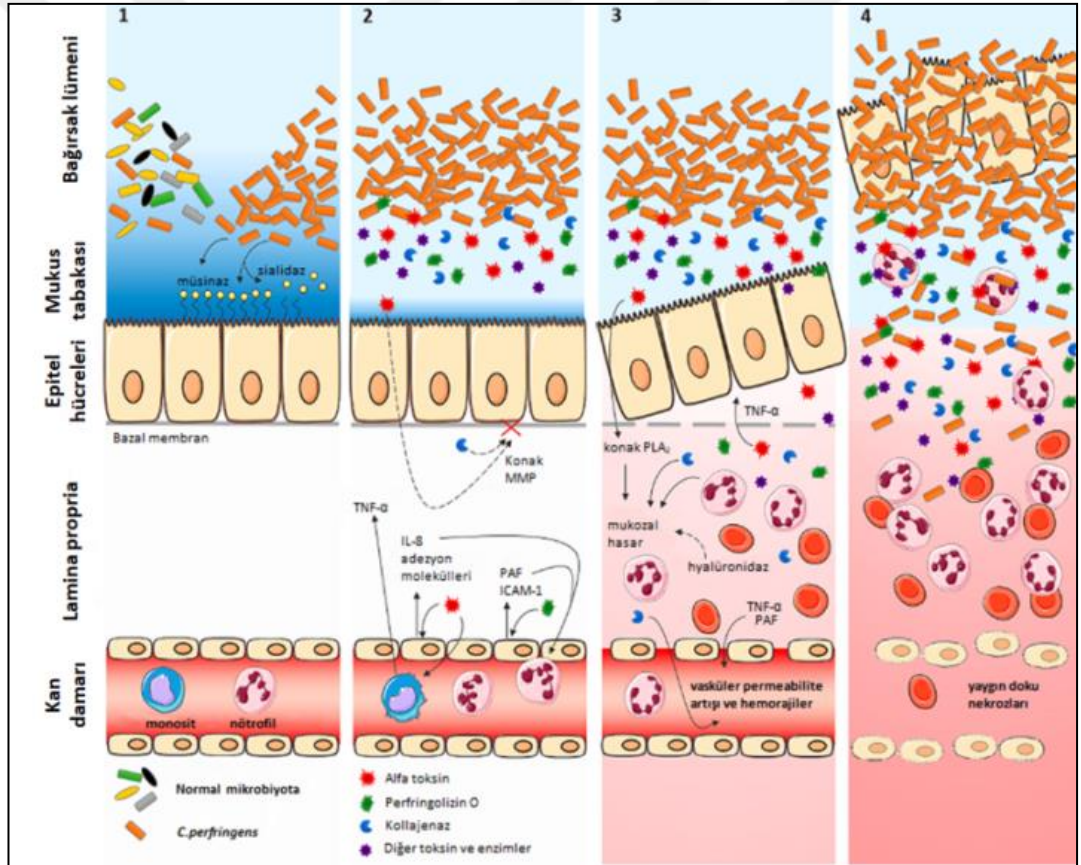
Tablo 1.3. *C. perfringens*'in tiplendirilmesinde kullanılan toksinlerin genel özellikleri (Uzal ve ark 2014'ten modifiye edilmiştir).

Toksin	Ana hedef	Biyolojik Aktivite	Tripsin ile Reaksiyonu
α	Fosfatidilkolin, Sfingomiyelin	Sitolitik, dermonekrotik, hemolitik ve letal	Duyarlı
β	Enterosit, Endotel hücresi, Duyusal nöronlar	Sitolitik, dermonekrotik, letal, intestinal mukozada hemorajik nekroz	İnaktive olur
ϵ	Endotel, nöron ve böbrek hücresi, Mukozal bağlantı noktaları	Dermonekrotik, letal, akciğer, karaciğer ve merkezi sinir sisteminde ödem, demiyelinizasyon, beyincik ve hipokampusta glutamat salınımını, böbrek tubul epitellerinde dejenerasyon	Aktive olur
ι	Hücre iskeleti	Dermonekrotik, letal ve hücre duvarının yıkımlanması	Aktive olur
CPE	Enterosit	Sitotoksik, eritematöz, letal, enterositlerden su ve iyon kaybı	Aktive olur
NetB	Enterosit	Hücreler arası bağlantının yıkımlanması	-

1.3.1. Alfa Toksin

Alfa toksin (α); 43 kDa ağırlığında, fosfolipaz C (lesitinaz) yapısında ve enzimatik aktiviteye sahip bir toksindir (Jewell ve ark 2015). Tüm *C. perfringens* tipleri tarafından üretilen α toksini kodlayan CPA geni kromozomal olarak yerleşmiştir (Titball ve ark 1999). Bu toksin, hücre duvarında bulunan lesitini, fosforilkolin ve digliseridlere hidrolize eder. Bu sayede toksin, hemoliz ve nekrotik etkisini hücre duvarına zarar vererek gösterir. Ayrıca alfa toksin, perfringolizin O ile sinerjik hareket ederek *C. perfringens*'in konak dokuda yaşamını sürdürmesine ve makrofajlardan kaçmasına katkı sağlar. Alfa toksin, insan ve hayvanlarda gazlı gangren (klostridial miyozitis) ile enterik hastalıklara neden olur (Naylor ve ark 1997, O'Brien ve Melville 2004).

Alfa toksin tek başına ya da diğer virülans faktörleriyle birlikte bağırsak epitel hücrelerinde dökülme, villuslarda kütleşme, erozyon, mukozal yangı ve lamina propriada hemoraji vb. patomorfolojik değişikliklere neden olur (Rehman ve ark 2009, Verherstraeten ve ark 2013). Bağırsak mukozasında alfa toksin tarafından uyarılan endojen fosfolipaz A₂ (PLA₂) aktivasyonunun nötrofil akışına neden olduğu ifade edilmiştir. Mukozal hasarın ağırlaşması ve nötrofil infiltrasyonu ile orantılı olarak bağırsak permeabilitesi artar (Kamaras ve Murrell 2001, Miyakawa ve ark 2007). Ek olarak alfa toksin, sırasıyla endotel ve mononükleer hücreler tarafından trombosit aktive edici faktör (PAF) ve TNF- α üretimini uyarır, bu da *C. perfringens* enfeksiyonları sırasında vasküler geçirgenlikte artış, ödem ve lamina propriada hemorajilere neden olur (Şekil 1.2) (Goossens ve ark 2017).



Şekil 1.2. İntestinal nekroz oluşumunda α toksinin rolü (Goossens ve ark 2017'den uyarlanmıştır).

1.3.2. Beta Toksin

Beta toksin (CPB), *C. perfringens* tip B ve C tarafından üretilen ≈ 35 kDa'lık, gözenek oluşturunca toksindir (PFT) (Hunter ve ark 1993, Sayeed ve ark 2008, Popoff 2014). Toksin tarafından hücre duvarında oluşturulan gözenekler ile Ca^{+2} , Na^{+} ve Cl^{-} 'nin hücreye girmesine ve intrasitoplazmik K^{+} (K^{+})'un hücre dışına çıkmasına izin verilir. Bu iyon değişimleri hücrenin şişmesi ve nekrozuyla sonuçlanır (Nagahama ve ark 2003, Nagahama ve ark 2015). Beta toksinin en önemli özelliği tripsin ve diğer proteazların varlığında birkaç dakikada inaktive olmasıdır. Normal şartlarda ince bağırsaklarda salgılanan tripsin ile bu toksin kolayca inhibe olur. Ancak tripsin inhibitörü içeren kolostrum veya soya fasulyesi ve tatlı patates gibi nişastalı gıdaların tüketilmesinden sonra toksin etkisini göstermektedir. Neonatal hayvanlarda beta toksin ilişkili hastalıkların sık görülmesi kolostrum ve sütte tripsin inhibitörlerinin varlığı ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca bağırsaklarda bulunan *Ascaris lumbricoides* gibi parazitlerden salgılanan tripsin inhibitörleri toksinlerin inaktivasyonunu engelleyerek beta toksin kaynaklı hastalıklara yatkınlık oluşturur (Songer 1996, Gui ve ark 2002, Nagahama ve ark 2013).

Beta toksin, insanlarda "Darmbrand" ve "Enteritis Nekrotikans (Pig Bel)" olarak adlandırılan bağırsak enfeksiyonları ile ilişkilendirilmiştir (Murrel 1983, Uzal ve ark 2014). Enteritis Nekrotikans, özellikle Güneydoğu Asya ülkelerinde olmak üzere dünyanın farklı bölgelerinde sporadik olarak ortaya çıkar. Bu hastalık tripsin eksikliği olan ve yetersiz beslenen çocuklarda tanımlanmıştır. Enteritis Nekrotikans'da görülen bu durum, tripsin aktivitesinin kolostrum etkisiyle engellendiği neonatal hayvanlarda meydana gelen tip C enfeksiyonu ile uyumludur (Diab ve ark 2012).

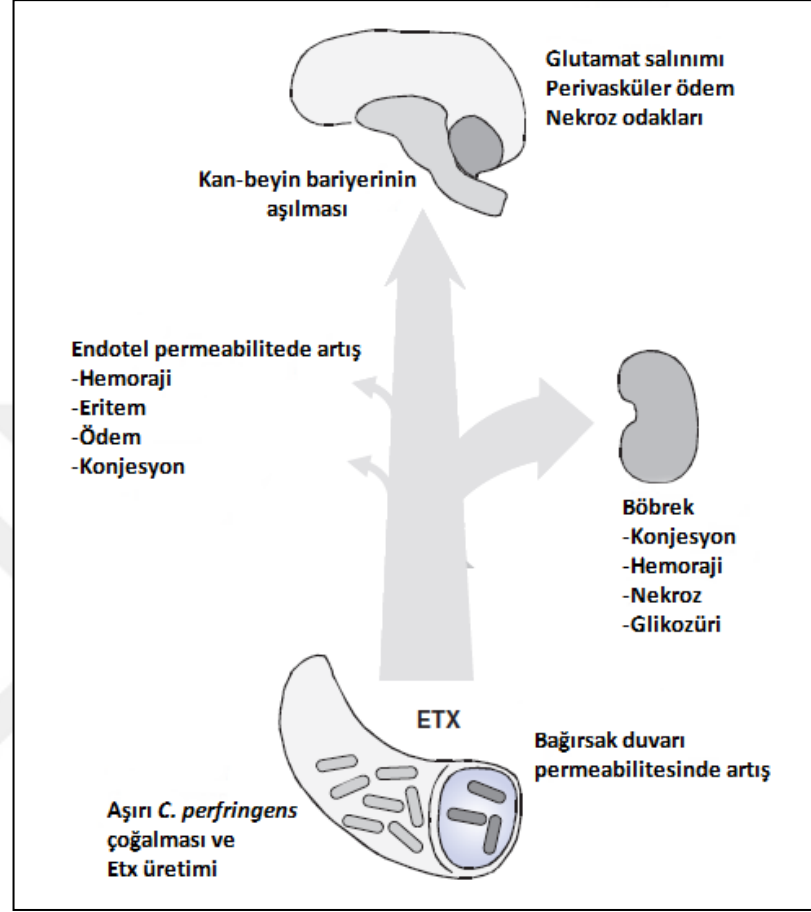
Beta toksin kaynaklı hastalıklarda, bağırsak mukozasında başlayan nekroz ve hemoraji bağırsağın tüm katmanlarına yayılabilir. Lamina propriyadaki yüzeysel kapillar damarları tıkayan fibrin trombusu beta toksin ilişkili hastalıkların karakteristik bulgusudur (Uzal ve ark 2010). Ayrıca yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda beta toksinin bağırsak villuslarındaki damar endotellerine tropizminin olduğu belirtilmiştir (Schumacher ve ark 2013).

1.3.3. Epsilon Toksin

Epsilon toksin (ETX), *C. perfringens* tip B ve D tarafından ≈ 33 kDa'lık bir inaktif prototoksin olarak sentezlenir. Daha sonra bağırsak lümenindeki tripsin, kimotripsin ve *C. perfringens* λ (lambda) proteazı gibi enzimler aracılığıyla N ve C-terminal peptitlerinin uzaklaştırılmasıyla yüksek aktiviteli bir toksine dönüşür (Freedman ve ark 2016). Epsilon toksin, enterotoksik ve nörotoksik karakterde bir toksindir. Bu toksin, farelerdeki 50-110 ng/kg'lık letal dozu (LD_{50}) ile *Clostridium botulinum* ve *Clostridium tetani* nörotoksinlerinden sonra bilinen en güçlü klostridiyal toksindir (Harkness ve ark 2012, Alves ve ark 2014). Biyolojik tehlike kaygısıyla bazı ülkelerde epsilon toksinin özel izinle çalışıldığı ifade edilmektedir (Navarro ve ark 2018a).

Epsilon toksin, hücrenin şişmesi dahil olmak üzere mitokondrinin kaybolması, vakuol oluşumu, hücre duvarının bozulması, ATP'nin tükenmesi ve çekirdeğin küçülmesi gibi nekrozla ilişkili hücresel değişiklikleri uyarak hücre ölümüne neden olur (Chassin ve ark 2007, Ivie ve ark 2011, Ferrarezi ve ark 2013). Sitotoksik aktivite hücrelerde gözenek oluşumu sonrası hızlı bir hücre içi K^+ kaybı, Cl^- , Na^+ ve Ca^{+2} artışı sonucu oluşan elektrolit dengesizliği ile ilişkilidir (Petit ve ark 2001, Robertson ve ark 2011). ETX, bağırsaklarda lamina propriada dejeneratif değişikliklere yol açarak mukozal geçirgenliği artırır. Su, elektrolit ve makromoleküller bağırsak lümenine salınır, bu da enterotoksemili hayvanların bağırsaklarında sulu içerik veya ishal görülmesini açıklar (Morris ve ark 2012). Epsilon toksin bağırsak mukozasında değişikliklere neden olsa bile ana hedefi merkezi sinir sistemi, akciğer, karaciğer, kalp ve böbreklerdir (Goldstein ve ark 2009). Toksin kan dolaşımına geçtikten sonra bu organlarda ödem ve nekrozlara yol açar (Şekil 1.3) (Popoff 2011). Sinir sisteminde kan-beyin bariyerinde (KBB) endotel hücrelerinin şişmesine, vakuolasyonuna ve nekrozuna neden olur. KBB'nin hasarı serum albüminin ekstrasvazyonu ile ödeme yol açarak nöral parankimde hipoksiye neden olur (Garcia ve ark 2015). Vasküler permeabilitede artış, perivasküler ve intramural vasküler ödem, hemoraji, daha kronik vakalarda ise beyinde beyaz maddede nekroz, astrosit ve aksonların şişmesi ile karakterize lezyonlar oluşur. Ayrıca epsilon toksin, Ca^{+2} artışıyla ilişkili membran depolarizasyonu ve ardından nörotransmitter olan glutamatın salınmasını uyarır. Ek olarak bu toksinin insan

eritrositlerinde hemoliz, farelerde ise tubuler dejenerasyon ve medullar hemoraji gibi böbrek lezyonlarına neden olduğu bildirilmiştir (Lonchamp ve ark 2010, Gao ve ark 2018).



Şekil 1.3. *C. perfringens* epsilon toksinin organlara dağılımının şematik gösterimi ve ana patolojik etkileri (Popoff 2011'den uyarlanmıştır).

1.3.4. Iota Toksin

Iota toksin (ITX), *C. perfringens* tip E tarafından üretilen inaktif (100 kDa) bir toksindir. Tripsin veya kimotripsin ile aktif hale gelen toksin hücre yüzeyinde oluşturduğu gözenekler aracılığıyla letal, dermonekrotik ve sitotoksik etkiler gösterir (Sakurai ve ark 2009). Ayrıca hücreler arası sıkı bağlantı noktalarında düzensizliğe ve enterosit permeabilitesinde artışa neden olur (Songer 2016).

1.3.5. Enterotoksin

Enterotoksin (CPE) *C. perfringens* tip F suşları tarafından sporlanma sırasında üretilir. Tripsin ve kimotripsin gibi enzimlerle toksinin biyolojik aktivitesi artar. Enterotoksin hücre permeabilitesini bozarak hücre içi sıvı ve iyon kaybına neden olur (Granum ve ark 1981, Li ve ark 2010). Bu toksin, insanlarda gıda kaynaklı zehirlenmelerde gastrointestinal semptomların oluşmasından sorumludur. Hayvanlarda ise diyare vakalarında önemli rol oynadığı ifade edilmektedir (Fisher ve ark 2005, Miyamoto ve ark 2006). Deneysel çalışmalarda villöz atrofi, epitel hücrelerinde deskuamasyon ve nekroz gibi histopatolojik değişikliklere neden olduğu belirtilmiştir (Garcia ve ark 2014).

1.3.6. Nekrotik β -Benzeri Toksin (NetB)

NetB, *C. perfringens* tip G suşları tarafından üretilen, gözenek oluşturunca bir toksindir. Keyburn ve ark (2008) tarafından keşfedilen bu toksin *C. perfringens* β toksin ile protein benzerliğine sahip olması nedeniyle NetB (Necrotic Enteritis β -like) olarak adlandırılmıştır. Diğer gözenek oluşturan toksinlerde olduğu gibi Na^+ , Cl^- ve Ca^{+2} iyonlarının geçişine izin vererek hücrenin lizisine yol açar (Savva ve ark 2013). NetB, kanatlılardaki nekrotik enteritin gelişiminde rol oynayan ana virölans faktördür (Prescott ve ark 2016). Kanatlı hayvanların enterositlerinde nekroz ve lamina propriyada hücreler arası bağlantı noktalarının yıkımlanmasına neden olur (Olkowski ve ark 2008, Rood ve ark 2016).

1.4. *C. perfringens*'in Minör Virölans Faktörleri

- **Perfringolizin O Toksin (PFO)**

Perfringolizin O (teta toksin), hemen hemen tüm *C. perfringens* suşları tarafından üretilir. Bu toksin kolesterolü reseptör olarak kullanarak hücre membranında gözenekler oluşturur. Tek başına hastalık gelişimi için yeterli kabul edilmemesine rağmen majör toksinlerle birlikte sitotoksik etki gösterir (Awad ve ark 2001, Deguchi ve ark 2009).

- **Beta2 Toksin (CPB2)**

Beta2, 28 kDa'lık gözenek oluşturuucu bir toksindir. Sağlıklı hayvanlarda, CPB2 pozitif *C. perfringens* suşları yaygın olarak izole edilebilir (Johansson ve ark 2006). Domuz yavrularında, atlarda ve sığırlarda nekro-hemorajik enteritis; köpeklerde diyare ile ilişkilendirilmiştir (Thiede ve ark 2001, Bueschel ve ark 2003, Waters ve ark 2003).

- ***C. perfringens* Binary Enterotoksin (BEC) Toksin**

BEC, *C. perfringens* tip A suşları tarafından üretilir. İnsanlarda görülen gıda kaynaklı gastrointestinal hastalıklarla ilişkilendirilir. Ek olarak BEC pozitif suşlar, tavşan bağırsaklarında sıvı birikmesine neden olur (Yonogi ve ark 2014).

- **Delta Toksin**

Delta toksin, *C. perfringens* tip B ve C suşları tarafından üretilir. Bu toksin, β -gözenek oluşturuucu toksin ailesinin α -hemolizin sınıfında yer alır. Delta toksin, bu ailenin diğer üyeleri (CPB, NetB, NetF ve *S. aureus*- α toksini gibi) ile önemli oranlarda amino asit benzerliğine sahiptir (Manich ve ark 2008). Bu toksin bağırsak lümeninde sıvı birikimi ve mukozal hasara yol açar (Seike ve ark 2019).

- **NetF Toksin**

Tip A suşları tarafından üretilen NetF toksin β -gözenek oluşturuucu toksin ailesinin α -hemolizin sınıfına ait 31,7 kDa'lık tek zincirli bir proteindir. NetF toksin; NetB, Delta toksin, CPB ve *S. aureus*- α toksinleriyle amino asit benzerliğine sahiptir (Mehdizadeh Gohari ve ark 2015).

- ***Perfringens* Büyük Toksin (TpeL)**

Perfringens büyük toksin, ≈ 205 kDa'lık bir proteindir. TpeL, yangı ve hücre ölümüne neden olur. *C. perfringens* tip G suşlarının patojenik etkisini artırır (Guttenberg ve ark 2012).

- **Sialidazlar**

Mikroorganizmaların bağırsak mukozasını etkilemesi için öncelikli olarak koruyucu mukus tabakasını bozması gerekir. Mukus tabakasının enzimatik olarak yıkımlanması ile bakterilerin epitel yüzeye ulaşmasına kolaylık sağlanır. İnce bağırsak mukus tabakasındaki yıkımlanma ve sonrasında oluşan kolonizasyonun enteritis gelişimi için bir ön koşul olduğu kabul edilir. *C. perfringens* suşlarında mukus parçalayıcı sialidaz kodlayan genler bulunur (Hassan ve ark 2015). Ek olarak sialidazların, toksinlerin enterositler üzerindeki sitotoksik etkisini arttırdığı ifade edilmektedir (Li ve ark 2014).

- **Hiyalüronidaz**

Hiyalüronidazlar, mukozal yüzeylerde enfeksiyonlara neden olan bakteriler tarafından üretilir. Hiyalüronidazlar, bakteri ve toksinlerin konakçı hücrelerle direkt temasını sağlar. Ek olarak enzimatik reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan son ürünler patojen bakteriler tarafından besin olarak kullanılır (Hynes ve Walton 2000, Girish ve Kemparaju 2007). Tek başına ölümcül olmamalarına rağmen müsin ve bağ doku yıkımlanması ile *C. perfringens* enfeksiyonlarının patogeneze katkıda bulunurlar (Chitayat ve ark 2008).

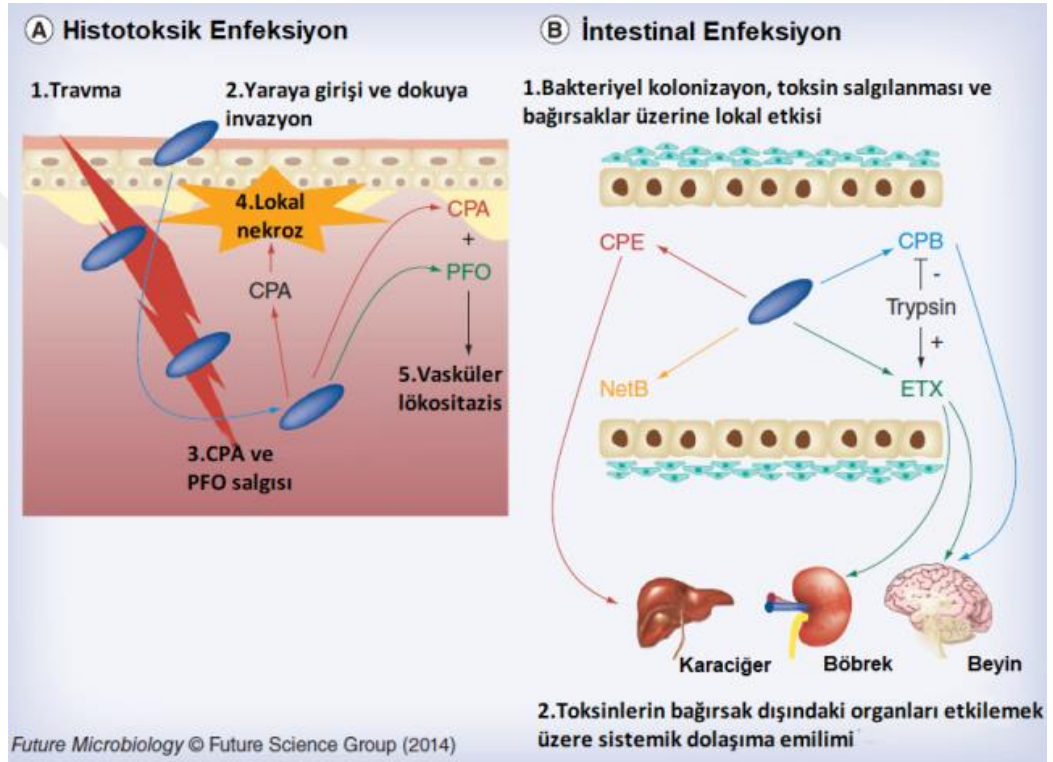
- **Kollajenazlar**

Kollajen, bağ doku ve bazal membranın bir bileşenidir. Bakteriyel kollajenazların neden olduğu kollajen hasarı doku bütünlüğünün bozulmasına neden olur. Kollajenazlar, mikroorganizma ve toksinlerin konakçı dokuya yayılmasını sağlayarak klostridial virülansta önemli rol oynar. *C. perfringens* tarafından üretilen kapa toksini lethal, hemorajik ve dermonekrotik aktivitelere sahip 80 kDa ağırlığında bir kollajenazdır (Matsushita ve ark 1994).

1.5. *C. perfringens* Kaynaklı Hastalıkların Patogenezi

C. perfringens yaygın şekilde çevresel kaynaklarda, insan ve hayvanların bağırsak florasında bulunur. Bu yüzden etkenin bağırsaklardaki varlığı, patojenik olarak değerlendirilmez. *C. perfringens* kaynaklı hastalıkların patogenezi

predispoze faktörler sonrasında oluşan kolonizasyon ve toksinlerin üretimi önemlidir. Üretilen toksinlere bağlı olarak intravasküler hemoliz, kapillar hasar, miyonekroz ve beyin lezyonları gibi spesifik organ hasarları oluşur (Şekil 1.4). *C. perfringens* toksinlerinin lokal etkisi sonucu enteritis ve histotoksik enfeksiyonlar oluşurken, toksinlerin sistemik dolaşıma emilimi ile enterotoksemi meydana gelir (Uzal ve ark 2010, Uzal ve ark 2016). İnsan ve hayvanlarda görülen *C. perfringens* kaynaklı hastalıklar Tablo 1.4'te sunulmuştur.



Şekil 1.4. *C. perfringens* kaynaklı histotoksik ve intestinal hastalıklarda rol oynayan başlıca toksinlerin etkisi (Uzal ve ark 2014'den uyarlanmıştır).

CPA: Alfa toksin, CPB: Beta toksin, ETX: Epsilon toksin, CPE: Entetotoksin, NetB: Nekrotik B benzeri toksin, PFO: Perfringolizin O.

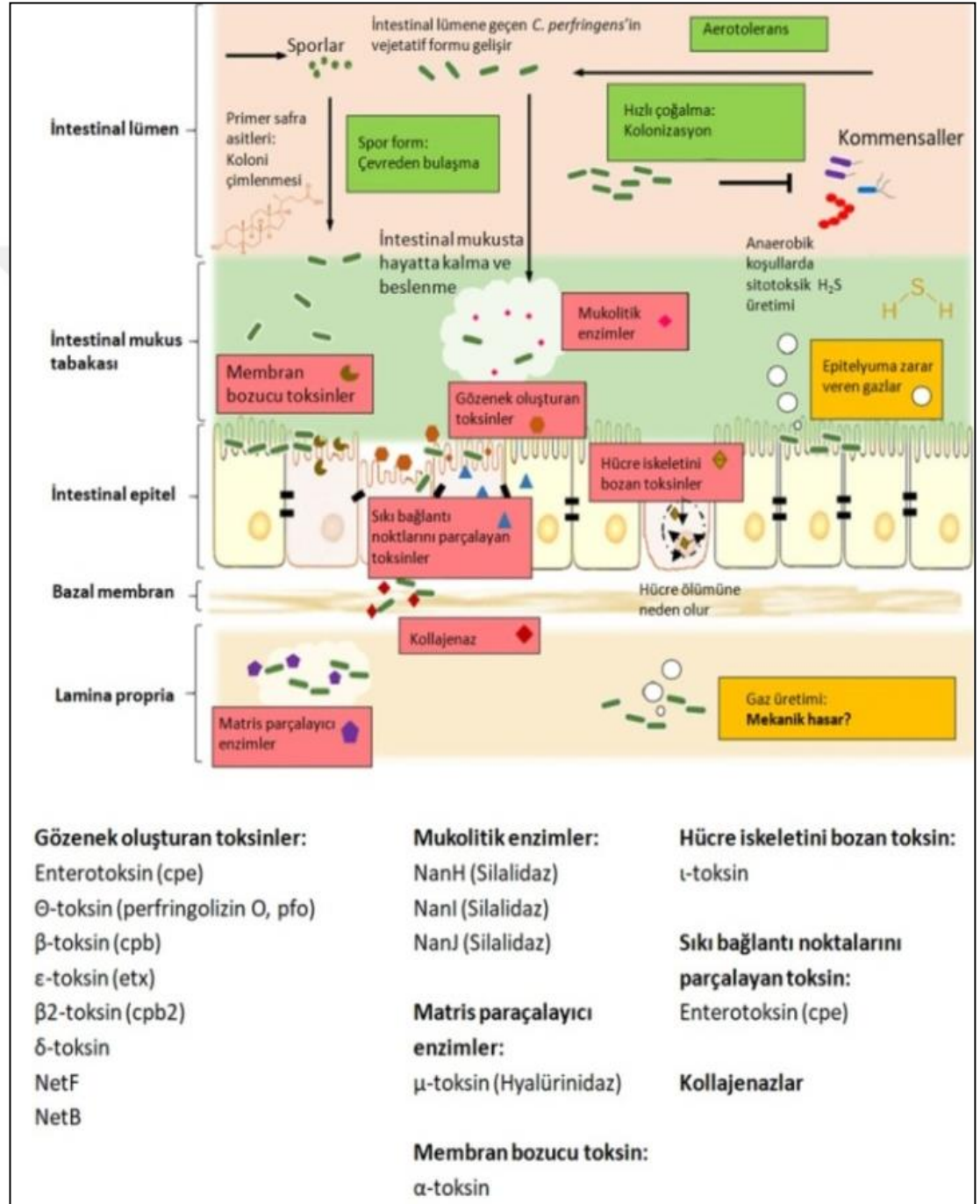
Klostridial miyonekroz veya gazlı gangren, *C. perfringens* tip A'nın neden olduğu, iskelet kası ve deri altı dokusunun nekrotizan ölümcül bir enfeksiyonudur. Travmatik yaralara bakterilerin invaze olmasının ardından gaz oluşumu ve krepitasyon ile karakterizedir (Shindo ve ark 2015, Silva ve ark 2016). Gazlı gangrenin patogenezinde alfa toksin ve perfringolizin O sinerjik etki gösterir (Vidal ve ark 2012). Bu hastalık, insan ve hayvanlarda düşük insidansa sahip olmasına rağmen yüksek ölüm oranıyla seyreder (Stevens ve ark 2012).

Tablo 1.4. *C. perfringens* tipleri tarafından insan ve hayvanlarda oluşturulan hastalıklar (Uzal ve ark 2018'den uyarlanmıştır).

Tip	Hastalık
Tip A	İnsanlarda ve hayvanlarda gazlı gangren Domuz ve atlarda hemorajik gastroenteritis Koyun ve sığırlarda enterotoksemi Sarı Kuzu Hastalığı
Tip B	Kuzularda dizanteri Koyunlarda hemorajik enteritis Buzağı, oğlak ve taylarda hemorajik enteritis
Tip C	İnsanlarda "Enteritis Nekrotikans" Neonatal hayvanlarda nekrohemorajik enteritis Koyunlarda "Struck"
Tip D	Koyun, keçi ve sığırlarda enterotoksemi
Tip E	Koyun ve sığırlarda enteritis Tavşanlarda enterotoksemi
Tip F	İnsanlarda gıda zehirlenmesi ve antibiyotik ilişkili diyare Köpeklerde hemorajik gastroenteritis Keçi ve atlarda kolitis
Tip G	Kanatlı hayvanlarda nekrotik enteritis

C. perfringens kaynaklı enterik hastalıkların oluşması için en yaygın hipotez mikroorganizmanın bağırsak lümeninde hızlı bir şekilde çoğalması ve toksin üretmesini sağlayacak bir mikroçevrenin oluşmasıdır. Sindirim kanalı florasında düşük miktarlarda bulunan mikroorganizmalar normal peristaltik hareketler ile düzenli olarak dışarı atılır. Ek olarak diğer kommensal mikroorganizmalarla rekabet, deoksilat gibi safra asitleri ve *Lactobacillus* spp. tarafından üretilen toksinler ile *C. perfringens* proliferasyonu baskılanır (Sorg ve Sonenshein 2008, Guo ve ark 2017). Bağırsak florasında oluşan ani değişiklikler ya da bağırsak peristaltizminin bozulmasıyla bağırsak lümeninde *C. perfringens* diğer bakterilerden baskın hale gelebilir. Neonatal hayvanlarda bağırsaklardaki düşük proteolitik aktivite, bağırsak florasının tam olarak oluşmaması ve yeterli miktarda kolostrumun alınamaması, yetişkinlerde yapılan ani rasyon değişiklikleri, yeşil otlaklara ya da hasat sonrası tahıl arazilerine erişim, barınak şartlarının kötü olması, yoğun antibiyotik ve antiparaziter ilaç kullanımı ile salmonellozis ve koksidiyozis gibi bağırsak hastalıkları bağırsak mukoza, mikrobiyota ve motilitesine etki ederek enterotoksemi oluşumunda önemli rol oynar (Rosadio ve ark 2010, Burgstaller ve ark 2017). *C. perfringens*, sindirim kanalında kolonize olmak ve bağırsak duvarına bağlanmak için NANI sialidazı gibi

minör virülans faktörlerini kullanır (Montagne ve ark 2000). Daha sonra beta, epsilon, enterotoksin ve NetB başta olmak üzere çok sayıda toksin ve kombinasyonları intestinal enfeksiyonlara yol açar. Toksinler lokal etki ederek bağırsaklarda mukozal hasara neden olur (Li ve ark 2017, Navarro ve ark 2018b). İntestinal hastalıklarda virülans faktörlerinin etkisi Şekil 1.5'te özetlenmiştir.



Şekil 1.5. *C. perfringens* kaynaklı bağırsak enfeksiyonlarında virülans faktörleri ve genel etki mekanizmalarına göre toksinlerin sınıflandırılması (Kiu ve Hall 2018'den uyarlanmıştır).

1.6. *C. perfringens* Kaynaklı Enterotoksemiler

1.6.1. *C. perfringens* Tip A Enterotoksemi

C. perfringens tip A suşlarının major toksini alfa toksindir, ancak bu tip tarafından, enterotoksin ve beta2 toksin de üretebilir. Bu toksin tipi ruminantlarda abomasitis ve enterotoksemi ile ilişkilendirilir (Lebrun ve ark 2010, Goossens ve ark 2017). Ruminantlarda *C. perfringens* tip A enterotoksemi sporadik vakalar halinde ortaya çıkar. Tip A kuzularda akut intravasküler hemolizle karakterize olan Sarı Kuzu Hastalığı'na (*Yellow Lamb Disease*) neden olur (Uzal 2016). Sığırlarda %100'e yakın mortalite ile ciddi bir ekonomik kayba yol açan jejunal kanama sendromuna *C. perfringens* tip A'nın neden olduğu bilinir. Buzağılarda ise tip A enterotoksemiye etçi ırklara ait buzağların daha duyarlı olduğu bilinmektedir (Valgaeren ve ark 2013, Silva ve ark 2016).

1.6.1.1. Tip A Enterotokseminin Klinik Bulguları

Perakut seyreden vakalarda hayvanlar çoğunlukla ölü ya da agoni halinde bulunur. Kuzularda klinik semptomlar; depresyon, anemi, ikterus ve hemoglobinüri ile karakterizedir. Oğlaklarda, akut hastalıkta şiddetli sancı, yüksek ateş, konvülsiyonlar, lateral pozisyonda yerde yatma ve fibrinohemorajik diyare gibi klinik belirtiler görülür (Uzal ve Songer 2008). Tip A enterotoksemi buzağılarda hemorajik enteritisle seyreder. Klinik bulguların gözlemlendiği buzağılarda diyare, abdominal distansiyon, sinirsel bulgular, solunum güçlüğü, lateral yatış ve soğuk ekstremiteler gibi şok belirtileri sıklıkla görülür (Lebrun ve ark 2010, Valgaeren ve ark 2013). Yetişkin sığırlarda hastalık hızlı gelişir ve toksemi sonucu ani ölüm görülür. Yetişkin sığırlar aniden ölmezse; akut depresyon, süt veriminde azalma, taşikardi, ruminal durgunluk, abdominal distansiyon ve dışkıda koyu renkli pıhtılaşmış kan gözlemlenebilir (Dennison ve ark 2002, Abutarbush ve Radostits 2005).

1.6.1.2. Tip A Enterotokseminin Nekropsi Bulguları

Tip A enterotoksemide spesifik olmamasına rağmen abdomende gaz birikimi ve kadavrada hızlı bir şekilde putrifikasyon gelişir. Sarı Kuzu Hastalığı'nda generalize ikterus, pulmoner ödem, vücut boşluklarında sıvı birikimi ve

hemoglobinürik nefrozis belirgindir. Karaciğer ve dalak büyümüş olup, karaciğerde solgun alanlar görülür ve kıvam olarak gevrek bir yapıdadır. Hemoliz ve hemoglobinüriden dolayı idrar kesesinde kırmızı renkli idrar bulunur (Uzal 2016). İnce bağırsakta segmental veya diffuz nekro-hemorajik enteritis görülür (Simpson ve ark 2018). Bağırsak lümeni hemorajik içerikle şişkindir. Bağırsak duvarı ödemli ya da bağırsaklar aşırı dilate ise ince görünümündedir. Bazı durumlarda mukozal hasar sekum veya spiral kolonu da etkileyebilir. Makroskopik lezyonların görüldüğü oğlaklarda akciğer ve bağırsaklarda konjesyon ve ödem, bağırsaklarda gaz nedeni ile dilatasyon bildirilmiştir (Dray 2004). Koyun ve keçilere benzer şekilde sığırlarda nekrohemorajik enteritis bulguları ön plandadır. Mezenteriyal lenf düğümlerinde büyüme, bağırsak duvarında konjesyon ve lümende bol miktarda hemorajik içerik rumen ve abomasum mukozasında hemoraji nekropside gözlenen en yaygın bulgulardır (Manteca ve ark 2001, Dennison ve ark 2002). Karaciğerde büyüme ve böbreklerde hemoglobinürik nefrozisden dolayı siyah renk değişikliği görülebilir. Endokart, perikart, mediastinal ve mezenterik lenf düğümlerinde hemoraji bildirilen diğer bulgulardır (Manteca ve ark 2000, Schlegel ve ark 2012). Ayrıca tip A enterotoksemili buzağılarda bağırsak lezyonlarına abomasitisin eşlik edebileceği bildirilmiştir (Valgaeren ve ark 2015).

1.6.1.3. Tip A Enterotokseminin Histopatolojik Bulguları

Tip A enterotoksemide histolojik bulgular spesifik değildir. Karaciğerde sentrilobüler nekroz, böbrekte hemoglobin silindirleri ile birlikte nefroz, pulmoner ödem ve konjesyon bulguları gözlenir (Uzal 2016). Keçilerde, mikroskopik olarak ince ve kalın bağırsak lamina propriyasında lenfosit, plazma hücresi az miktarda diffuz nötrofil ve eozinofil infiltrasyonları ile karakterize enterokolitis görülür. Bağırsak epitellerinde nekroz ve deskuamasyon vardır. Lümende ve nekroze olan bölgelerde tek veya kümelenmiş şekilde az ya da çok sayıda gram pozitif çubuklar görülür. Tip A enterotoksemi tespit edilen hayvanların enterositlerinde parazitlerin farklı gelişim aşamaları da görülebilir (Songer 1996, Miyakawa ve ark 2007).

Sığırlarda; ince bağırsakta segmental hemoraji ve ödem ile birlikte yangısal hücre infiltrasyonları görülür. Villus uçlarından kript tabanına kadar uzanan nekroz ve progressif bir erozyon vardır. *C. perfringens*'e benzeyen çubuk şeklindeki

bakterilerin oluşturduğu kümelenmeler bağırsak hücrelerine yapışmış halde gözlenebilir. Submukozada kan damarlarında trombüs görüldüğü ifade edilmektedir. Pulmoner ödem ve konjesyon, beyin ve beyincikte yoğun hiperemi, serebral korteks, beyincik ve beyin kökünde çoğunlukla beyaz madde ile sınırlı perivasküler ve parankimal hemoraji alanları ile birlikte ödem görülebilir. Karaciğer parankiminde sentrilobüler vakuoler dejenerasyon ve nekroz, böbrek tubullerinde dejenerasyon, korteks ve medullada hemorajik alanlar görülen diğer bulgulardır (Manteca ve ark 2001, Valgaeren ve ark 2015).

1.6.2. *C. perfringens* Tip B ve Tip C Enterotoksemi

C. perfringens tip B tarafından alfa, beta ve epsilon toksinleri üretilir. Tip C suşları, alfa ve beta toksinlerine ek olarak enterotoksin ve beta2 gibi toksinleri de üretebilir. *C. perfringens* tip B ve C koyun, sığır, at ve domuzlarda ani ölüm, akut nörolojik bulgular ve hemorajik diyare ile karakterize benzer hastalıklar oluşturur (Diab 2016). Tip B enterotoksemi hemorajik enteritisle karakterize olmasının yanı sıra koyunlarda beyinde fokal simetrik nekrozlara (ensefalomalasi) yol açar. Tip B kaynaklı hastalıklarda bağırsak lezyonlarının beta toksin, beyin lezyonlarının ise epsilon toksin tarafından oluşturulduğu ifade edilmektedir (Uzal ve Songer 2016). *C. perfringens* tip C enfeksiyonları özellikle neonatal hayvanlarda nekrotik, nekro-hemorajik enteritis ya da enterokolitis ile karakterizedir (Uzal ve McClane 2011). Neonatal hayvanlarda beta toksinin ilişkili hastalıkların görülmesi toksinin tripsine olan duyarlılığı ilişkilendirilir. Kolostrumda bulunan tripsin inhibitörleri immünoglobulinlerin proteolitik parçalanmasını önlemeyi amaçlar ve bu mekanizma sayesinde beta toksinin de virülansı korunur.

Tip B ve tip C enterotoksemi Avrupa, Orta Doğu, Güney Afrika ve Yeni Zelanda'da bildirilmiştir. İngiltere'de ise tip B enterotokseminin yaşlı kuzularda görülen formu "pine" olarak adlandırılır (Uzal ve Songer 2008, Munday ve ark 2020). Tip C enterotokseminin yaşlı koyunlarda görülen formu ise "struck" adı ile bilinir. Özellikle merada, koyun ve keçi yetiştiriciliği yapılan ülkelerde daha fazla görülür. Yetişkin hayvanlarda tatlı patates ve soya fasulyesi gibi tripsin inhibitörleri içeren yemlerin tüketilmesi tip C enterotoksemi gelişimi için bir risk faktörü olarak kabul edilir (Borriello ve Carman 1992, Fisher ve ark 2006).

1.6.2.1. Tip B ve Tip C Enterotokseminin Klinik Bulguları

C. perfringens tip B ve tip C'nin neden olduğu hastalıkları klinik olarak ayırt etmek güçtür. Neonatal kuzularda tip B ve tip C kaynaklı hastalıklar sırasıyla kuzu dizanterisi ve hemorajik enteritis olarak adlandırılır (Uzal ve Songer 2008). Perakut vakalarda ani ölüm görülürken, akut seyreden vakalarda, abdominal sancı ve distansiyon, opistotonus, çarpınma hareketleri, siyah renkli ya da hemorajik diyare bulguları sonrası 24 saat içinde ölüm görülür (Garcia ve ark 2013). Tip B enterotokseminin daha yaşlı kuzularda görülen kronik formu "pine" gelişim geriliği, depresyon, süt emmede isteksizlik ve sinirsel bulgularla karakterizedir (Diab 2016). Benzer klinik bulgular oğlaklarda da görülür. Buzağılarda klinik semptomlar ishal, dizanteri ve koliktir. Etkilenen yetişkin hayvanların kondüsyon durumu oldukça iyidir ve hastalık genellikle sporadik olarak seyreder. Yetişkin koyunlarda mortalite oranı %5-15 arasında değiştiği ifade edilmektedir (Uzal ve Songer 2008).

1.6.2.2. Tip B ve C Enterotokseminin Nekropsi Bulguları

Tip B ve C enterotokseminin nekropsi bulguları birbirine benzerlik gösterir. Perakut formda, ani ölüm nedeniyle nekropsi bulguları belirgin değildir. Akut form nekrohemorajik enteritisle karakterize olup özellikle ileum ve jejunumda yaygın mukozal nekroz, ülser ve düzensiz difterik membranlar görülebilir (Uzal ve ark 2007). Mukoza ülserleşmesinin şiddetli ve derin olduğu durumlarda peritonitis şekillenebilir. Abdominal boşlukta sıklıkla serofibrinöz veya hemorajik bir sıvı gözlenebilir. Abomasum ve mezenterial lenf düğümleri ödemli ve konjesyonludur (Sayeed ve ark 2008, Nagahama ve ark 2015). Tip B enterotoksemide akut dönemi atlatarak hayatta kalan hayvanlarda epsilon toksinden dolayı beyinde fokal simetrik ensefalomalasi (FSE) oluşabilir (Uzal ve Songer 2016).

Tip C enterotoksemili kuzu ve buzağılarda rumende subserozal multifokal hemoraji, bağırsaklarda dilatasyon ve içerisinde bol miktarda sarımsı-hemorajik sıvı, mukozada multifokal hemorajik alanlar ve diffuz konjesyon gözlenir (Garcia ve ark 2013). Bazen bağırsak duvarında ödem, lümende kremi az miktarda içerik ve mukozada küçük ülser alanları ile hiperemi görülebilir. İnce bağırsağın mukozası üzerinde fibröz bir psödomembran gözlenebilir. Periton boşluğunda az miktarda

seröz-hemorajik sıvı bulunabilir, mezenterium ve periton genellikle hiperemiktir. Mezenterik lenf düğümleri ödemli ve konjesyonedir. Genellikle perikardiyal sıvı birikimi ve intersitisyel pulmoner ödem vardır. Epikardiyal ve endokardiyal hemorajilere sıklıkla rastlanır. Toksemi nedeniyle karaciğer solgun ve gevrektilir. Dalakta hafif büyüme ve yumuşama görülür. Böbrekler büyümüş, ödemli, solgun ve toksik dejenerasyondan dolayı yumuşamış olarak izlenir. Bazı vakalarda beyinde yaygın şekilde küçük kanama odakları görülebilir (Uzal ve ark 2007).

1.6.2.3. Tip B ve C Enterotokseminin Histopatolojik Bulguları

Koyun, keçi ve sığırlarda tip B ve C enterotoksemide histopatolojik bulgular spesifik değildir. Buzağılarda özellikle jejunum ve ileumda epitel ve lamina propriayı etkileyen koagülasyon nekrozu, villus atrofi, lamina propriada diffuz hemoraji, nötrofil, plazma hücresi, lenfosit ve makrofaj infiltrasyonları görülür. Segmental nötrofilik nekrotik vaskülit, mukozal ve submukozal kan damarlarında fibrin trombusu gözlemlenebilir. Bazofilik çubuk şeklinde bakteri, fibrin, nötrofil ve nekrotik hücre kalıntılarından oluşan fibrinonekrotik psödomembran oluşumları bağırsak mukozal yüzeyini kaplayabilir. Bağırsak lümeninde, nekrotik mukozada ve Lieberkühn kriptleri içinde çok sayıda gram-pozitif çubuk görülür (Uzal ve ark 2010, Nagahama ve ark 2015). Sekum ve spiral kolonda mukozal ve submukozal kanamalar belirgindir. Ön midelerde, abomasumda submukozal ve subserozal kanamalar, fibrin, nötrofil infiltrasyonu, nekrotik vaskülit ve tromboz görülür. Bağırsak epitelinde *Cryptosporidium* spp. gibi parazitlerin gelişim evreleri görülebilir (Garcia ve ark 2013).

1.6.3. C. perfringens Tip D Enterotoksemi

Tip D enterotoksemi koyun, keçi ve sığırlarda klostridial enterotokseminin en yaygın nedenidir. Hastalık fazla miktarda yem tüketimi ve böbrek lezyonları ile ilişkilendirildiği için "*Aşırı Yeme Hastalığı-Overeating Disease*" ve "*Yumuşak Böbrek Hastalığı-Pulpy Kidney Disease*" olarak da bilinir. *C. perfringens* kaynaklı hastalıklar içerisinde koyunlarda en sık görülendir (Uzal ve ark 2016). Koyunlarda görülen tip D enterotoksemi üzerine çok sayıda bilimsel çalışma olmasına rağmen diğer hayvan türlerinde nispeten daha az sayıda çalışma bulunmaktadır. Hastalığın keçi ve sığırlarda sporadik olarak görüldüğü bildirilmiştir (Uzal 2004, Watson ve

Scholes 2009, Jones ve ark 2015). *C. perfringens* tip D suşlarının ana virülans faktörü epsilon toksindir. Bunun yanı sıra bu tip tarafından alfa, eneterotoksin ve perfringolizin O toksinleri de üretilebilir. Epsilon toksin kan dolaşımına geçtiğinde damar endotelinde hasar, kapillar permeabilitede artış ve dokularda ödeme neden olur (Popoff 2011, Uzal ve ark 2016, Rood ve ark 2018).

Tip D eneterotoksemi hayvanların yemleme alışkanlığının değiştiği zamanlarda, sütten kesilme sonrasında ya da besiyeye alınma zamanlarında en yüksek insidansa ulaşır. Ruminantlarda fermente olabilen karbonhidratlar açısından zengin yemlerin fazla miktarda ve adaptasyon süreci olmadan tüketilmesi hastalık için ana predispozan faktördür. Hayvanlar kademeli bir geçiş olmadan aşırı miktarda nişastaca zengin yemlerle beslendiğinde, rumen florası bu duruma adaptasyon sağlayamamakta ve sindirilmemiş ya da kısmen sindirilmiş nişasta bağırsaklara geçer. *C. perfringens* bu ortamda aşırı miktarda çoğalır (Uzal ve ark 2016, Simpson ve ark 2018). Nişasta sindiriminin eksikliği aynı zamanda ince bağırsaklarda glikozun da yokluğuna neden olur. *C. perfringens* tip D düşük glikoz içeren ortamlarda daha fazla epsilon toksin üretir. Bağırsakta sindirilmemiş nişastanın bulunması *C. perfringens* tip D çoğalmasını uyarırken, glikozun yokluğu epsilon toksinin üretimini uyarır. Besiye alma dönemlerinde ve sütten kesilme sonrası tip D vakalarının artışı bu duruma bağlanmaktadır. Ek olarak gebelik toksemisi, geniş spektrumlu antihelmintik ilaçların doz aşımı ve sindirim kanalındaki ağır parazit yükü bağırsak ortamını bozarak tip D enterotoksemiye yatkınlık oluşturabilir (Uzal ve ark 1994, Uzal ve ark 2016).

1.6.3.1. Tip D Enterotokseminin Klinik Bulguları

Tip D enterotoksemide, bağırsak lümeninde üretilen fazla miktardaki epsilon toksinin dolaşıma geçmesiyle hastalık perakut seyreder ve ani ölüm görülür (Uzal ve ark 2008, Simpson ve ark 2018). Genellikle anamnezde bakım ve beslemede ani değişiklik yapıldığı yer alır. Akut etkilenen hayvanlar daha az miktarda toksine maruz kalmıştır. Bu hayvanlarda nefes almada güçlük, diyare, glikozüri, lateral pozisyonunda yatma, opistotonos ve konvülsiyonlar görülür (Uzal ve Kelly 1998, Uzal ve ark 2002). Daha uzun süreli bir klinik seyirle birlikte körlük, ataksi, dış gıcırdatma, nistagmus ve konvülsiyon gibi nörolojik belirtiler gözlenir (Uzal ve ark

2002, Filho ve ark 2009, Watson ve Scholes 2009). Ayrıca tip D enterotoksemili kuzularda şiddetli anemi, abdominal sancı ve hemoglobüri görüldüğü bildirilmiştir (Giannitti ve ark 2014, Giannitti ve ark 2021). Keçilerde ek olarak hemorajik ya da koyu yeşil renkli diyare, kolitis ve enterokolitis gözlenebilir (Uzal ve Kelly 1998, Uzal ve ark 2016, Kumar ve ark 2019).

1.6.3.2. Tip D Enterotokseminin Nekropsi Bulguları

Akut tip D enterotoksemiden ölen koyunlarda, hidroperikardiyum, hidrotoraks, asites, pulmoner ve leptomeningeal ödem, epikardiyal, endokardiyal ve böbreklerde subkapsüler peteşiyel kanamalar, intestinal konjesyon ve hemorajiler gözlenir. Subakut ve kronik form, uzun süreli nörolojik bulguların görüldüğü bir klinik seyrin ardından beyinin beyaz maddesinde fokal simetrik ensefalomalasi (FSE) ve foramen magnumdan serebellar vermisin herniasyonu ile karakterizedir. Fokal simetrik ensefalomalasiye korpus striatum, talamus, orta beyin, serebellar pedinküller dahil olmak üzere beyinin farklı bölümlerinde rastlanabilir (Garcia ve ark 2015, Uzal ve ark 2016).

Tip D enterotoksemili oğlak ve yetişkin keçilerde perianal bölgenin sıvı dışkı ile kirlenmesi, pulmoner ödem ve konjesyon, hidrotoraks, asites, böbreklerde subkapsüler kanamalar, fibrinonekrotik ya da hemorajik enterokolitis gözlenen postmortem bulgulardır (Kumar ve ark 2019, Ortega ve ark 2019). Bağırsaklar, özellikle de kolon serozası ödemli, lümeni fazla miktarda yeşil renkli sıvı ve gaz ile dilatedir. İleum ve kolon mukozasında fibrin kaplı düzensiz şekillerde ülserli alanlar gözlenebilir. Koyunlara benzer şekilde tip D enterotoksemili keçilerde serebellar vermisin foramen magnuma herniasyonu görülebilir (Uzal ve ark 2008, Ortega ve ark 2019).

Sığırlarda koyunlardaki bulgulara benzer şekilde pulmoner ödem ve konjesyon, hidroperikardiyum, ince bağırsakta sulu içerik ve jejunum mukozasında peteşiyel kanamalar görülür. Daha uzun süre canlı kalanlarda ise beyin kökünde peteşiyel kanama ve FSE gözleendiği ifade edilmiştir (Watson ve Scholes 2009, Mete ve ark 2013).

1.6.3.3. Tip D Enterotokseminin Histopatolojik Bulguları

Akut veya subakut tip D enterotoksemili koyun ve daha az sıklıkla keçilerde beyinde görülen perivasküler ve intramural proteinöz ödem tanısall bir lezyon olarak kabul edilmektedir (Uzal ve ark 2016, Ortega ve ark 2019). Bu lezyonlar daha çok kan–beyin bariyerinin yıkımlandığı serebral korteks, korpus striatum, talamus, orta beyin, medulla ve serebellumda daha çok beyaz maddede bulunur. Beyaz maddedeki seyrek hücresellik ve büyük hücre dışı boşluklar, vazojenik ödem sıvısının daha fazla birikmesine ve yayılmasına izin verir (Garcia ve ark 2015). Tip D enterotoksemili koyunlarda, böbrek tubul epitellerinde dejenerasyon ve nekroz, intersitisyel dokuda hemolize kan ve yangısal hücre infiltrasyonları görülebilir. Ek olarak proksimal ve distal tubul epitel hücrelerinde hiyalin damlacıkları, akciğer alveollerinde ve intersitisyel dokuda ödem ile alveol lümeninde fibrin eksudasyonu; karaciğerde hepatositlerde dejenerasyon ve nekroz, safra kanallarında kolestaz gözleendiği bildirilmiştir (Giannitti ve ark 2014). İnce bağırsak ve kolonda değişen derecelerde mukozal konjesyon ve lümende gram-pozitif çubuk şeklinde bakteriler görülür (Uzal ve ark 2004).

Keçilerde doğal ve deneysel tip D enterotoksemide, akciğerde interlobüler septumlarda ve alveollerde ödem, bağırsaklarda konjesyon, koagülasyon nekrozu, villuslarda atrofi, lamina propriyada nötrofil, lenfosit ve plazma hücresi infiltrasyonu, lümende nekrotik hücre döküntülerinin olduğı alanlarda çubuk şeklinde gram pozitif bakteriler gözlenir (Kumar ve ark 2019, Ortega ve ark 2019). Ek olarak deneysel hastalıkta böbreklerde glomerüler ve intersitisyel kanama, tubul epitellerinde koagülasyon nekrozu, beyin ve beyincikte kapillar konjesyon, perinöronal ödem, kalpte kapiller konjesyon ve hemoraji, karaciğerde sentrilobüler nekroz bildirilmiştir (Kumar ve ark 2019). Ortega ve ark (2019) keçilerin beyin ve beyinciğinde etkilenen damar duvarlarında transmural ödem gözleendiğini ifade etmişlerdir.

Tip D enterotoksemili sığırlarda, koyun ve keçilere benzer mikroskopik lezyonlar gözlenir. Akciğerde damarların çevresinde perivasküler ve alveoler ödem, böbrek tubul epitellerinde nekroz ve dejenerasyonlar, beyinde perivasküler boşlukların genişlemesi, bu alanlarda eozinofilik hiyalin damlaları ve proteinöz

ödem, bağırsak lamina propriyasında multifokal kanamalar görüldüğü ifade edilmiştir (Filho ve ark 2009, Watson ve Scholes 2009).

1.6.4. *C. perfringens* Tip E Enterotoksemi

C. perfringens tip E kuzu, buzağı ve tavşanlarda enterotoksemiye neden olur. Bu tip tarafından alfa ve iota majör toksinleri üretilir. Ancak bazı *C. perfringens* tip E suşları CPE ve CPB2 gibi daha fazla virülans faktörü sentezleyebilir (Sakurai ve ark 2009). *C. perfringens* tip E'nin, Orta Doğu'da kuzu ve keçilerde, Kuzey Amerika'da buzağılarda enteritise neden olduğu ifade edilmiştir (Greco ve ark 2005, Kim ve ark 2013). Ayrıca ülkemizde *C. perfringens* tip E'nin 2 aylık bir buzağıdan izole edildiği bildirilmiştir (Eröksüz ve ark 2018). Bu tip tarafından oluşturulan hastalıkta ani ölüm, abomazumda konjesyon ve ülser, hemorajik enteritis, hidroperikardiyum, serozal kanamalar ve mezenterial lenf düğümlerinde büyüme gözlenebilir. Histopatolojik olarak bağırsak villuslarında, adherent gram pozitif çubuklar ve polimorfonükleer lökositler görüldüğü ifade edilmiştir (Uzal ve Songer 2008, Eröksüz ve ark 2018).

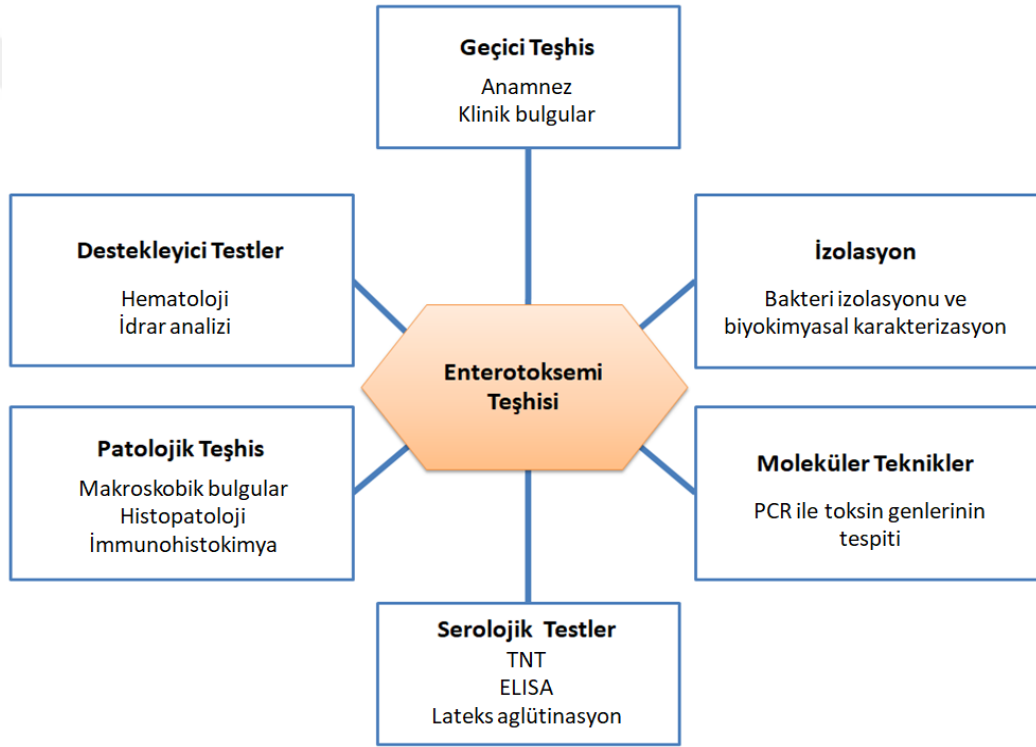
1.7. Teşhis

Saha şartlarında ani ölüm ile birlikte predispoze faktörlerin varlığını içeren bir anamnez, klinik ve makroskobik bulguların temelinde geçici bir enterotoksemi tanısı konulabilir. Hiperglisemi ve glikozüri, tip D enterotoksemili hayvanlarda sıklıkla gözlenen laboratuvar bulgularıdır.

Nekropsi, kadavranın normal kokuşmasını, enterotoksemiye bağlı olan hızlı kokuşmadan ayırt edebilmek için en kısa sürede yapılmalıdır. *C. perfringens* tiplerinin, sağlıklı hayvanların bağırsak florasında bulunması ve bunların birkaç saat içinde kadavranın diğer dokularına penetre olmasından dolayı bakteriyolojik kültür sonuçları, klinik ve patolojik bulgular ile birlikte değerlendirilmelidir (Uzal ve Songer 2008). Ölüm ile örnekleme arasındaki süreye bağlı olarak diagnostik amaçla bakteri sayısının yorumlanmasının güvenilirliği değişmektedir (Assie ve ark 2006). Hayvanların bağırsak içeriğinde 10^2 - 10^5 CFU/ml *C. perfringens* bulunması normal kabul edilirken enterotoksemi vakalarında 10^6 - 10^8 CFU/ml ve daha yüksek sayılara ulaşabilir (Philippeau ve ark 2003). Taze ölmüş hayvanların bağırsak içeriğinde

yapılan miktar tayini, uyumlu klinik belirtiler, makroskopik ve histopatolojik bulgular eşliğinde önemli kabul edilebilir (Uzal ve Songer 2008).

Enterotokseminin kesin tanısı için bağırsak içeriği, vücut sıvısı veya kültür süpernatantında *C. perfringens* toksinlerinin tespit edilmesi gerektiği ifade edilmektedir. Bu amaçla Toksin Nötralizasyon Testi (TNT), ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), Lateks Aglütinasyon Testi ve PCR teknikleri kullanılır. Bağırsak dokusunda ise immünohistokimya gibi teknikler yardımıyla *C. perfringens* ve toksinleri tespit edilebilir. Enterotoksemi tanısında faydalanan bazı teknikler Şekil 1.6'da özetlenmiştir (Pawaiya ve ark 2020).



Şekil 1.6. Enterotoksemi tanı yöntemleri (Pawaiya ve ark 2020'den uyarlanmıştır).

Klostridial hastalıkların teşhisi için son zamanlarda laboratuvar hayvanlarının kullanımı azalmış olsa da Tetanoz ve Botulismus gibi hastalıkların teşhisi için deney hayvanları hala kullanılmaktadır (Markey ve ark 2013). Toksinlerin nötralizasyonuna dayanan in vivo TNT, 1931'den beri *C. perfringens*'in toksin tiplerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Uzal ve ark 2003, Miclard ve ark 2009). Manipülasyon hataları nedeniyle test sonuçlarında değişkenliklerin görülmesi ve zaman kaybına yol açması bu testin dezavantajlarından. Ek olarak son yıllarda

hayvan refahı konularında artan hassasiyet toksin tespiti için alternatif metotların kullanımını yaygınlaştırmıştır (Stiles ve ark 2013). ELISA, bağırsak içeriğinde *C. perfringens* toksinlerini spesifik olarak saptayan hassas ve nicel bir testtir. Bu test TNT ile uyumlu sonuçlar vermesi nedeniyle günümüzde alternatif olarak yaygın şekilde kullanılır (Uzal ve ark 2003, Duracova ve ark 2018). ELISA yöntemlerinin duyarlılığı genellikle in vivo yöntemlerden daha fazladır ve diğer bulguların yokluğunda yanlış tanıya yol açabilir (Uzal ve Songer 2008). Son yıllarda kütle spektrometrisi tekniklerinin (LC-MS, MALDI-TOF) de toksin miktarını belirlemek için kullanıldığı ifade edilmektedir (Seyer ve ark 2012, Dupré ve ark 2015). Diğer yöntemlere göre maliyetin daha yüksek olması ve toksinlerin biyolojik aktivitesinin belirlenememesinden dolayı kütle spektrometrisi teknikleri pratik değildir.

Sürekli artan sayıda özel tanı aracına rağmen, *C. perfringens* ile ilişkili enterik hastalıkların pratik ve kolay yoldan kesin teşhisinin veteriner dünyası için bir sorun olmaya devam ettiği söylenebilir. Uygun patolojik örneklerde klinik belirtilerin, makroskobik ve mikroskobik bulguların, bakteriyolojik verilerin ve toksin analizinin yorumlanması, tanısal kesinlik elde etmek için gereklidir ve bu durumda bile %100 kesinliğe nadiren ulaşılabilir.

Tip B ve tip D enterotoksemi şüpheli durumlarda makroskobik ve histopatolojik olarak beyin dokusunun incelenmesi faydalıdır. Serebellar vermisin foramen magnumdan herniasyonu (serebellar konikleşme) ve FSE, tip D enterotoksemiye düşündürülebilir (Rings 2004, Uzal ve Songer 2016, Uzal ve ark 2016). Ancak serebellar konikleşme ensefalit, intrakranial ödem, hematoma ve neoplaziler gibi kafa içi basıncı arttıran nedenlerin bir sonucu olarak da ortaya çıkabilir. Tüm vakalarda oluşmamasına rağmen FSE'nin varlığı subakut ve kronik tip D enterotoksemide patognomik olarak kabul edilir. Tip D enterotoksemili koyunların yaklaşık %90'ının beyinde gözlemlenen perivasküler proteinli ödemin diagnostik bir değişiklik olduğu ifade edilmiştir (Uzal ve ark 2004, Uzal ve Songer 2008, Uzal ve ark 2016). Ancak bu lezyonların bulunmaması muhtemel bir enterotoksemi tanısını engellemez. İmmunohistokimya, bağırsak içeriğinin yetersiz olduğu, kültür ve PCR ile toksin geni tespitinin mümkün olmadığı durumlarda kullanılabilen bir yöntemdir. IHC ile insan (Bos ve ark 2005) ve keçilerde bağırsak mukozasında enterotoksin (Miyakawa ve ark 2007); at (Bacciarini ve ark 2003, Hazlett ve ark

2011) ve keçilerde (Uzal ve ark 2008) gastrointestinal sisteminin farklı bölümlerinde beta2 toksin; domuzlarda (Miclard ve ark 2009) ince bağırsakta *C. perfringens* beta toksinin tespit edildiği ifade edilmiştir.

1.8. Tedavi ve Koruma

Veteriner sahada enterotoksemi, hayvan refahı, teşhis, tedavi ve aşılama maliyetleri bakımından önemli olumsuz sonuçlara yol açar. Özellikle akut olgularda dehidrasyon, asidoz ve şokun önlenmesine odaklanılır. Bakteriyel çoğalma oral ve/veya parenteral antibiyotik tedavisi ile inhibe edilebilir. Diyareli koyun ve keçilerde *C. perfringens* için antibiyogram sonuçlarında siprofloksasin, penisilin ve seftriaksonun en etkili antibiyotikler olduğu ifade edilmiştir (Hussain ve ark 2018). Ancak üretilmiş olan yüksek miktardaki toksinler üzerine antibiyotiklerin etkisi olmadığı bilinir. Hayvanın dehidrasyon durumu kontrol edildikten sonra sürgüt ilaçlar ile toksinler bağırsaklardan uzaklaştırılabilir. Ancak hastalığın oluşması için gereken toksin miktarları oldukça düşüktür. Özellikle genç hayvanlarda perakut ya da akut seyirde görülen %100'e yakın vaka ölüm oranı tedaviyi imkansız hale getirir (Rings 2004, Markey ve ark 2013).

Enterotoksemi için yapılan aşılama ve profilaksi tedbirleri önemlidir. Aşılamada, *Clostridium perfringens*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium novyi*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium septicum* ve *Clostridium tetani* gibi klostridial türlerden elde edilen toksoid polivalan aşılar kullanılır. Ayrıca *Mannheimia haemolytica* gibi diğer bakterileri de içeren kombine aşılar da profilaksi amacıyla tercih edilmektedir (Lebrun ve ark 2010). Gebe hayvanların, kuzu, oğlak ve buzağların aşılama ile enterotoksemi mücadelesinde başarıya ulaşılabilir. Yapılan çalışmalarda aşılanmış gruplarda hastalığın görülme ihtimalinin belirgin oranda düşük olduğu ifade edilmiştir (Ahsani ve ark 2011). Hayvanlar arasında gelişen antikor yanıtında bireysel ve tür farklılıkları sıklıkla görülmektedir. Koyunlar, ilk aşılamadan 28-42 gün sonra rapel doz uygulandığında bir yıl korunur ve yıllık olarak aşılama tekrarlanır (Uzal ve Kelly 1998). Keçilerde oluşan antikor yanıtın düşük olması nedeniyle ilk çift doz aşılamadan sonra üç veya dört ayda bir tekrar aşılama yapılması önerilmektedir (Blackwell ve ark 1983). İnekler gebeliğin yedi veya sekizinci ayında aşılanabilir. Aşılı gebe sığırların buzağları ise postpartumun

dördüncü ayından itibaren aşılabilir. Güçlendirici aşılama ise enterotokseminin ortaya çıkma ihtimalinin yüksek olduğu dönemlerden 3-4 hafta önce yapılmalıdır. Aşılı hayvanlardan elde edilen kolostrumun, zayıf ve annesiz kalan neonatal hayvanlara hayatlarının ilk 48 saatinde içirilmesi faydalı olabilir (Clarkson ve ark 1985).

Tane yem miktarı yüksek olan yemlerin tüketilmesi, sütten kesilme ve taze yeşil otları içeren meralara erişim dönemleri *C. perfringens* kaynaklı hastalıkların oluşması için hayvanları risk altına sokabilir. Küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinde üçüz/dördüz doğumlar kolostrum ile sağlanan pasif bağışıklıkta yetersizliğine yol açabilir. Bu dönemlerde bakım ve besleme konularına dikkat edilmeli, bağırsak florasının korunması amacıyla rasyona probiyotik eklenmesi tavsiye edilebilir (Ewaschuk ve ark 2004, Timmerman ve ark 2005). Aşı üretim ve aşılama stratejilerinin gelişmesine rağmen iyi bir sürü yönetimi uygulaması enterotoksemi önlemenin en ekonomik yolu olmaya devam etmektedir.

Sunulan projede temel olarak Marmara Bölgesi'nde enterotoksemi şüphesiyle ölen ruminantlarda ELISA ile *C. perfringens* tiplerinin belirlenmesi, bu olguların histopatolojik ve etken düzeyinde immunohistokimyasal bulgularının araştırılması ve sonuçların birbiriyle uyumlarının karşılaştırılması amaçlandı. Toksinlerin bağırsaklardan hızlı bir şekilde emilmesi, yıkımlanması, yetersiz, eksik, geç veya uygun olmayan şartlarda numunelerin laboratuvara gönderilmesi gibi nedenlerle sıklıkla toksin bazlı diagnostik güçlükler ortaya çıkabilmektedir. Buradan hareketle çalışmamız sonunda elde edilen tüm bulgular (ELISA, makroskopik, histopatolojik ve immunohistokimyasal) değerlendirilerek, uygunsuz şartlar nedeniyle toksin tespitinin mümkün olmadığı ya da toksin tip tayini yapılamayan şüpheli olgularda *C. perfringens*'in lezyonlu bağırsak mukozasında immunohistokimyasal yöntemle gösterilmesinin tanıya herhangi bir katkısının olup olmayacağının belirlenmesi hedeflendi.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Sunulan çalışma, Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü (PVKE)'nin sorumluluk alanında bulunan Marmara Bölgesi'ndeki İl/İlçe Tarım ve Orman Müdürlüklerinden 1 Ocak 2020 ile 31 Aralık 2020 tarihleri arasında teşhis amacıyla gönderilen enterotoksemi şüpheli büyük ve küçük ruminantlarda yapıldı. Bu hayvanların tür, yaş grubu ve illere göre dağılımı Tablo 2.1'de sunuldu. Çalışmada 128 adet farklı işletmeden ve değişen yaşlarda toplam 150 adet hayvan kullanıldı.

Tablo 2.1. Değerlendirmeye alınan hayvanların tür, yaş grubu ve illere göre dağılımı.

İl	Kuzu	Koyun	Oğlak	Keçi	Buzağı	Sığır	Toplam
Balıkesir	9	5	0	0	3	0	17
Bilecik	0	1	0	3	0	0	4
Bursa	16	2	3	0	1	0	22
Çanakkale	9	3	2	1	0	0	15
Düzce	0	2	0	0	1	1	4
Edirne	14	1	2	1	5	1	24
İstanbul	4	2	1	0	1	1	9
Kırklareli	9	3	5	0	0	0	17
Kocaeli	8	3	1	0	2	1	15
Sakarya	4	2	1	0	1	0	8
Tekirdağ	5	3	0	1	0	0	9
Yalova	3	0	0	2	0	1	6
Toplam	81	27	15	8	14	5	150

Çalışmaya dahil edilen hayvanların seçiminde araştırmacılar (Uzal ve Songer 2008, Uzal ve ark 2016, Ortega ve ark 2019) tarafından enterotoksemili hayvanlarda bildirilen; ani ölüm, diyare, enteritis, abdominal sancı, opistotonus ve konvülsiyon gibi klinik semptomlar ile hidroperikardiyum, hidrotoraks, asites, kanamalı-gazlı ve sulu mide bağırsak içeriği ile pulmoner ödem gibi makroskobik bulguların gözlenmesi, başlıca kriterler olarak değerlendirildi. Değerlendirilmeye alınan tüm

hayvanların sistemik nekropsi ve makroskopik incelemeleri yapılarak lezyonlu organ ve dokuların fotoğrafları çekildi. Daha sonra histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler için tüm organlardan numuneler alındı. Ayrıca hayvanlara ait bağırsak içerikleri Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Clostridium Referans Laboratuvarına *C. perfringens* toksinlerinin tespit edilmesi amacıyla vakit geçirilmeksizin iletildi. Çalışmamızdaki örneklerin 42 (%28)'si ilkbahar, 29 (%19,33)'u yaz, 15 (%10)'i sonbahar ve 64 (%42,67)'ü kış mevsiminde toplandı. Enterotoksemi şüphesi ile çalışmaya dahil edilen hayvanların mevsim, tür ve yaşlarına göre dağılımı Tablo 2.2'de sunuldu.

Tablo 2.2. Enterotoksemi şüpheli örneklerin mevsimlere göre dağılımı.

Mevsimler	Kuzu	Koyun	Oğlak	Keçi	Buzağı	Sığır	Toplam (%)
İlkbahar	21	9	6	1	3	2	42 (%28)
Yaz	14	8	3	2	2	0	29 (%19,33)
Sonbahar	7	2	1	0	4	1	15 (%10)
Kış	39	8	5	5	5	2	64 (%42,67)
Toplam	81	27	15	8	14	5	150 (%100)

2.2. Yöntem

2.2.1. Makroskopik İnceleme

Değerlendirmeye alınan farklı yaş grubundan toplamda 150 adet koyun, keçi ve sığırın sistemik nekropsileri yapıldı. Dış bakıda vücut kondüsyon durumu, diyare ve muköz membranlar; iç bakıda ise perikardiyal kese, göğüs ve karın boşluğunda sıvı birikimi, akciğer, kalp, karaciğer, böbrekler, abomasum, bağırsaklar ve mezenteriyal lenf düğümlerinde gözlenen değişiklikler kaydedildi. Daha sonra mide-bağırsak lümeni ve mukozasının muayenesi yapıldı. Mukoza yüzeyinde gözlenen lezyonlar kaydedildi. Kafatası uygun şekilde açılarak beyin ve beyincik, konjesyon, hemoraji ve ödem varlığı yönünden incelendi. Araştırmacıların (Uzal ve ark 2004, Mete ve ark 2013) bildirdiği şekilde, beyin ve beyincik 24-72 saat %10'luk nötral formaldehitte tespit edildi. Daha sonra yaklaşık 0,5-1 cm kalınlığında koronal kesitler yapıldı. Beyin ve beyincikten hazırlanan bu kesitler makroskopik olarak hemoraji ve malasi lezyonları yönünden incelendi.

2.2.2. *C. perfringens* Toksinlerinin Tespiti

Nekropsileri yapılan farklı yaş ve türden ruminanta ait ince bağırsak içerikleri *C. perfringens* toksinlerinin (α , β ve ϵ) tespiti için kullanıldı. Toksin tespiti PVKE Clostridium Referans Laboratuvarı tarafından ticari bir ELISA kiti (Bio-X, Diagnostics Multiscreen ELISA, Enterotoxemia Belgium) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirildi. Belirlenen toksin türlerine göre de *C. perfringens* tiplendirilmesi yapıldı. Kullanılan ELISA kitinin sadece *C. perfringens* α , β ve ϵ toksinlerinin tespitine yönelik olmasından dolayı diğer toksinlerin tespitine yönelik bir analiz yapılamadı.

2.2.3. Histopatolojik İnceleme

Sistemik nekropsileri yapılan hayvanların bütün organlarının makroskobik muayenesi yapılarak, özellikle lezyonlu organlar başta olmak üzere sindirim sistemi organlarından (abomasum, duodenum, jejunum, ileum, ileosekal valf, sekum, kolon ve mezenterik lenf düğümleri) alınan parçalar %10'luk nötral formaldehit solüsyonunda 24-72 saat tespit edildi. Tespit sonrası dokular, 2-3 mm kalınlığında küçültüldükten sonra doku takip kasetlerine konularak 24 saat akan suda yıkandı. Çeşme suyunda yıkanan dokular, otomatik doku takip cihazında (Citadel 1000, Shandon Scientific, England) dereceli alkoller ve ksilol serisinden geçirilerek parafinizasyon işlemine tabi tutuldu. Daha sonra dokular parafine gömülerek parafin bloklar hazırlandı. Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom (FINESSE, Shandon Scientific, England) ile 5 μ m kalınlığında alınan kesitler kurutma tablasında (Hearson, England) kurutulduktan sonra Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyanarak (Luna 1968), binoküler başlıklı ışık mikroskopunda (AXIO Imager.D2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) incelendi. Önemli görülen olgulardan mikroskobik fotoğraflar çekilerek dijital ortama aktarıldı (Axiacam 712 color, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). Ayrıca tüm olgulara ait abomasum, mezenterik lenf düğümü, ince ve kalın bağırsak bölümlerinden immunohistokimyasal inceleme için adezivli lamlara (Polysine™, VWR, Cat. No. 631-0107, Leuven) 5 μ m kalınlığında kesitler alındı.

2.2.4. İmmunohistokimyasal İnceleme

Tüm olgulara ait abomasum, mezenterik lenf düğümü, ince ve kalın bağırsak bölümlerinden alınan kesitler immunohistokimyasal boyamada kullanıldı. *C. perfringens* antijenlerinin tespiti için daha önceden araştırmacılar tarafından (Diab ve ark 2012) bildirilen indirekt immunohistokimyasal boyama yönteminden yararlanıldı. İmmunohistokimyasal boyama için rabbit poliklonal anti-*C. perfringens* (ab325023, Abcam) primer antikoru ve Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC Detection Kit-Micro-Polymer (ab236469, Abcam) boyama kiti kullanıldı. Alınan kesitler kurutma tablasında kurutuldu. Ksilollerde 3 kez 5'er dakika deparafinize edilen kesitler 100, 96, 90, 80 ve 70 derecelik alkollerde 3'er dakika tutularak rehidre edildi. Fosfat buffer+Tween 20 (Bio-optica, PBS+Tween 20 Soluzione Lot:4419, Milano-Italy) solüsyonu ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için %3'lük hidrojen peroksit solüsyonu damlatıldı ve 15 dakika sonra kesitler, PBS+Tween 20 ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Kesitler, mikrodalga fırında 80 watt'da 15 dakika kaynatılmış sitrat buffer (pH 6.0) (Bio-Optica, Tampone Citrato Lot:2120, Milano-Italy) içerisine alınarak mikrodalga fırında 40 watt'da 15 dakika antijen retrieval işlemi yapıldı. Mikrodalga fırından alınan kesitler oda sıcaklığında 20 dakika soğumaya bırakıldı. Sonra sırasıyla 5'er dakika distile su ve PBS+Tween 20 ile yıkandı. Manuel boyama setine yerleştirilen kesitlere oda sıcaklığında nonspesifik boyanmayı engellemek için kit içeriğinde bulunan protein block solüsyonu (Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC Micro-Polymer Kit, ab236469) dokuların üzerini kaplayacak şekilde damlatılarak 5 dakika inkübe edildi. Protein block solüsyonu akıtıldı ve yıkama yapılmadan antikor dilüent (Bio-Optica, Primer Antibody Diluting Buffer Lot:1820, Milano-Italy) ile 1:200 oranında sulandırılan rabbit anti-*C. perfringens* kesitlerin üzerine damlatıldı ve oda sıcaklığında karanlık ortamda 2 saat bekletildi. Daha sonra PBS+Tween 20 ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Kit içeriğinde bulunan HRP-Conjugate (Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC Micro-Polymer Kit, ab236469) kesitlerin üzerini kaplayacak şekilde damlatılarak 15 dakika karanlık ortamda bekletildikten sonra PBS+Tween 20 ile 4 kez yıkandı. DAB (3,3'-diaminobenzidine, Lot:57767 ScyTek, Chromogen/Substrate Kit, Utah-ABD), prosedürüne uygun olarak hazırlandıktan sonra 0.2 µm'lik filtre kağıdından süzüldü ve her lama 500 µl olacak şekilde damlatılarak 30-50 saniye oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra kesitler distile suyla yıkanıp 5 dakika dinlendirildi. Mayer's

Hematoksilen (Lot:HX03021349 Sigma-Aldrich Merck, Darmstadt Germany) ile 30-50 saniye zıt boyama yapılan kesitler daha sonra 10 dakika alkol ve 10 dakika ksilolde bekletildi ve entellan ile lamel kapatıldı. Her bloktan negatif kontrol için de kesitler hazırlandı. İmmunohistokimyasal boyamada kullanılan negatif kontrollerde de aynı prosedür takip edildi. Ancak primer antikorun eklenmediği saf antikor dilüent kullanıldı. Navarro ve ark (2018b) tarafından bildirildiği şekilde *C.perfringens* izole edildiği bilinen bağırsak kesiti pozitif kontrol olarak kullanıldı. Boyanan tüm kesitler binoküler başlıklı ışık mikroskopunda (AXIO Imager.D2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) incelenerek değerlendirildi.

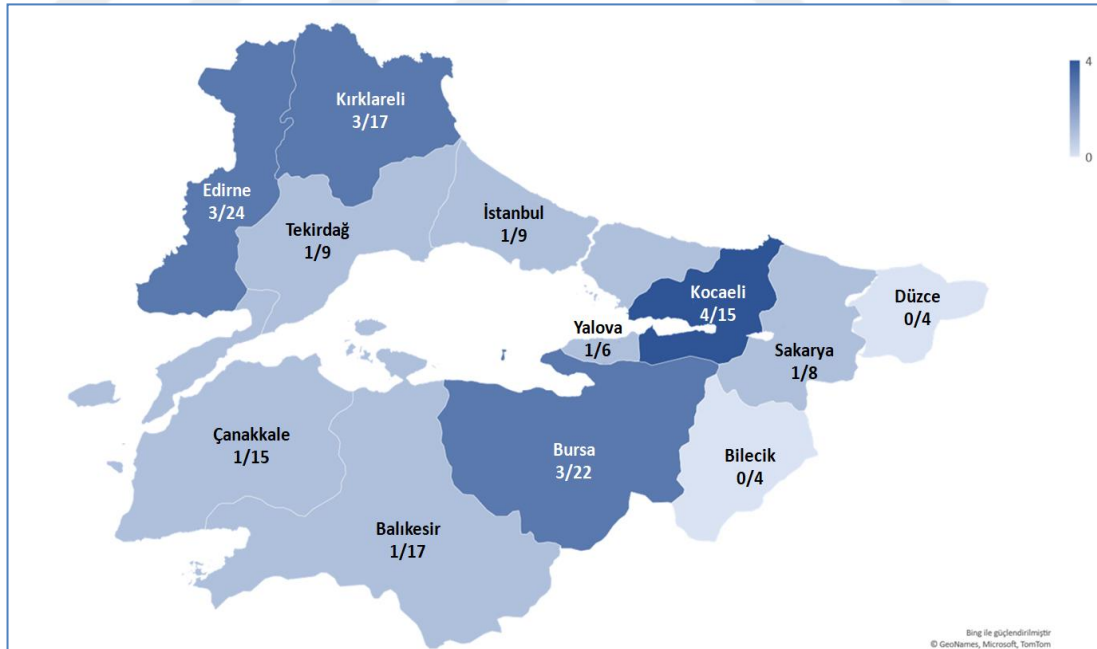
2.2.5. İstatistiksel İnceleme

ELISA ile toksin tespiti ve anti-*C.perfringens* immunohistokimyasal boyanması arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı istatistiksel yöntemlerle araştırıldı. Gruplar arasındaki farkın önemlilik düzeyinin değerlendirilmesinde Pearson Chi-kare testi kullanıldı. ELISA ile *C. perfringens* toksinleri tespit edilen ve edilemeyen hayvanlara ait bağırsak kesitlerinin farklı lokasyonlarında anti-*C. perfringens* için yapılan immunohistokimyasal boyama sonuçlarının istatistiksel olarak kıyaslanması ve pozitif olgularla değerlendirilmesinde Spearman Korelasyon Testi kullanıldı. İstatistiki analizler SPSS paket programı (Versiyon 29, IBM Inc., USA) paket programı ile gerçekleştirildi. $p<0,05$ (%95 güven aralığı) olan istatistiksel sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi.

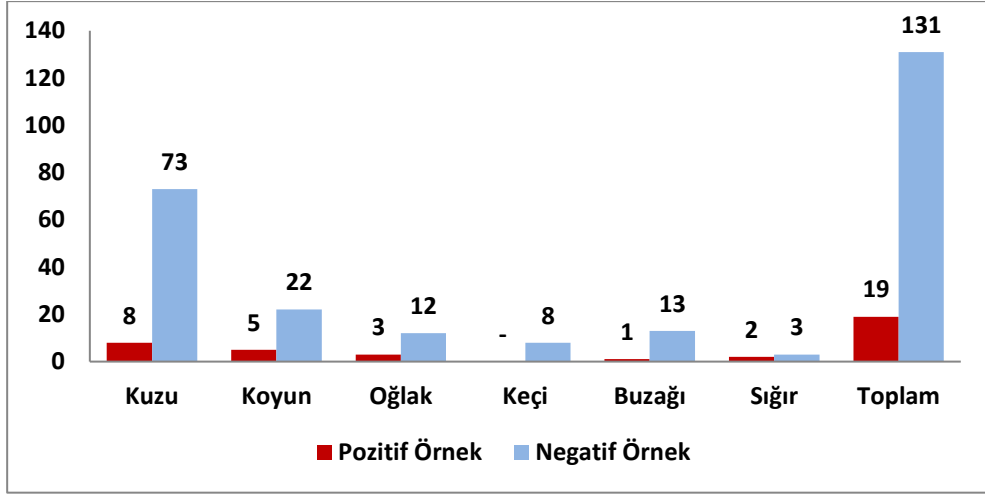
3. BULGULAR

3.1. *C. perfringens* Toksinlerinin Tespiti

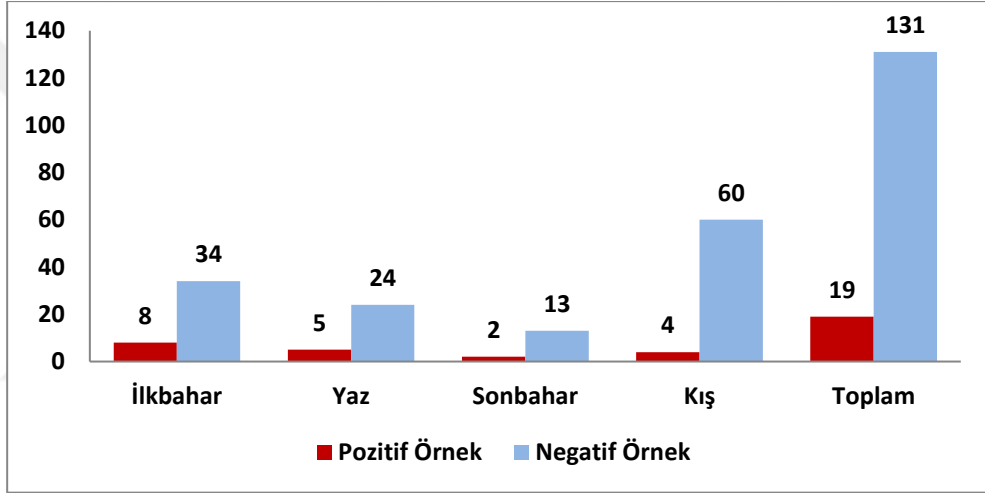
ELISA ile 150 adet hayvana ait bağırsak örneklerinden 19 (%12,67)'u *C. perfringens* toksinlerinden (alfa, beta ve epsilon) en az biri yönünden pozitif tespit edilirken, 131 (%87,33)'inde herhangi bir *C. perfringens* toksini tespit edilemedi. Toksin pozitif hayvanların 18 farklı işletmeden örneklendiği belirlendi. Toksin tespit edilen ve edilemeyen örneklerin toplandığı iller Şekil 3.1'de verildi. Toksin tespit edilen hayvanların tür dağılımı Grafik 3.1'de sunuldu. Mevsimlere göre enterotoksemi vakalarının gelen örnek sayılarına göre oranları ilkbahar, yaz, sonbahar ve kış mevsiminde sırasıyla, 8/42 (%19,05), 5/29 (%17,24), 2/15 (%13,33) ve 4/64 (%6,25) olarak tespit edildi (Grafik 3.2). Toksin tespit edilen örneklerden 10 (%52,63)'u *C. perfringens* tip A, 1 (%5,26)'i *C. perfringens* tip C ve 8 (%42,11)'i *C. perfringens* tip D olarak tiplendirildi (Tablo 3.1). Toksin pozitif örneklerden 16 (%84,21)'si küçük ruminant ve 3 (%15,79)'ü büyük ruminantlara aitti. Yaş grubuna göre bakıldığında ise olguların 12 (%63,16)'sinin kuzu, oğlak ve buzağıdan; 7 (%36,84)'sinin koyun ve sığırlardan oluştuğu belirlendi.



Şekil 3.1. Marmara Bölgesinden elde edilen pozitif/toplam örnek sayısının illere göre dağılımı.



Grafik 3.1. Toksin tespit edilen örneklerin hayvan türlerine göre dağılımı.



Grafik 3.2. Mevsimlere göre enterotoksemi pozitif örneklerin dağılımı.

Tablo 3.1. Toksin tespit edilen örneklerde toksin türüne göre *C. perfringens* tiplerinin dağılımı.

<i>C. perfringens</i> tipi ve toksin türleri	Hayvan sayısı	%
<i>C. perfringens</i> tip A (alfa toksin)	10	52,63
<i>C. perfringens</i> tip B (alfa, beta, epsilon toksin)	-	-
<i>C. perfringens</i> tip C (alfa, beta toksin)	1	5,26
<i>C. perfringens</i> tip D (alfa, epsilon toksin)	8	42,11
Toplam	19	100

Enterotoksemi şüphesi ile çalışmaya dahil edilen farklı yaş ve türlerden hayvanlar dikkate alındığında, 81 adet kuzudan 8'inde; 27 adet yetişkin koyundan

5'inde; 15 adet oğlaktan 3'ünde, 14 adet buzağıdan 1'inde ve 5 adet sığırdan 2'sinde toksin tespit edilirken, 8 adet keçinin hiçbirinde toksin tespit edilemedi (Grafik 3.1). *C. perfringens* toksini tespit edilen 5 adet kuzu, 2 adet yetişkin koyun, 2 adet oğlak ve 1 adet sığır tip A; 1 adet buzağı tip C; 3 adet kuzu, 3 adet yetişkin koyun, 1 adet oğlak ve 1 adet yetişkin sığır tip D olarak tiplendirildi (Tablo 3.2). Küçük ruminantlara ait örnekler incelendiğinde, 131 adet bağırsak içeriğinden 16 (%12,21)'si *C. perfringens* toksinlerinden (alfa, beta ve epsilon) en az biri yönünden pozitif bulunurken, 115 (%87,79) adet örnek negatif bulundu. Küçük ruminantlara ait pozitif bulunan numunelerden 9 (%56,25)'u tip A ve 7 (%43,75)'si tip D olarak tiplendirildi. Çalışmada yer alan enterotoksemili hayvanlarda tespit edilen *C. perfringens* toksinleri ve tiplendirilmesi tablo 3.3'de ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Tablo 3.2. *C. perfringens* toksin tiplerinin hayvan türlerine göre dağılımı.

Hayvan Türü	n	<i>C. perfringens</i> Tipi*				
		Toksın Pozitif Örnek	Tip A (α)	Tip B (α, β, ϵ)	Tip C (α, β)	Tip D (α, ϵ)
Kuzu	81	8 (%9,88)	5 (%62,50)	-	-	3 (%37,50)
Koyun	27	5 (%18,52)	2 (%40)	-	-	3 (%60)
Oğlak	15	3 (%20)	2 (%66,67)	-	-	1 (%33,33)
Keçi	8	-	-	-	-	-
Buzağı	14	1 (%7,14)	-	-	1 (%100)	-
Sığır	5	2 (%40)	1 (%50)	-	-	1 (%50)
Toplam	150	19 (%12,67)	10 (%52,63)	-	1 (%5,26)	8 (%42,11)

*Bağırsak içeriğinde ELISA testi ile α , β ve ϵ toksin varlığı esas alınarak belirlendi.

Koyunlara (kuzu ve yetişkin koyun) ait örnekler incelendiğinde, 108 adet bağırsak içeriğinden 13 (%12,04)'ünde *C. perfringens* toksinlerinden (alfa, beta ve epsilon) en az biri pozitif bulunurken, 95 (%87,96)'inde toksin tespit edilemedi. Pozitif bulunan örneklerden 7 (%53,85)'si tip A ve 6 (%46,15)'si tip D olarak tiplendirildi. Keçilere (oğlak ve yetişkin keçi) ait örnekler incelendiğinde, 23 adet bağırsak içeriğinden 3 (%13,04)'ünde en az bir toksin pozitif bulunurken, 20 (%86,96)'sinde toksin tespit edilemedi. Kuzu ve oğlaklara ait toplam 96 adet bağırsak içeriğinden 11 (%11,46)'i en az bir toksin yönünden pozitif bulundu. Bu örneklerden 7 (%63,64)'si tip A ve 4 (%36,36)'ü tip D olarak belirlendi. Sığırlara (buzağı ve yetişkin sığır) ait örnekler incelendiğinde ise, 19 örnekten 3 (%15,79)'ü en az bir toksin yönünden pozitif bulunurken, 16 (%84,21)'si negatif bulundu.

Tablo 3.3. Enterotoksemili hayvanlarda belirlenen toksin türleri ve etken tiplendirme.

Hayvan türü	ELISA			Tip*
	α	β	ϵ	
Kuzu-1	+	-	-	Tip A
Kuzu-37	+	-	+	Tip D
Kuzu-43	+	-	-	Tip A
Kuzu-44	+	-	+	Tip D
Kuzu-48	+	-	-	Tip A
Kuzu-50	+	-	+	Tip D
Kuzu-58	+	-	-	Tip A
Kuzu-66	+	-	-	Tip A
Koyun-9	+	-	-	Tip A
Koyun-11	+	-	+	Tip D
Koyun-12	+	-	+	Tip D
Koyun-14	+	-	-	Tip A
Koyun-19	+	-	+	Tip D
Oğlak-4	+	-	-	Tip A
Oğlak-12	+	-	-	Tip A
Oğlak-15	+	-	+	Tip D
Buzağı-8	+	+	-	Tip C
Sığır-2	+	-	+	Tip D
Sığır-3	+	-	-	Tip A

*Bağırsak içeriğinde ELISA testi ile α , β ve ϵ toksin varlığı esas alınarak belirlendi.

3.2. Makroskopik Bulgular

Enterotoksemili hayvanların sindirim kanalında yapılan makroskopik incelemelerde genel olarak; abomasum mukozasında peteşiyel hemoraji, bağırsaklarda sıvı içerik veya gaz nedeniyle dilatasyon, serozasında hiperemi ve ödem, lümenlerinde hemorajik ya da sarı/yeşilimsi renkli bol miktarda sıvı içerik ile yer yer mukozal hemorajiler gözlendi. Bunun dışında bazı hayvanlarda perineal bölgenin sıvı içerikle kirlenmesi; mukoza, deri altı yağ ve bağ dokusunda ikterus; perikardiyal kese içerisinde saman sarısı renkte ve hava ile temasta pıhtılaşan sıvı birikimi ile karakterize hidroperikardiyum; akciğerlerde trakea lümeninde köpüklü sıvı birikimi ile karakterize pulmoner ödem ve özellikle kranial loplarda hepatizasyon; subepikardiyal peteşiyel kanama; beyinde meningeal hiperemi,

sulkuslarda daralma, beyin ödemi nedeniyle serebellumda vermis bölümünün foramen magnuma kısmi herniasyonu (serabellar konikleşme); böbreklerde diffuz solgun renk değişikliği ve kıvamında yumuşama, subkapsüler kanamalar ya da konjesyon; idrar kesesinde hemorajik-koyu renkte sıvı birikimi; karaciğerde diffuz solgun renk değişikliği ve kıvamında gevreklik görüldü. Enterotoksemili tüm hayvanlarda kaydedilen başlıca makroskobik bulgular hayvan türü, yaş ve toksin tiplerine göre Tablo 3.4'de sunuldu. Ayrıca toksin tespit edilen ve edilemeyen olgularda makroskobik bulguların hayvan türü ve etken tiplerine göre dağılımı ise Tablo 3.5'de özetlendi.

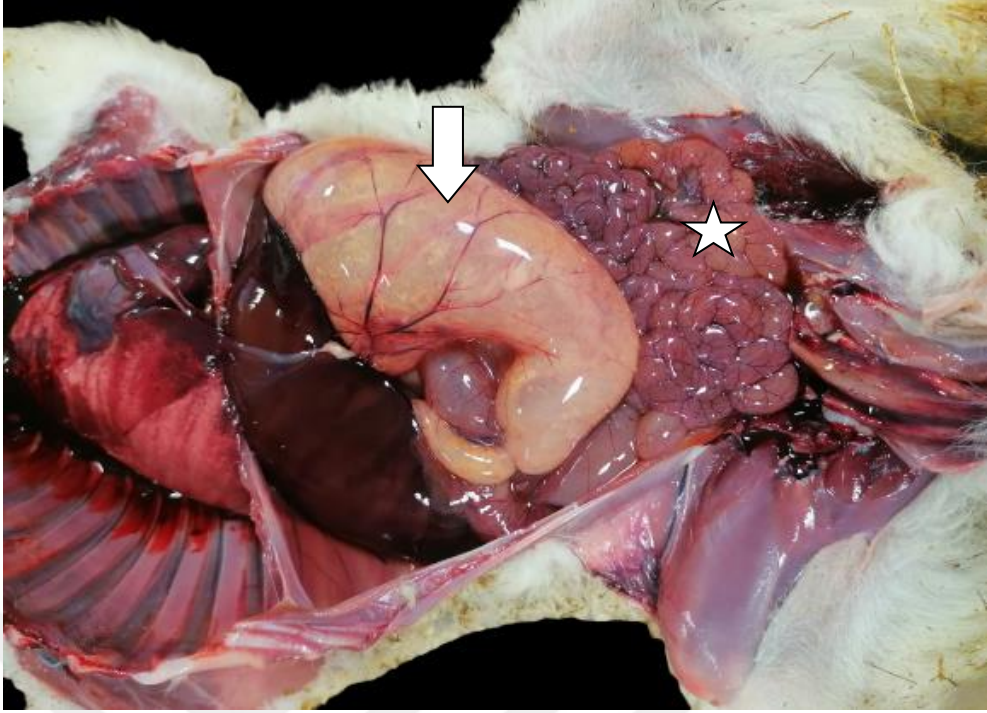
Enterotoksemili kuzu ve yetişkin koyunlarda bağırsaklarda serozal hiperemi (Şekil 3.2) ve dilatasyon (Şekil 3.3), lümeninde hemorajik (Şekil 3.4 ve 3.5) veya sarı/yeşilimsi renkte bol miktarda içerik ve mukozasında yer yer hemoraji (Şekil 3.6), pulmoner ödem (Şekil 3.7) ile subepikardiyal peteşiyel hemoraji (Şekil 3.8) ve mezenterial lenf düğümlerinde büyüme yaygın olarak görülen makroskobik bulgularıdır. Ayrıca hidroperikardiyum (Şekil 3.9), akciğerlerde hepatizasyon, beyinde meninkslerde hiperemi (Şekil 3.10), beyin ödemi nedeniyle serebellumun konikleşmesi (Şekil 3.11), böbreklerde diffuz solgun renk değişikliği ve kıvamında yumuşama, subkapsüler kanama ve/veya konjesyon (Şekil 3.12), karaciğerde diffuz solgun renk değişikliği ve kıvamında gevreklik, idrar kesesinde koyu-hemorajik sıvı birikimi (Şekil 3.13) görüldü. Bu bulgulara ek olarak sadece tip A enterotoksemili bir kuzuda (kuzu-1) abomasum mukozasında peteşiyel hemoraji gözlemlendi. Tip A enterotoksemili iki kuzu (kuzu-43 ve kuzu-48) ile tip D enterotoksemili bir koyunda (koyun-11) ikterus dikkati çekti.

Tablo 3.4. Enterotoksemili hayvanlarda gözlenen başlıca makroskobik bulgular ve *C. perfringens* tipleri.

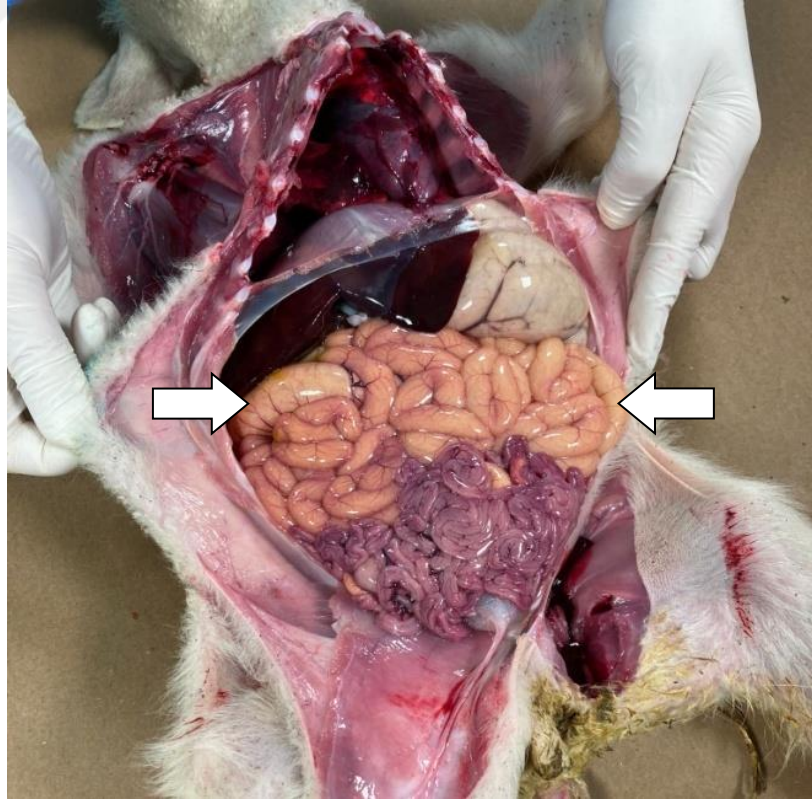
Hayvan No (n=19)	Lezyon									Tip*
	İkterus	Akciğer (Öd/Hp)	Hidroperikardiyum	Kalp (Pe)	Böbrek (Yu/Ko)	Karaciğer (So)	Beyin Öd/Hi	Bağırsaklar		
								Mukozal Hemoraji	Sıvı içeriği	
Kuzu-1	-	+/-	+	-	+/-	+	-/+	+	Hemorajik	Tip A
Kuzu-37	-	+/-	+	-	-/-	-	+/+	-	Hemorajik	Tip D
Kuzu-43	+	+/-	+	+	-/+	+	-/-	+	Hemorajik	Tip A
Kuzu-44	-	+/+	+	-	+/-	-	+/+	-	Sarı/yeşilimtrak	Tip D
Kuzu-48	+	-/+	-	+	-/+	+	-/+	+	Hemorajik	Tip A
Kuzu-50	-	-/+	-	+	-/+	-	+/+	-	Sarı/yeşilimtrak	Tip D
Kuzu-58	-	+/-	-	-	-/-	-	-/-	+	Sarı/yeşilimtrak	Tip A
Kuzu-66	-	+/-	-	+	-/-	+	-/-	-	Sarı/yeşilimtrak	Tip A
Koyun-9	-	+/-	-	+	+/-	+	-/-	+	Hemorajik	Tip A
Koyun-11	+	+/-	-	+	-/+	+	+/+	-	-	Tip D
Koyun-12	-	+/-	-	+	+/-	+	-/-	-	-	Tip D
Koyun-14	-	+/+	-	-	-/-	-	-/-	-	-	Tip A
Koyun-19	-	+/-	+	+	-/-	+	-/-	-	-	Tip D
Oğlak-4	-	+/-	-	-	+/-	+	-/-	-	Sarı/yeşilimtrak	Tip A
Oğlak-12	-	+/-	-	+	-/-	+	-/-	-	Sarı/yeşilimtrak	Tip A
Oğlak-15	-	+/+	+	-	+/-	-	-/-	-	Sarı/yeşilimtrak	Tip D
Buzağı-8	-	+/-	-	-	+/-	-	-/-	+	Hemorajik	Tip C
Sığır-2	-	+/-	-	+	-/-	-	-/-	+	Hemorajik	Tip D
Sığır-3	-	+/-	-	+	-/-	-	-/-	+	Hemorajik	Tip A
Öd: Ödem, Hp: Hepatizasyon, Pe: Peteşiyel hemoraji, Yu: Yumuşak kıvam, Ko: Konjesyon, So: Solgun renk ve gevrek kıvam, Hi: Hiperemi *ELISA testi sonuçlarına göre yapılan C. perfringens tiplendirme.										

Tablo 3.5. Toksin tespit edilen ve edilemeyen hayvanlarda makroskobik bulguların türlere ve tiplere göre dağılımı.

Nekropsi Bulguları	Enterotoksemili hayvanlar (n=19)										Diğer hayvanlar (n=131)
	Tip A (n=10)			Tip C (n=1)			Tip D (n=8)			Toplam Görülme Sayısı ve Oranı (%)	
	koyun	keçi	sığır	koyun	keçi	sığır	koyun	keçi	sığır		Görülme Sayısı ve Oranı (%)
İkterus	2	-	-	-	-	-	1	-	-	3 (15,79)	2 (1,53)
Hidroperikardiyum	2	-	-	-	-	-	3	1	-	6 (31,58)	9 (6,87)
Pulmoner ödem	6	2	1	-	-	1	5	1	1	17 (89,47)	65 (49,62)
Akciğerde hepatizasyon	2	-	-	-	-	-	2	1	-	5 (26,32)	22 (16,79)
Subepikardiyal peteşiyel hemoraji	4	1	1	-	-	-	4	-	1	11 (57,89)	29 (22,14)
Beyinde hiperemi	2	-	-	-	-	-	4	-	-	6 (31,58)	18 (13,74)
Serebellumda konikleşme (herniasyon)	-	-	-	-	-	-	4	-	-	4 (21,05)	-
Böbreklerde diffuz solgunluk ve yumuşak kıvam	2	1	-	-	-	1	2	1	-	7 (36,84)	27 (20,61)
Böbrekte supkapsüler kanama	1	-	-	-	-	1	2	-	1	5 (26,32)	6 (4,58)
Böbrekte konjesyon	2	-	-	-	-	-	2	-	-	4 (21,05)	13 (9,92)
Karaciğer solgun renk ve gevrek kıvamda	5	2	-	-	-	-	3	-	-	10 (52,63)	35 (26,72)
İdrar kesesinde kırmızı renkli sıvı birikimi	2	-	-	-	-	-	1	-	-	3 (15,79)	1 (0,76)
Diyare	2	2	-	-	-	-	1	1	-	6 (31,58)	69 (52,67)
Mezenterik lenf düğümlerinde büyüme	5	2	1	-	-	-	3	-	-	11 (57,89)	74 (56,49)
Bağırsaklarda dilatasyon (gaz, sıvı içerik)	3	1	-	-	-	1	1	1	-	7 (36,84)	22 (16,79)
Bağırsaklarda serozal hiperemi	5	2	1	-	-	1	3	1	-	13 (68,42)	94 (71,76)
Bağırsak lümeninde hemorajik içerik	4	-	1	-	-	1	1	-	1	8 (42,11)	19 (14,50)
Bağırsak lümeninde sarı/yeşilimsi içerik	2	2	-	-	-	-	2	1	-	7 (36,84)	21 (16,03)
Bağırsak mukozasında hemoraji	5	-	1	-	-	1	-	-	1	8 (42,11)	40 (30,53)
Bağırsak lümeninde parazit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6 (4,58)



Şekil 3.2. Tip A enterotoksemili bir kuzunun (kuzu-43) abdominal boşluğunun açıldıktan sonraki görünümü. Bağırsaklarda serozal hiperemi (yıldız) ve abomasum gaz ile dilate görünümde (ok).



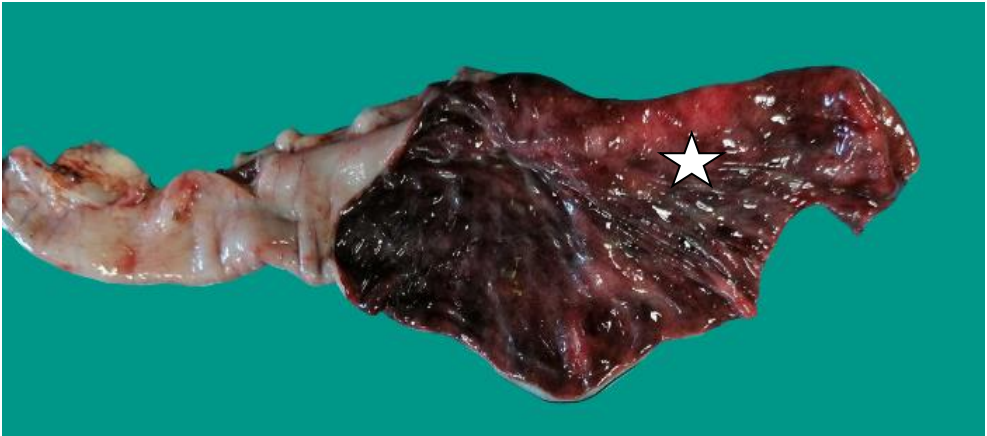
Şekil 3.3. Tip D enterotoksemili bir kuzunun (kuzu-44) bağırsakları sarımtırak renkte ve dilate görünümde (oklar).



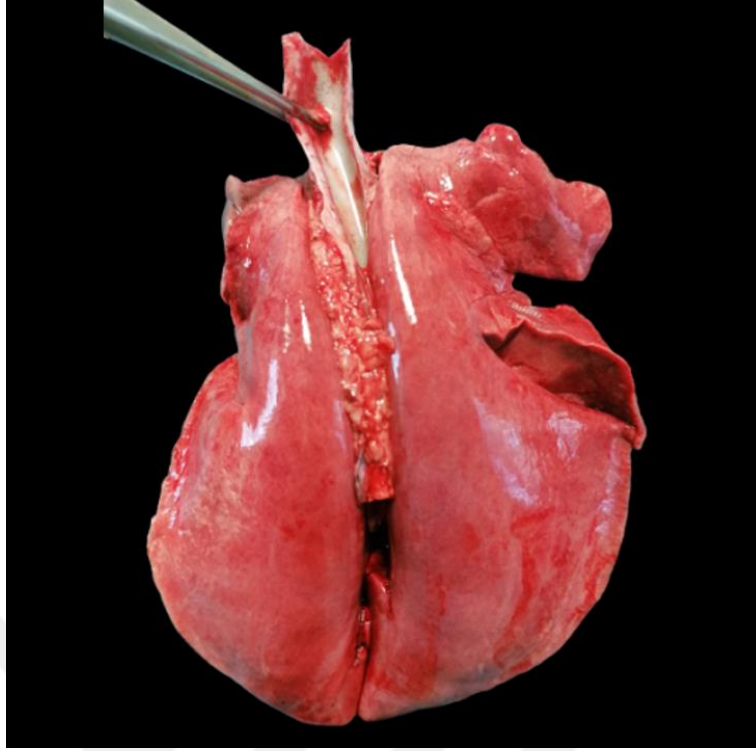
Şekil 3.4. Tip A enterotoksemili kuzunun (kuzu-43) jejunumu. Mukozada konjesyon, lümende yer yer hemorajik içerik.



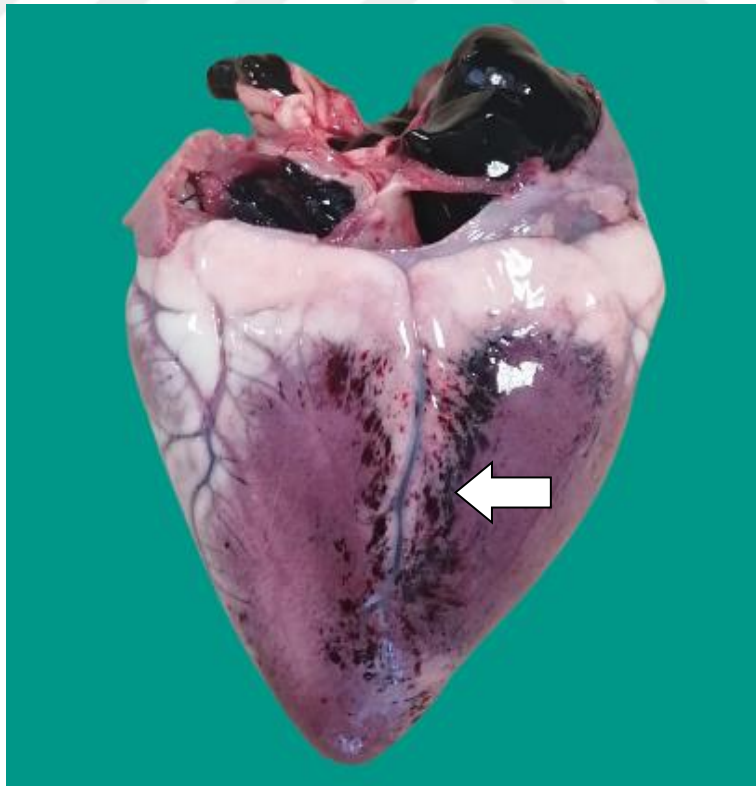
Şekil 3.5. Tip D enterotoksemili bir kuzunun (kuzu-37) ileum lümeninde hemorajik içerik birikimi (yıldız).



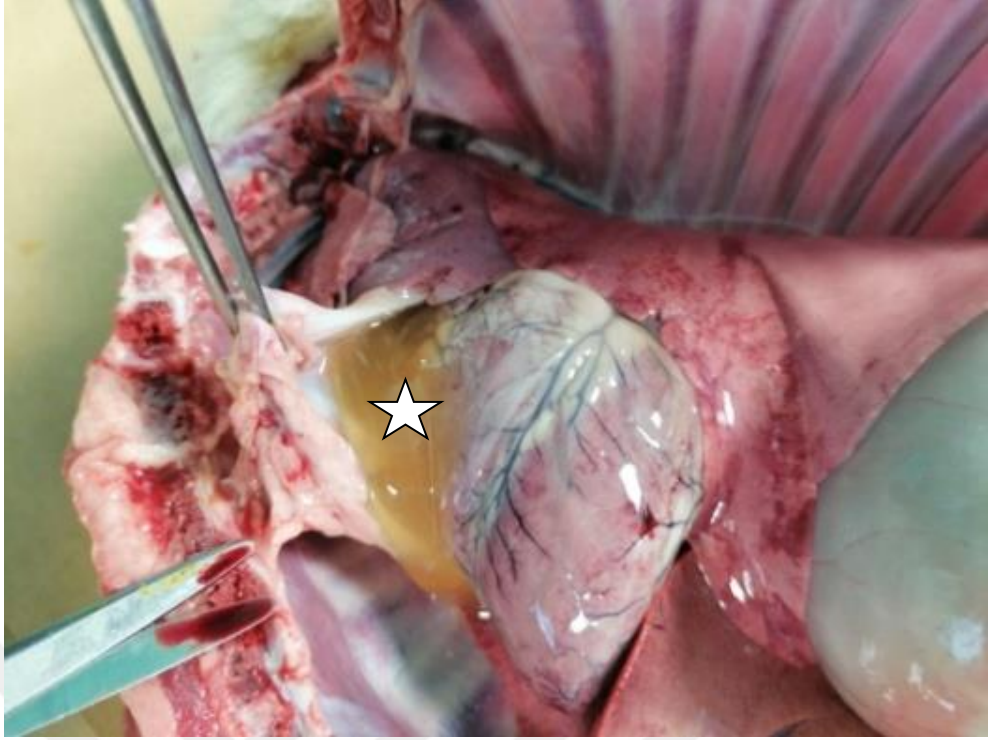
Şekil 3.6. Tip A enterotoksemili bir kuzunun (kuzu-58) ileum mukozasında hemorajik görünüm (yıldız).



Şekil 3.7. Tip A enterotoksemili bir kuzuda (kuzu-58) akciğer ödemi ve trakeada köpüklü sıvı birikimi.



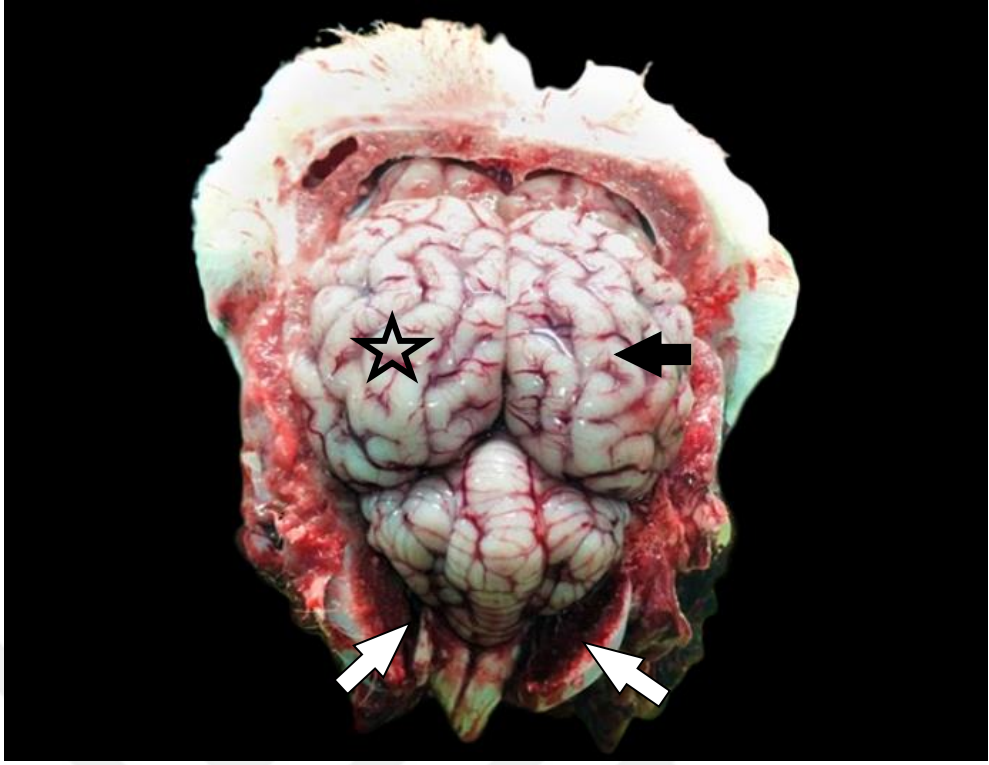
Şekil 3.8. Tip D enterotoksemili bir koyunun (koyun-19) kalbinde subepikardiyal peteşiyel kanamalar (ok).



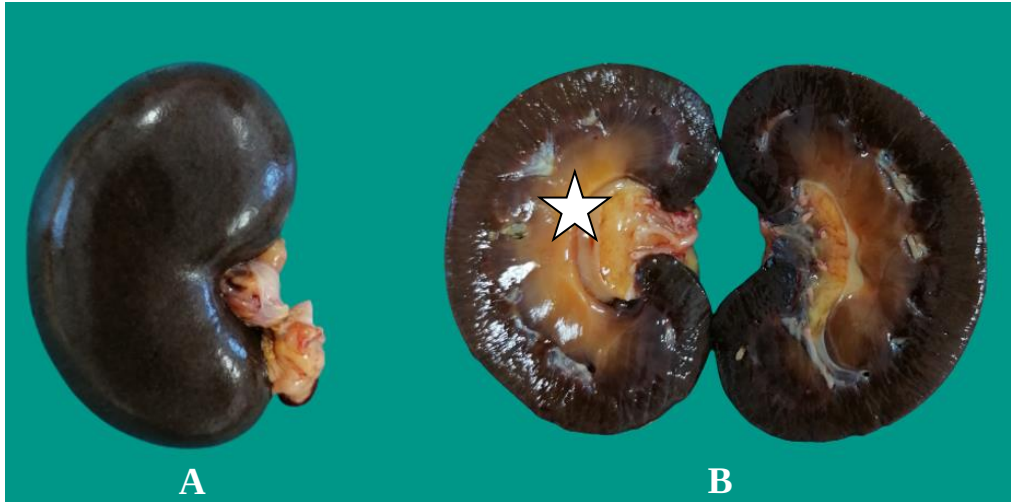
Şekil 3.9. Tip D enterotoksemili bir kuzuda (kuzu-44) hidroperikardiyum. Perikardiyal kesede hava ile temasta pıhtılaşan sarı renkte sıvı birikimi (yıldız).



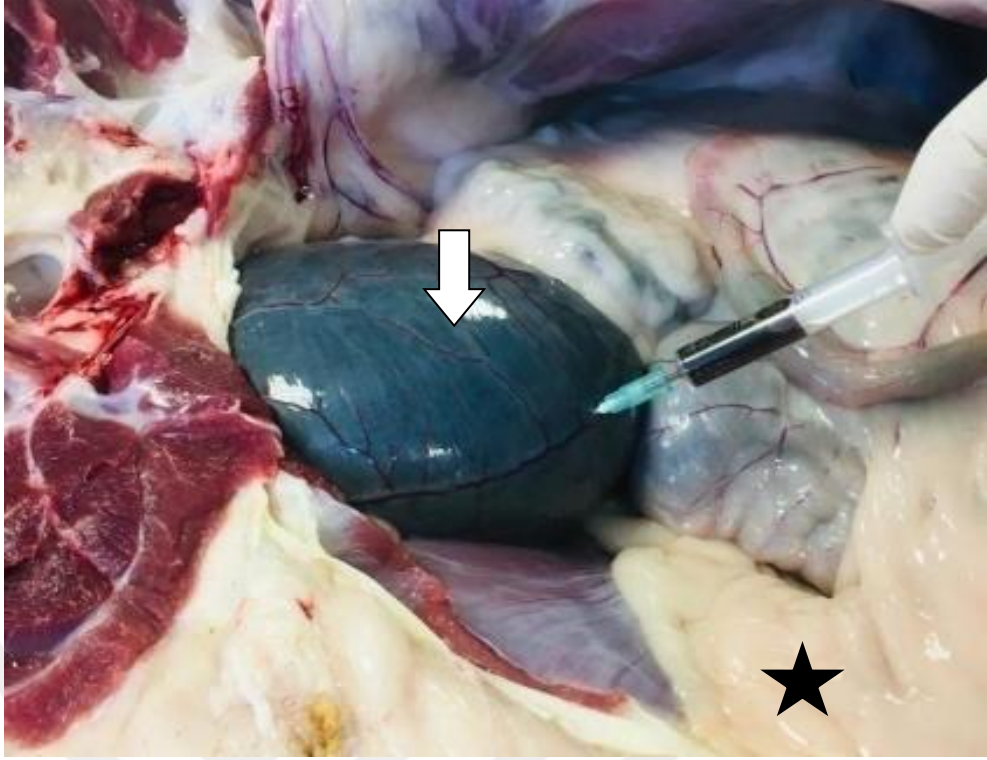
Şekil 3.10. Tip D enterotoksemili bir kuzuya (kuzu-37) ait beyin. Meninkslerde aktif hiperemi ve sulkuslarda daralma (oklar).



Şekil 3.11. Tip D enterotoksemili bir kuzuya ait (kuzu-50) beyin. Beyinde hiperemik damarlar, giruslarda yassılaşıma (yıldız) ve sulkuslarda daralma (siyah ok). Sererebellumun vermis bölümünün foramen magnuma kısmi herniasyonu (serebellar konikleşme) (beyaz oklar).



Şekil 3.12. Tip A enterotoksemili bir kuzunun (kuzu-48) böbreğinde konjesyon. Dış yüzeyinde (A) ve kesit yüzünde (B) koyu kahve-siyah renk değişikliği ve ikterus nedeniyle medulla sarımtırak renkte (yıldız).



Şekil 3.13. Tip D enterotoksemili bir koyunda (koyun-11) idrar kesesinin koyu-hemorajik renkte idrarla birlikte dilate görünümü (ok), deri altı yağ ve bağ dokularında hafif ikterus (yıldız).

Çalışmamızda farklı yaşlarda toplam 23 adet keçi (15 oğlak, 8 yetişkin keçi) enterotoksemi şüphesi ile değerlendirmeye alındı. Ancak yetişkin keçilerde toksin analizine göre enterotoksemi tespit edilemedi. Enterotoksemi şüphesi ile çalışmaya alınan 15 adet oğlaktan 2'si tip A ve 1'i tip D olmak üzere toplam 3 adet oğlağa enterotoksemi tanısı konuldu. Diyare (Şekil 3.14), bağırsaklarda serozal hiperemi (Şekil 3.15) ve pulmoner ödem enterotoksemili oğlakların hepsinde gözlenen makroskobik bulgular olarak kaydedildi. Böbreklerde diffuz solgunluk ve kıvamında yumuşama (Şekil 3.16), karaciğerde diffuz solgun renk değişikliği ve kıvamında gevreklik, mezenterial lenf düğümlerinde büyüme, bağırsaklarda dilatasyon ve lümeninde sarı/yeşilimsi renkte bol miktarda sıvı içerik (Şekil 3.17) gözlenen diğer bulgulardı. Ek olarak bir oğlakta (oğlak-12) subepikardiyal peteşiyel hemoraji, bir oğlakta da (oğlak-15) kranial akciğer loplarında hepatizasyon, hidroperikardiyum, perikardiyal yağ dokuda seröz atrofi, bağırsakların seroza ve mukozasında fokal beyazımsı renkte odaklar (*koksidiyozis*) görüldü.



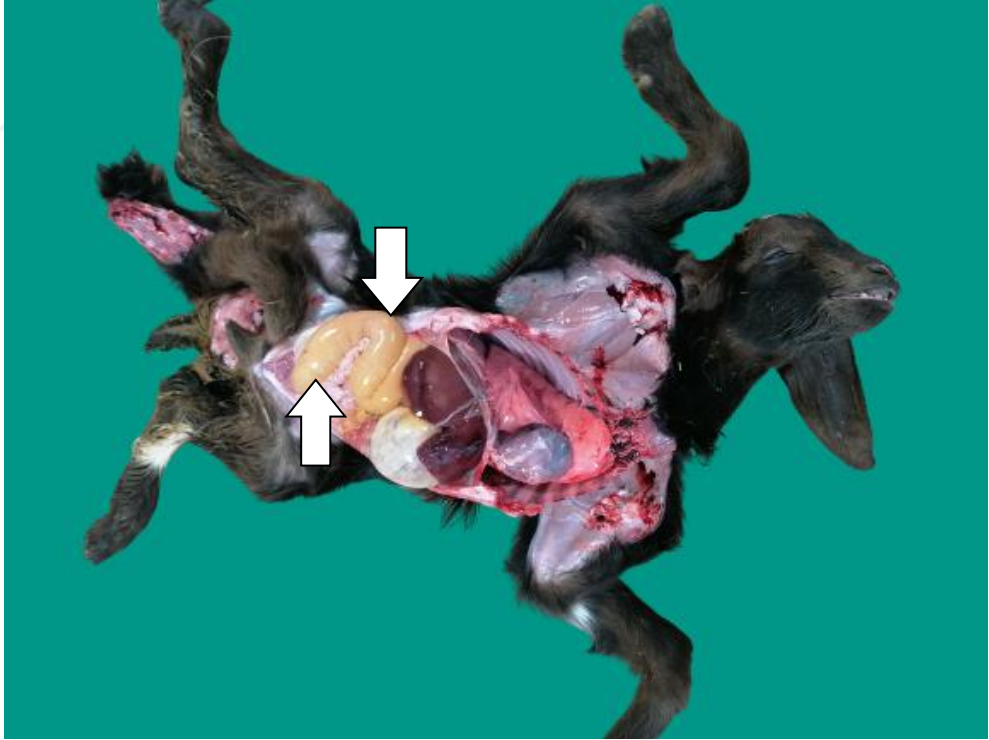
Şekil 3.14. Tip D enterotoksemili bir oğlağın (oğlak-15) sarımtırak renkte sulu dışkı ile kirlenmiş perineal bölgesinin görünümü.



Şekil 3.15. Tip A enteotoksemili bir oğlağın (oğlak-12) ince bağırsaklarında serozal hiperemi (yıldız).

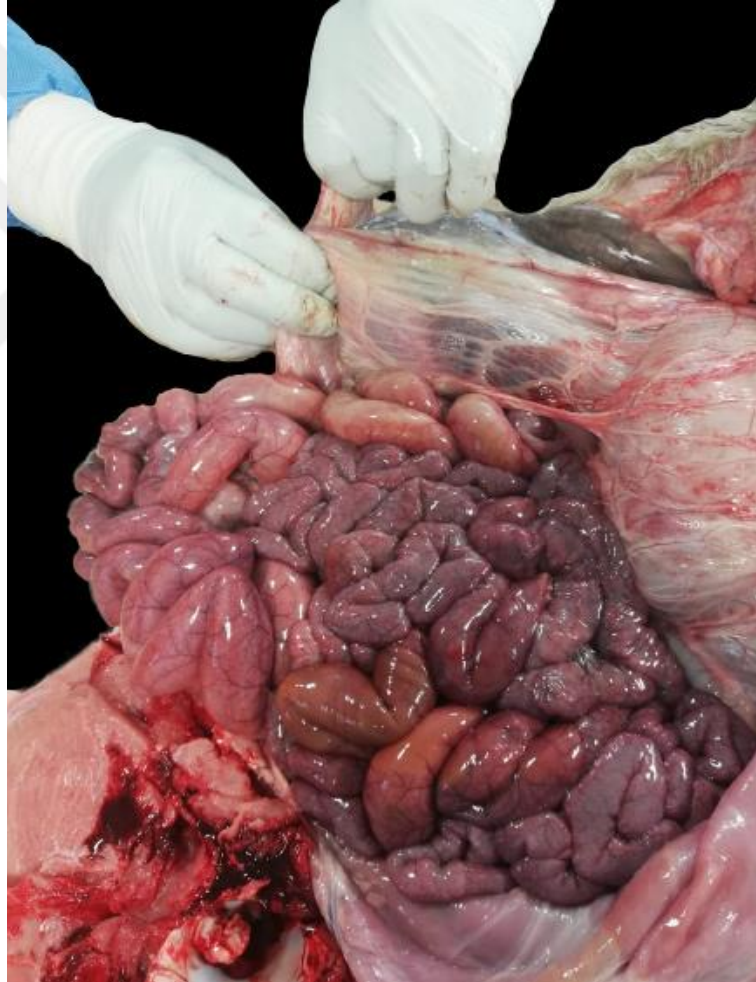


Şekil 3.16. Tip D enterotoksemili bir oğlağın (oğlak-15) böbreğinde solgunluk.



Şekil 3.17. Tip D enterotoksemili bir oğlağın (oğlak-15) abdominal boşluğunun açıldıktan sonraki görünümü. Kalın bağırsaklar sarımtırak renkte ve dilate görünümde (oklar).

Enterotoksemi belirlenen bir adet buzağı ve iki adet sığırdaki makroskopik olarak pulmoner ödem, bağırsaklarda serozal hiperemi (Şekil 3.18), lümeninde hemorajik içerik (Şekil 3.19) ve mukozada hemoraji (Şekil 3.20) görüldü. Ayrıca subepikardiyal peteşiyel kanamalar, böbrek yüzeyinde subkapsüler kanama, mezenterial lenf düğümlerinde büyüme, böbrek yüzeyinde diffüz solgunluk ve kıvamında yumuşama ile bağırsaklarda dilatasyon gözlenirken, tip D enterotoksemili sığır-2'de ani ölüm bilgisi kaydedildi.



Şekil 3.18. Tip C enterotoksemili buzağı-8'in bağırsağı. Bağırsaklarda serozal hiperemi ve gaz birikimi.



Şekil 3.19. Tip C enterotoksemili buzağı-8'in ince bağırsaklarında serozal hiperemi, bağırsak lümenlerinde sarı/yeşilimsi, kahverengi (mavi oklar) ve hemorajik içerik (beyaz ok).



Şekil 3.20. Tip C enterotoksemili buzağı-8'in ileum mukozasında şiddetli konjesyon (yıldız) ve hemoraji alanları (oklar).

3.3. Histopatolojik Bulgular

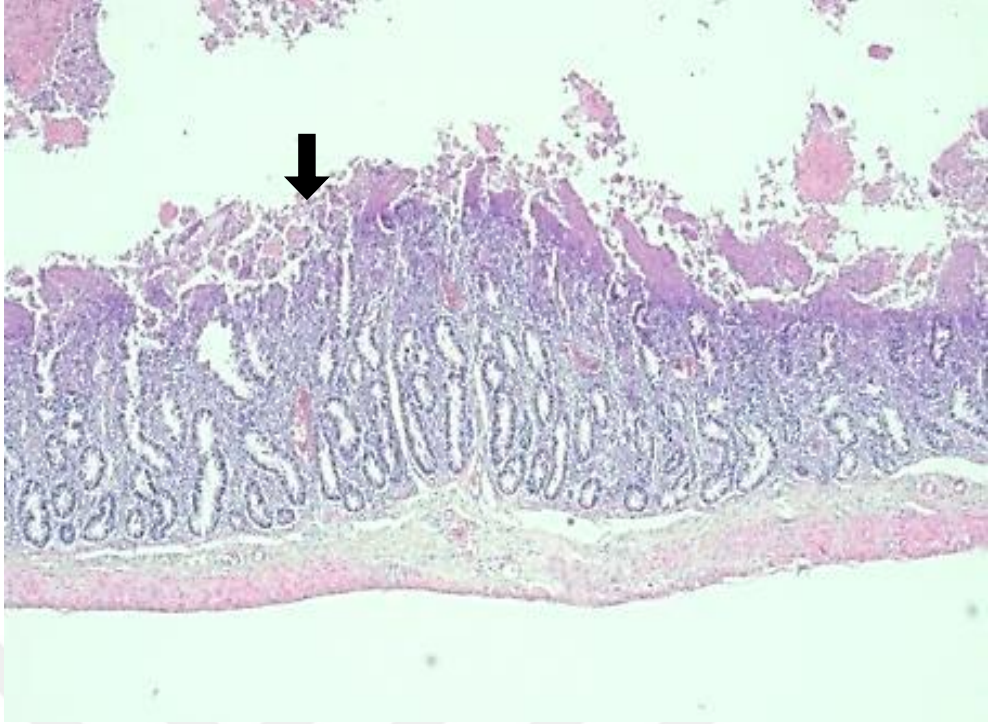
Enterotoksemili hayvanlarda gözlenen mikroskopik bulguların hayvan türü, yaş ve toksin tiplerine göre dağılımı Tablo 3.6'da, histopatolojik bulguların enterotoksemili ve enterotoksemi belirlenemeyen hayvanlardaki yaygınlığı Tablo 3.7'de özetlendi. Genel olarak enterotoksemili hayvanlarda makroskopik bulguların dağılımıyla tutarlı şekilde sindirim kanalında nekrotik veya nekrotik-hemorajik lezyonlar belirlendi. Abomasum mukozasında hemoraji ve kapillar hiperemi; ince ve/veya kalın bağırsaklarda villus epitellerinde deskuamasyon, koagülasyon nekrozları (Şekil 3.21-23) ve mukozal hemoraji (Şekil 3.24-25) gözlemlendi. Nekrotik hücre kalıntıları, fibrin ve bazofilik çubuk şekilli bakteri birikimleriyle oluşan fibrinonekrotik membranların sıklıkla mukoza yüzeyini kapladığı dikkati çekti (Şekil 3.26-29). Lamina propriyada mononükleer hücre, nötrofil ve eozinofil granülosit infiltrasyonları görüldü (Şekil 3.30-31). Ayrıca bazı olgularda villuslarda atrofi, kriptlerde dejenerasyon ve deskuamasyon, peyer plaklarında boşalma (Şekil 3.32), bağırsak mukoza ve epitellerinde parazitlerin farklı gelişim dönemleri görüldü (Şekil 3.33-34). Akciğer alveol lümeninde eozinofilik sıvı birikimi ve kapillar hiperemi ile karakterize pulmoner ödem (Şekil 3.35), alveol lümenlerinde nötrofil lökosit infiltrasyonu; miyokariyal hemoraji; böbrek intersitisyumunda hemoraji ve fokal mononükleer hücre infiltrasyonu, tubul epitellerinde dejenerasyon ve koagülasyon nekrozu, Bowman boşluğunda sıvı eksudasyonu, tubul lümeninde hiyalin silindiri (Şekil 3.36); karaciğerde sentrilobüler nekroz ve hepatositlerde vakuoler dejenerasyon (Şekil 3.37); beyinde kapillar hiperemi, perivasküler hemoraji ve perinöral ödem (Şekil 3.38) gözlemlendi.

Tablo 3.6. Mikroskopik bulguların enterotoksemili hayvanlarda tür, yaş ve etken tiplerine göre dağılımı.

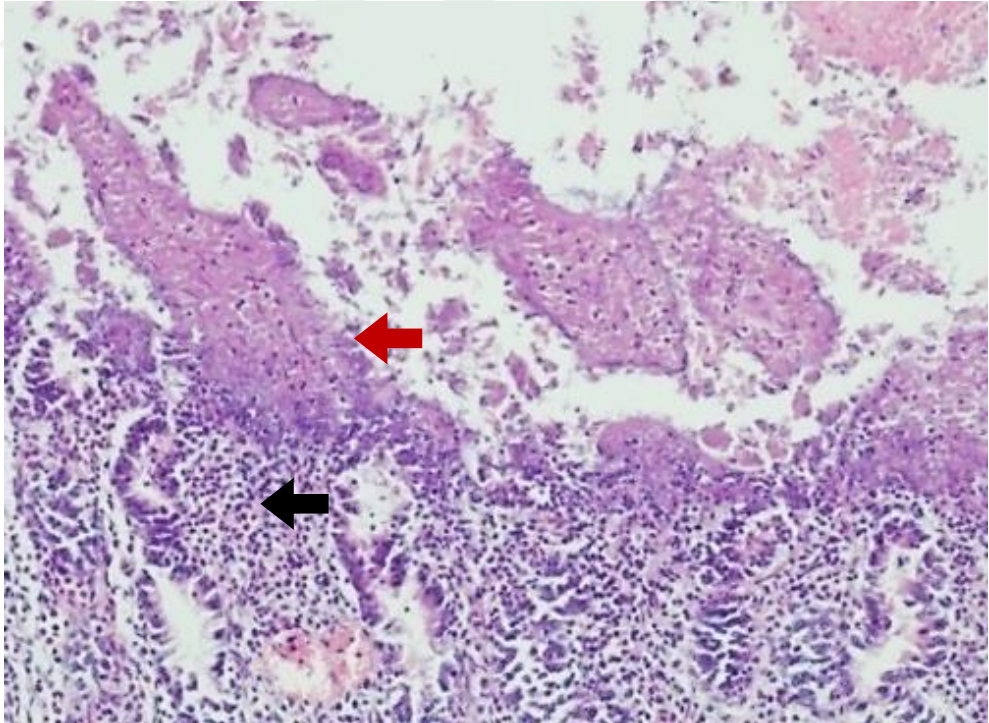
Hayvan No	Akciğer	Kalp	Böbrek	Karaciğer	Beyin	İnce ve kalın bağırsaklar							Tip**
	Öd/He	He	Ne/Hs	Ne/Vd	He/Pö	Hemoraji	Villuslarda Nekroz ve Deskuamasyon	Yangısal hücre infiltrasyonu	Psödomembran	Parazitlerin gelişim evreleri	Bazofilik çubuk şeklinde bakteriler	IHC*	
Kuzu-1	+/-	-	+/-	+/+	-/+	+	+	+	+	-	+	+	Tip A
Kuzu-37	+/-	-	+/+	+/-	-/+	+	+	+	+	+	+	+	Tip D
Kuzu-43	+/+	+	+/-	-/-	-/-	+	+	+	+	-	+	+	Tip A
Kuzu-44	+/-	-	+/+	+/+	-/+	-	+	+	-	+	+	+	Tip D
Kuzu-48	-/+	-	+/+	+/-	-/+	+	+	+	+	-	+	+	Tip A
Kuzu-50	+/+	+	+/+	+/-	-/+	-	+	+	-	-	+	+	Tip D
Kuzu-58	+/+	+	+/-	-/+	-/-	+	+	+	-	-	+	+	Tip A
Kuzu-66	+/+	+	+/-	-/+	+/-	-	+	+	-	-	+	+	Tip A
Koyun-9	-/+	+	+/-	-/+	-/-	+	+	+	+	+	+	+	Tip A
Koyun-11	+/+	+	+/+	+/+	+/+	-	+	+	+	+	+	+	Tip D
Koyun-12	+/+	-	+/+	-/+	+/+	-	+	+	+	-	+	+	Tip D
Koyun-14	+/-	-	-/-	-/-	-/-	-	+	+	-	-	+	+	Tip A
Koyun-19	+/+	+	-/-	+/+	-/-	-	+	+	+	+	+	+	Tip D
Oğlak-4	+/+	-	+/-	+/+	-/-	-	+	+	-	-	+	+	Tip A
Oğlak-12	+/+	+	+/-	-/+	-/-	-	+	+	-	-	+	+	Tip A
Oğlak-15	+/-	-	+/-	-/-	-/+	-	+	+	-	+	+	+	Tip D
Buzağı-8	+/+	+	+/-	+/+	-/-	+	+	+	+	+	+	+	Tip C
Sığır-2	+/+	-	+/-	-/-	-/-	+	+	+	-	-	+	+	Tip D
Sığır-3	+/+	+	-/-	-/-	-/-	+	+	+	+	-	+	+	Tip A
Öd: Ödem, He: Hemoraji, Ne: Nekroz, Hs: Hiyalin silindiri, Vd: Vakuoler dejenerasyon, Pö: Perinöronal ödem * Anti-<i>C.perfringens</i> için immunohistokimyasal boyama. **ELISA testi sonuçlarına göre yapılan <i>C. perfringens</i> tiplendirme.													

Tablo 3.7. Toksin tespit edilen ve edilemeyen hayvanlarda mikroskobik bulguların türlere ve etken tiplerine göre dağılımı.

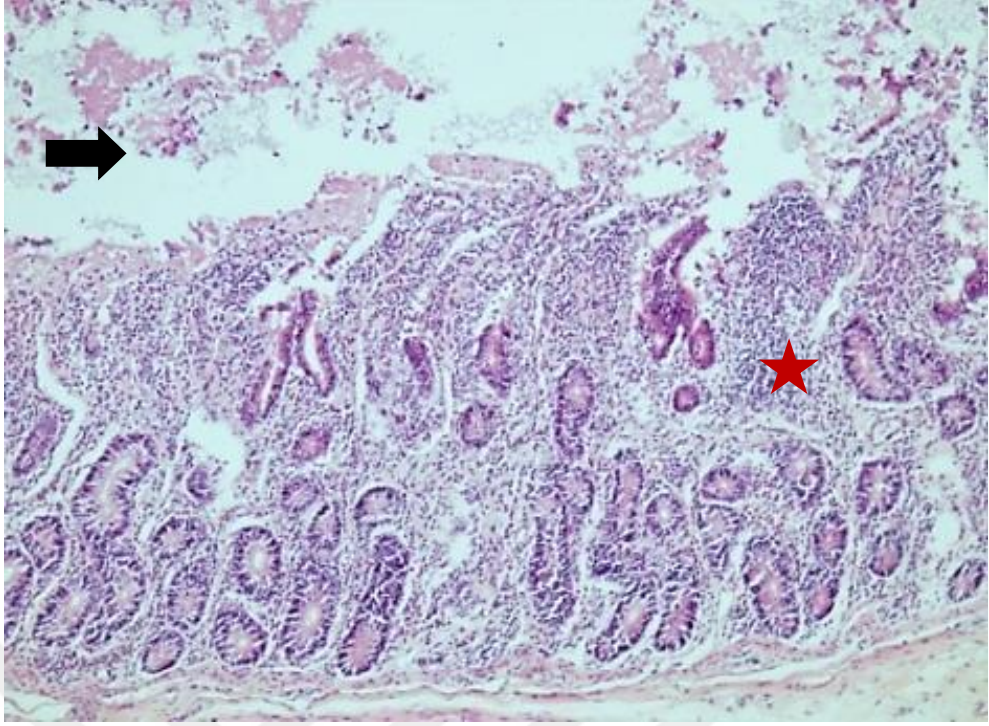
Mikroskopik Bulgular	Enterotoksemili hayvanlar (n=19)										Diğer hayvanlar (n=131)
	Tip A (n=10)			Tip C (n=1)			Tip D (n=8)			Toplam Görülme Sayısı ve Oranı (%)	
	koyun	keçi	sığır	koyun	keçi	sığır	koyun	keçi	sığır		
Bağırsak villuslarında nekroz ve deskuamasyon	7	2	1	-	-	1	6	1	1	19 (100)	131 (100)
Villuslarda atrofi	4	2	-	-	-	1	4	1	-	12 (63,16)	16 (12,21)
Lamina propriyada hemoraji	5	-	1	-	-	1	1	-	1	9 (47,37)	28 (21,37)
Lamina propriyada yangısal hücre infiltrasyonu	7	2	1	-	-	1	6	1	1	19 (100)	94 (71,75)
Nekroze villus uçlarında ve lümende bakteri kümeleri	7	2	1	-	-	1	6	1	1	19 (100)	73 (55,72)
Psödomembran oluşumu (fibrin, nötrofil, nekr. hücre)	4	-	1	-	-	1	4	-	-	10 (52,63)	19 (14,50)
Kriptlerde dejenerasyon ve deskuamasyon	7	1	1	-	-	1	5	1	-	16 (84,21)	94 (71,75)
Peyer plaklarında boşalma	3	-	-	-	-	1	2	-	-	5 (26,32)	10 (7,63)
Parazitlerin gelişim evreleri	1	-	-	-	-	1	4	1	-	7 (36,84)	29 (22,14)
Miyokardiyal hemoraji	4	1	1	-	-	1	3	-	-	10 (52,63)	23 (17,55)
Alveoler ödem	5	2	1	-	-	1	6	1	1	17 (89,47)	82 (62,59)
Hepatositlerde vakuoler dejenerasyon	4	2	-	-	-	1	4	-	-	11 (57,89)	16 (12,21)
Hepatositlerde nekroz	2	1	-	-	-	1	5	-	-	9 (47,37)	29 (22,13)
Böbrek tubuler dejenerasyon ve nekroz	6	2	-	-	-	1	5	1	1	16 (84,21)	69 (52,67)
Böbrek tubul lümeninde hiyalin silindiri	1	-	-	-	-	-	5	-	-	6 (31,58)	16 (12,21)
Böbrek intersitisyumunda hemoraji	4	2	-	-	-	-	3	1	-	10 (52,63)	26 (19,84)
Bowman boşluğunda sıvı eksudasyonu	2	2	-	-	-	-	2	-	-	6 (31,58)	7 (5,34)
Beyinde kapillar hiperemi	3	-	-	-	-	-	4	1	-	8 (42,11)	18 (13,74)
Beyinde hemoraji	1	-	-	-	-	-	2	-	-	3 (15,79)	5 (3,81)
Perinöronal ödem	2	-	-	-	-	-	5	1	-	8 (42,11)	19 (14,50)



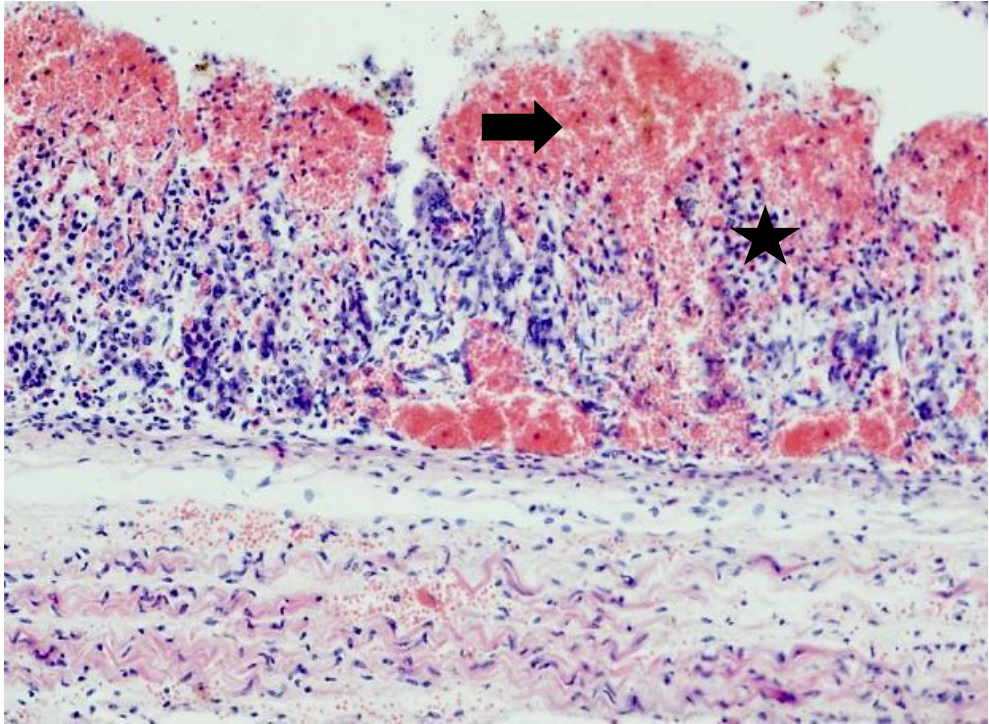
Şekil 3.21. Tip A enterotoksemili kuzuya (kuzu-48) ait ince bağırsak. İleum villuslarında koagülasyon nekrozu ve yüzeyinde nekrotik kitle (ok). X40, H&E.



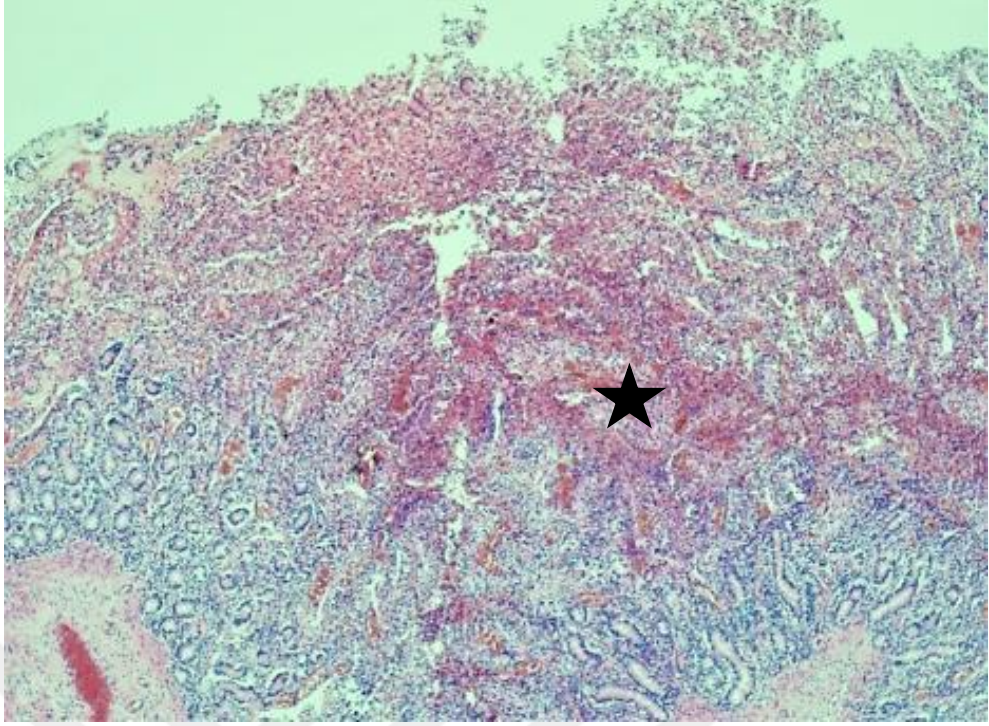
Şekil 3.22. Şekil 3.21'nin yakından görünümü. Mukozadaki nekroz ve yüzeyde nekrotik bir membran oluşumu (kırmızı ok), propriyada nötrofil ve eozinofil granülosit infiltrasyonu (siyah). X200, H&E.



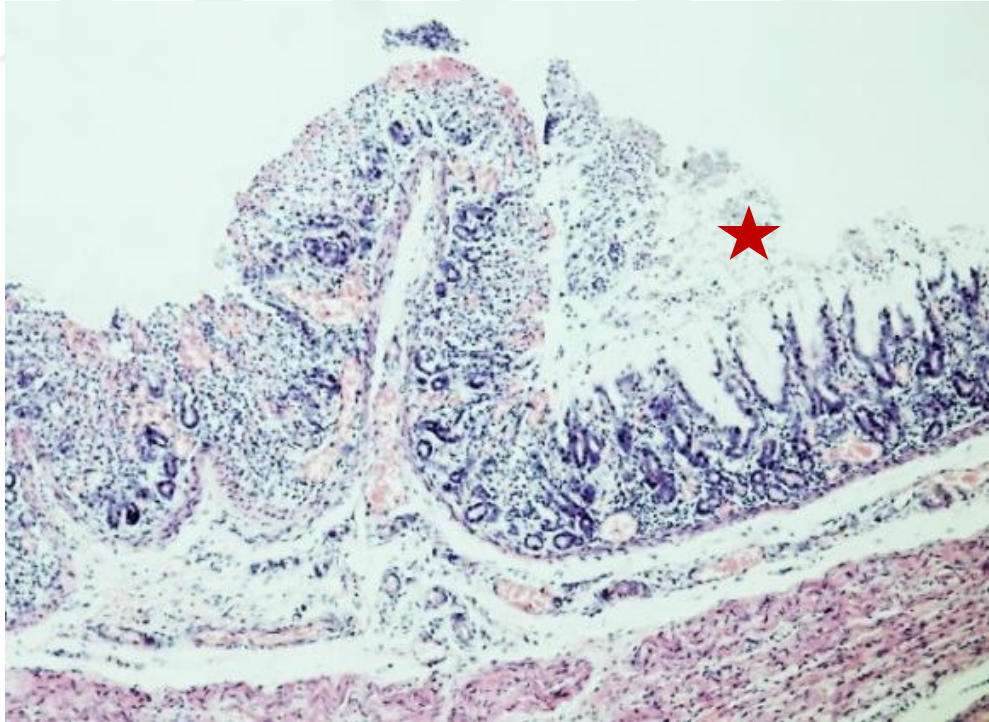
Şekil 3.23. Tip D enterotoksemili yetişkin koyuna (koyun-12) ait bağırsak kesiti. İleumda villuslarda nekroz, lümende nekrotik hücreler ve bakteri kümelenmesi (ok), propriyada yangısal hücre infiltrasyonu (yıldız). X100, H&E.



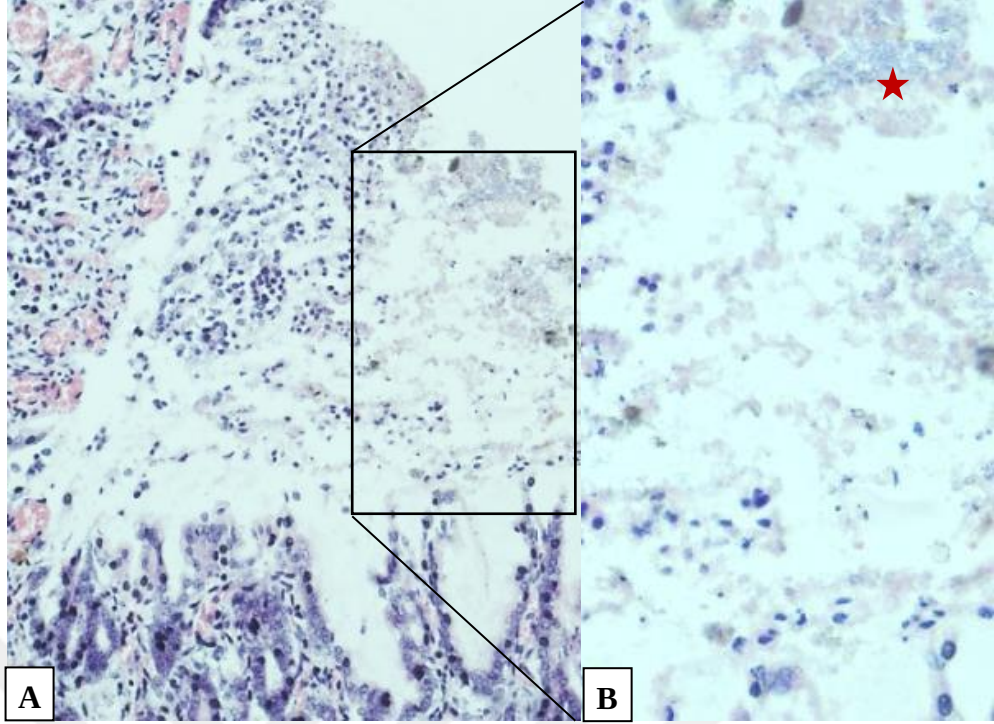
Şekil 3.24. Tip A enterotoksemili kuzuya (kuzu-43) ait ince bağırsak kesiti. Lamina propriyada yangı (yıldız) ve şiddetli hemoraji (ok). X200, H&E.



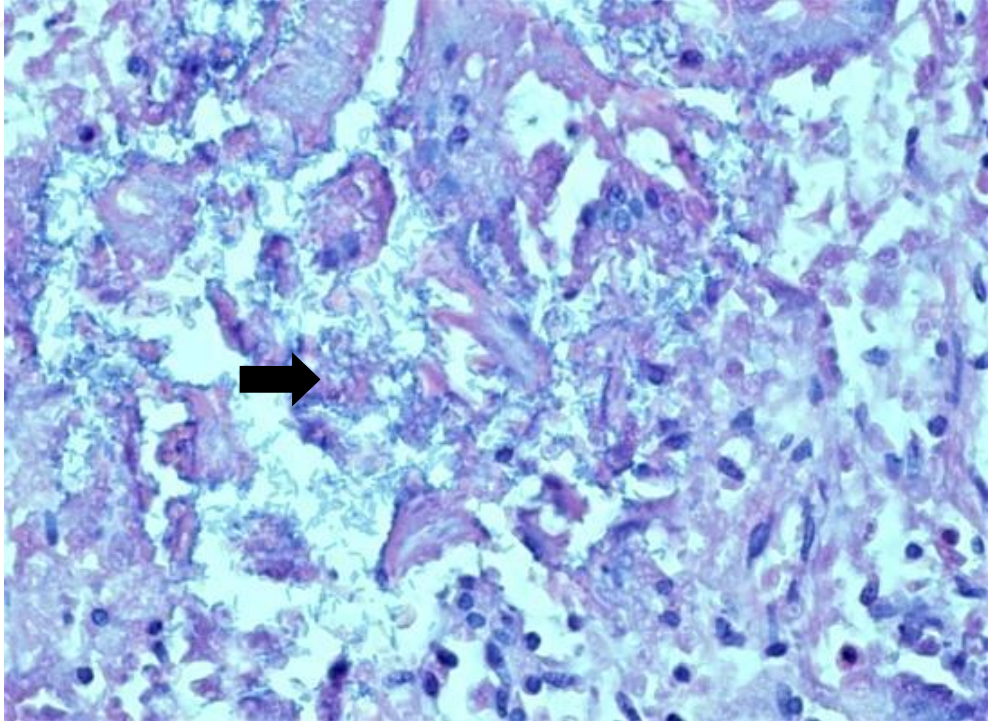
Şekil 3.25. Tip C enterotoksemili buzağının (buzağı-8) ince bağırsak mukozasında şiddetli hemoraji (yıldız), nekroz ve epitel deskuamasyonu, kapillar damarlarda hiperemi. X40, H&E.



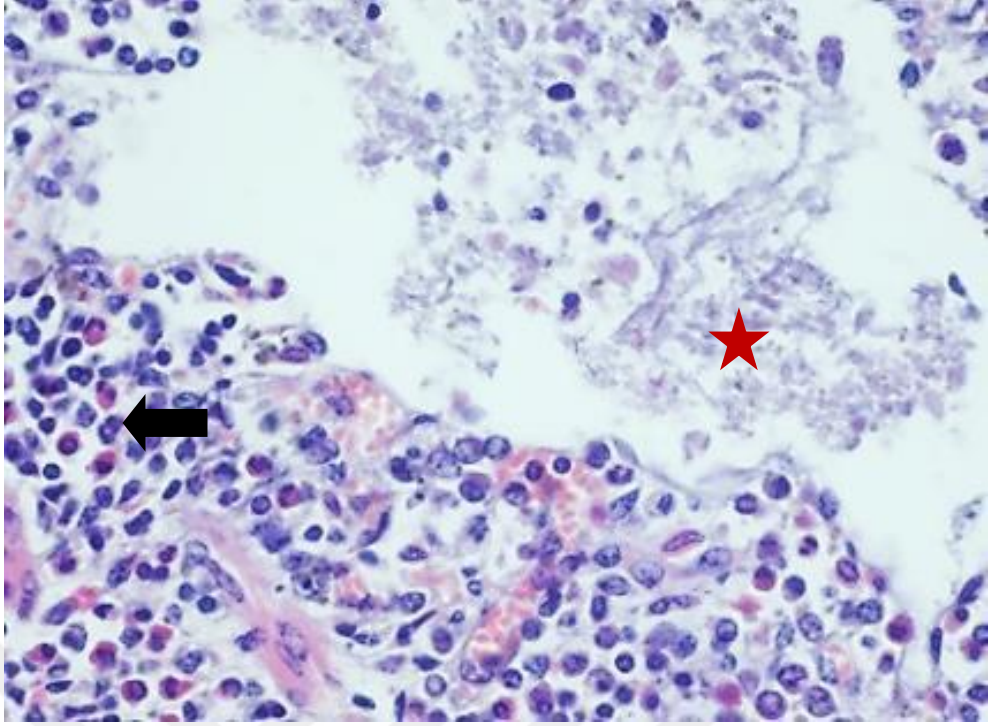
Şekil 3.26. Tip A enterotoksemili kuzunun (kuzu-43) ince bağırsak kesiti. Lamina propriyada hiperemik damarlar ve hemoraji, villuslarda nekroz, epitellerde dökülme, lümende bazofilik bakteri kümeleri (yıldız). X100, H&E.



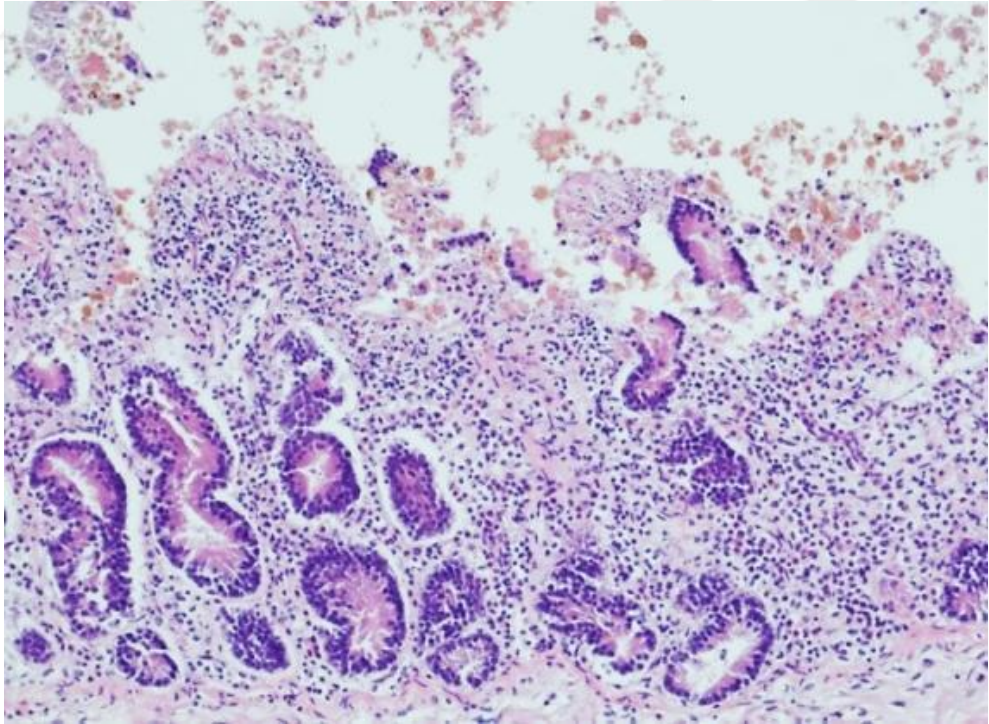
Şekil 3.27. Şekil 3.26'nin yakından görünümü. Lamina propriyada hiperemik damarlar, villuslarda nekroz, epitellerde dökülme, lümende bazofil çubuk şeklinde bakteriler (yıldız). (A) X200, (B) X400 H&E.



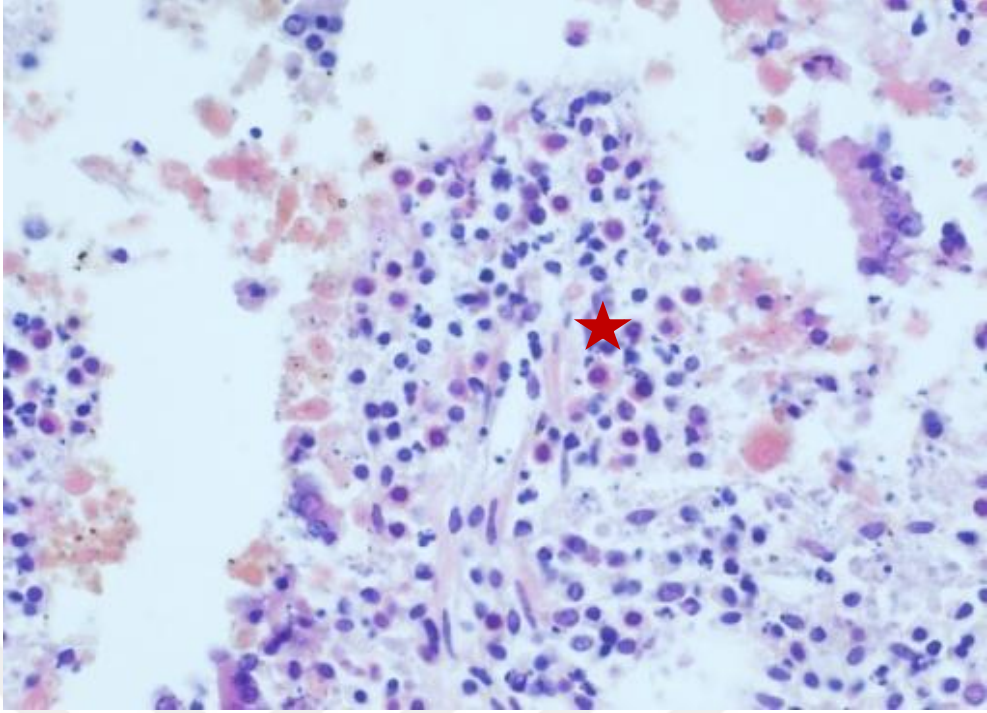
Şekil 3.28. Tip D enterotoksemili yetişkin koyunun (koyun-11) ince bağırsak kesiti. İleumda nekroze bölgede bazofilik çubuk şeklinde bakteri kümelenmesi (ok). X630, H&E.



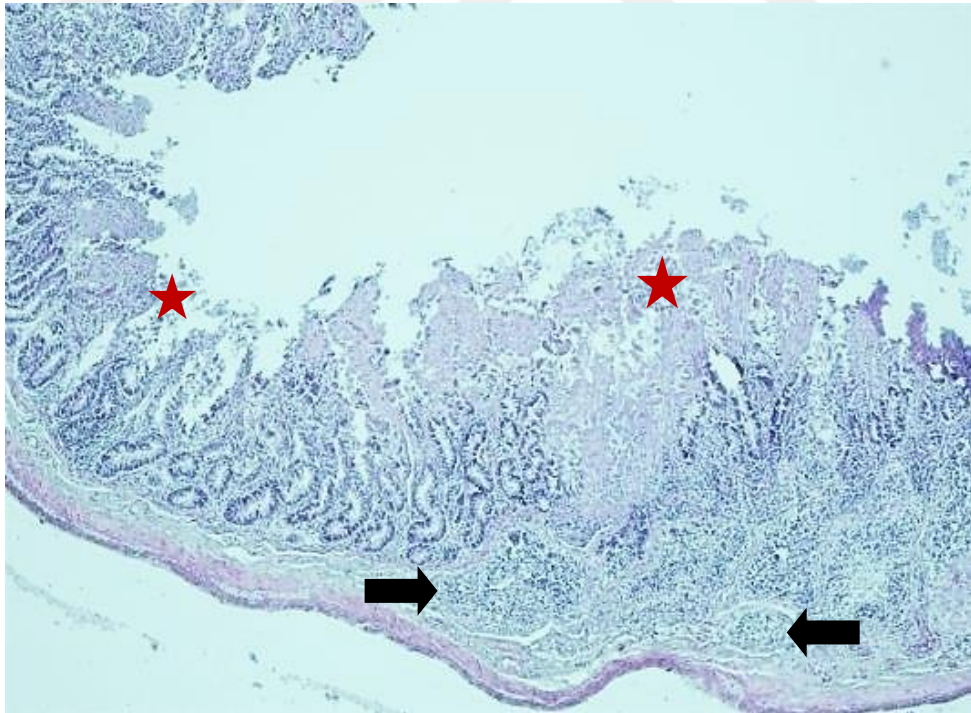
Şekil 3.29. Tip A enterotoksemili sığır (sığır-3) ait bağırsak kesiti. Propriyada hiperemi, eozinofil granülosit infiltrasyonları (ok) ve nekroze villus uçlarında bazofilik çubuk şeklinde bakteriler (yıldız). X630, H&E.



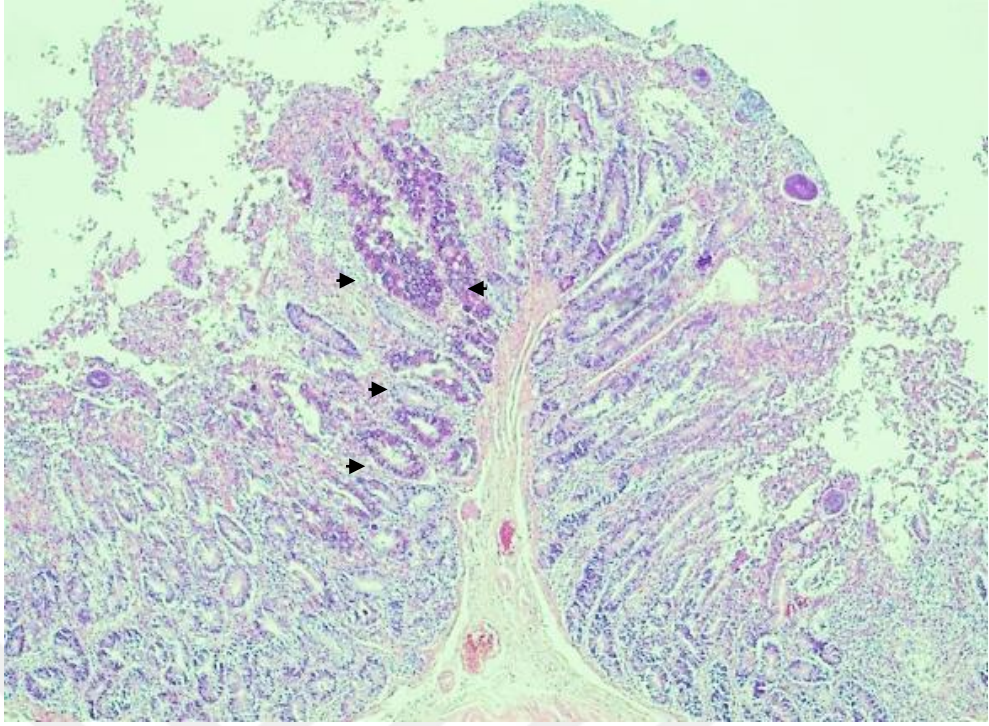
Şekil 3.30. Tip D enterotoksemili kuzunun (kuzu-37) ince bağırsak kesiti. Villus epitelleri tamamen dökülmüş, mukozada nekroz ve lamina propriyada yangısal hücre infiltrasyonları. X200, H&E.



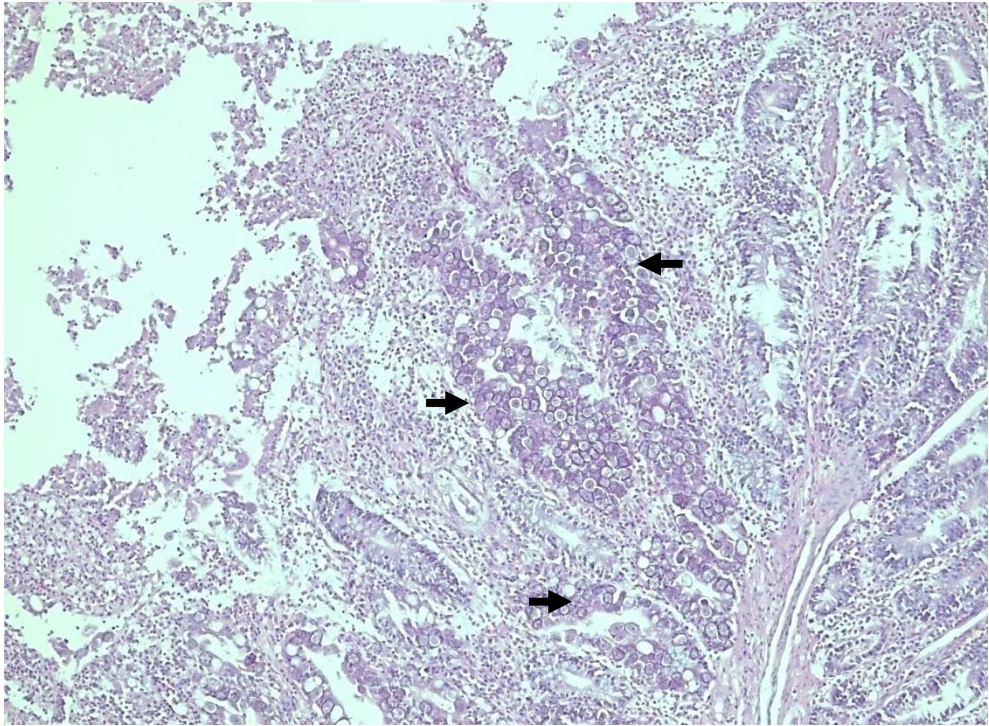
Şekil 3.31. Şekil 3.30'in yakından görünümü. Lamina propriyada nötrofil ve eozinofil granüositler (yıldız), lümende ve nekrotik villus uçlarında bazofilik bakteriler. X630, H&E.



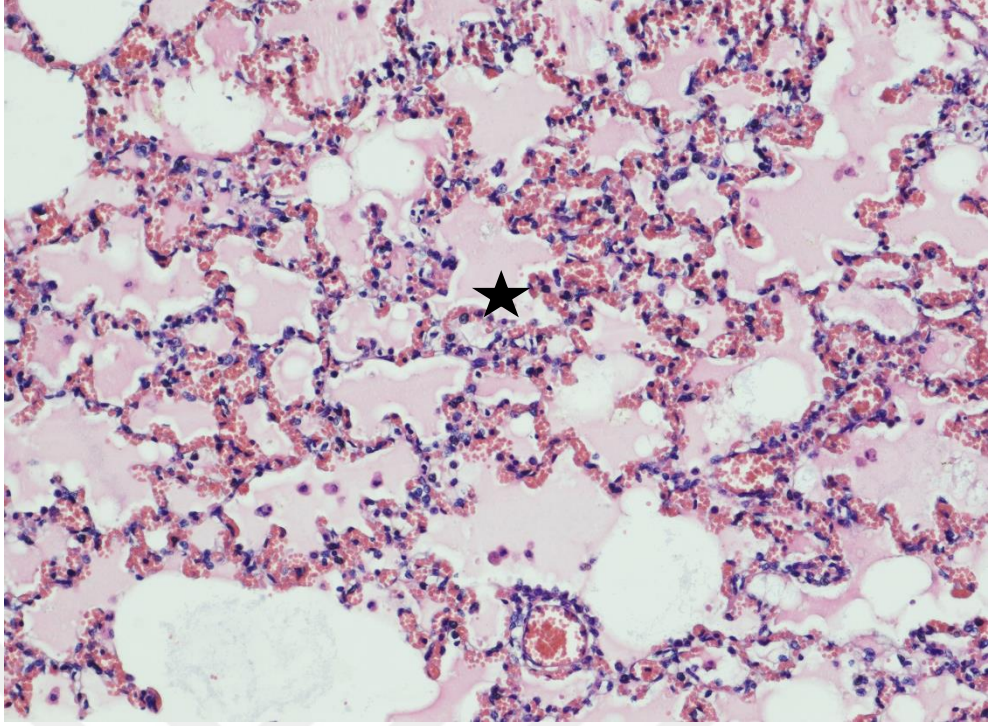
Şekil 3.32. Tip D enterotoksemili koyunun (koyun-11) ince bağırsak kesiti. İleumda villus epitellerinde nekroz ve deskuamasyon, Peyer plaklarında boşalma (oklar), nekroze olan bölgelerde bazofilik bakteriler (yıldızlar). X40, H&E.



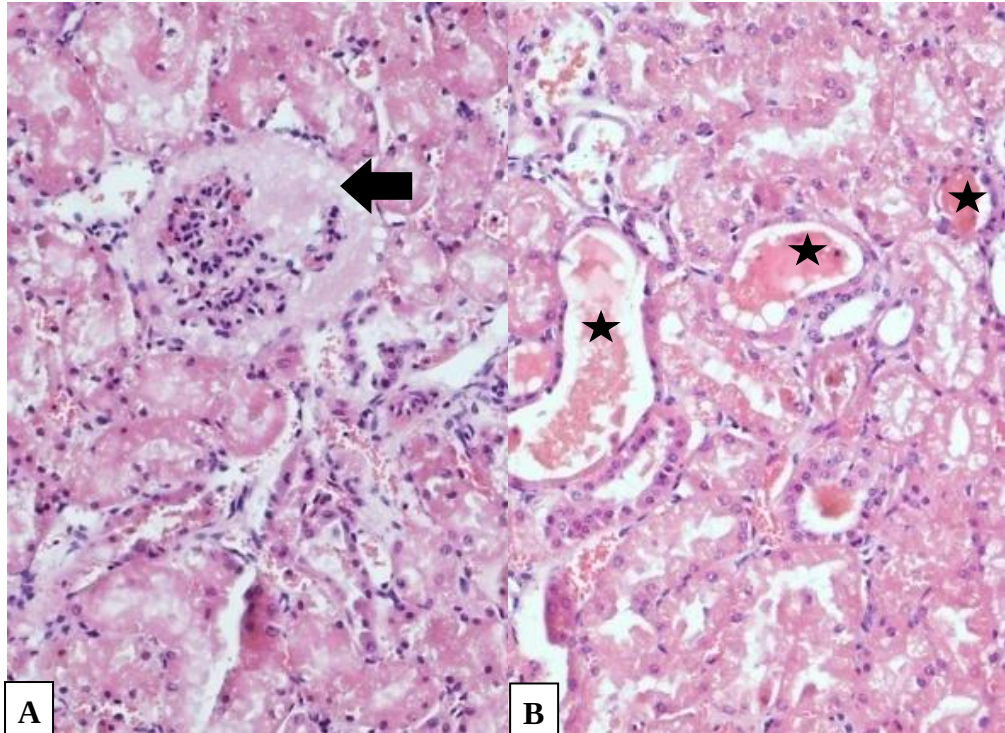
Şekil 3.33. Tip D enterotoksemili kuzunun (kuzu-44) ince bağırsak kesiti. Villuslarda nekroz ve kript epitellerinde parazitlerin gelişim evreleri (ok başları), koksidiyozis . X40, H&E.



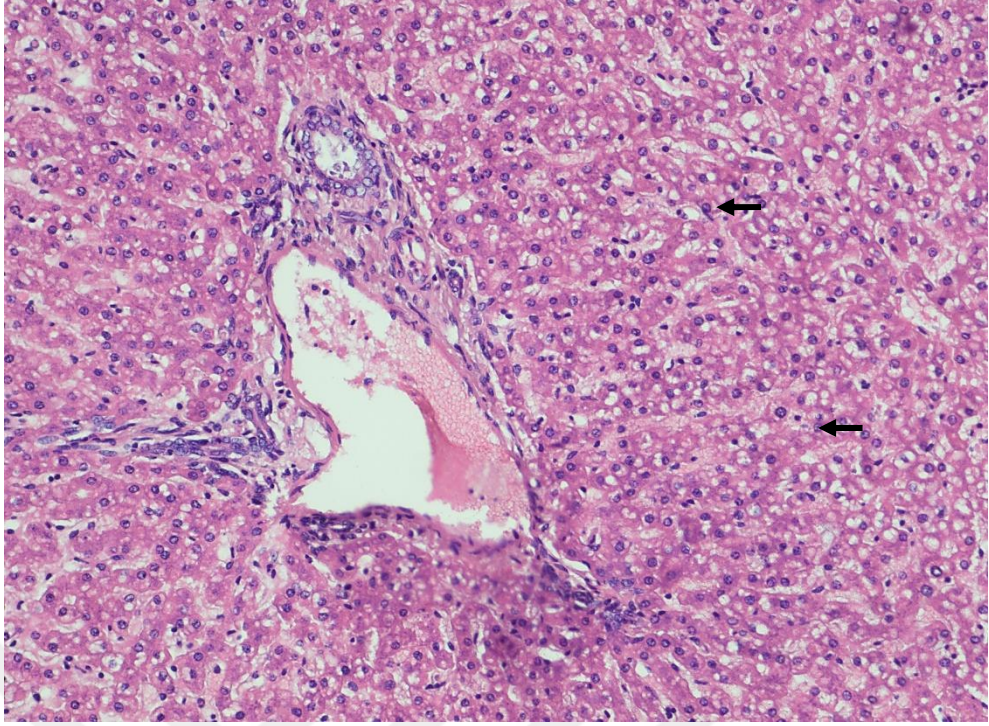
Şekil 3.34. Şekil 3.33'ün yakından görünümü, Villus uçlarında nekroz, propriyada yangısal hücre infiltrasyonu ve kript epitellerinde parazitlerin gelişim evreleri (oklar), koksidiyozis. X100, H&E.



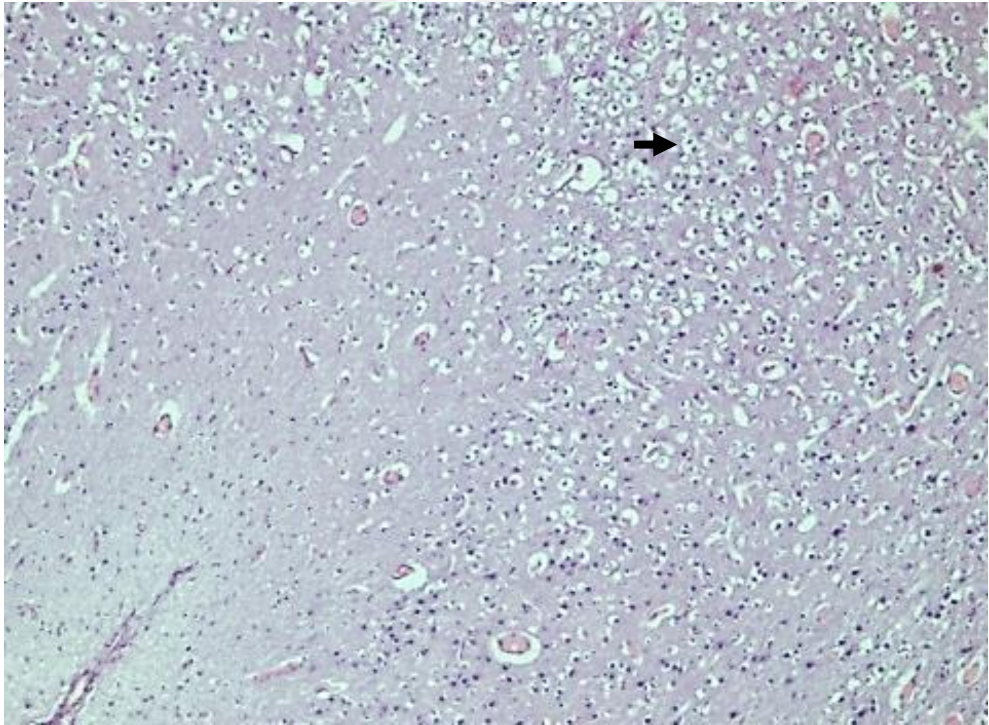
Şekil 3.35. Tip A enterotoksemili kuzuya (kuzu-58) ait akciğer. Alveol lümeninde eozinofilik sıvı ile karakterize pulmoner ödem (yıldız) ve kapillar damarlarda hiperemi. X200, H&E.



Şekil 3.36. Tip D enterotoksemili koyuna (koyun-11) ait böbrek. Hemoglobinürik nefrozis. A:Tubul epitellerinde nekroz ve dejenerasyon, Bowman boşluğunda eozinofilik sıvı birikimi (ok). B: Tubul lümenlerinde hiyalin silindirleri (yıldızlar). X200, H&E.



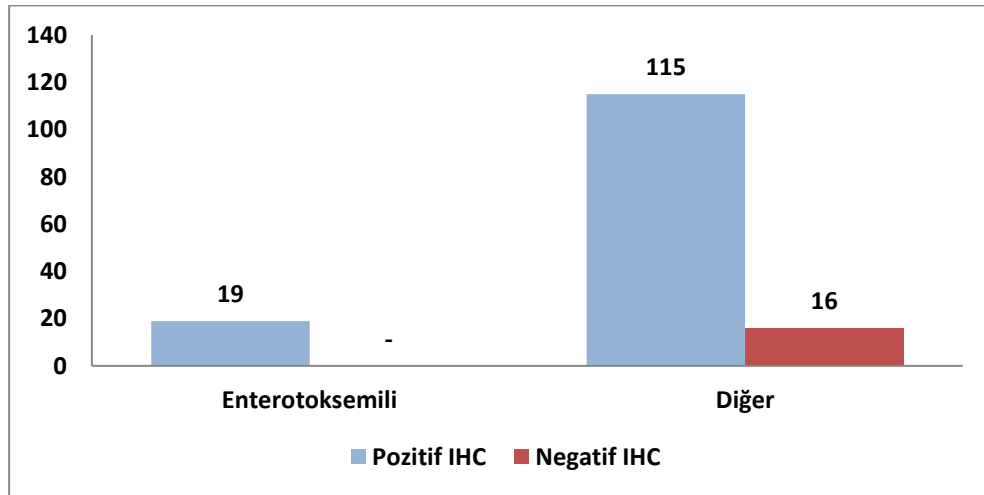
Şekil 3.37. Tip A enterotoksemili kuzuya (kuzu-1) ait karaciğer. Hepatositlerde hidropik ve vakuoler dejenerasyon (oklar). X200, H&E.



Şekil 3.38. Tip D enterotoksemili kuzuya (kuzu-37) ait beyin. Nöron ve astrositler çevresinde ödem (ok). X100, H&E.

3.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

C. perfringens toksinlerinin tespit edildiği hayvanların (n=19) hepsinde bağırsak kesitlerinde anti-*C.perfringens* ile yapılan immunohistokimyasal boyamalarda pozitif reaksiyonlar görüldü. Enterotoksemili hayvanların tümünde lümende dökülmüş epitellerde ve nekrotik villus uçlarında (Şekil 3.39-43), 10 (%52,63)'unda psödomembranda (Şekil 3.44-45), 5 (%26,32)'inde lamina propriyada (Şekil 3.46-47) ve 3 (%15,79)'ünde kriptlerde (Şekil 3.48-49) pozitif reaksiyonlar tespit edildi. *C. perfringens* toksini tespit edilemeyen hayvanların (n=131) ise 115 (%87,79)'inde pozitif reaksiyon gözlemlendi (Grafik 3.3). Bu hayvanların, 112 (%97,39)'sinde lümende dökülmüş epitellerde (Şekil 3.50), 38 (%33,04)'inde nekrotik villus uçlarında, 7 (%6,09)'sinde psödomembranda, 3 (%2,61)'ünde lamina propriyada ve 1 (%0,87)'inde kriptlerde pozitif reaksiyonlara rastlandı. Tüm immunohistokimya boyama aşamalarında aynı kesitlerden hazırlanan yedek kontrol kesitleri kullanıldı. Primer antikorun eklenmediği antikor dilüentle muamele edilen kontrol kesitlerinde pozitif immunohistokimyasal reaksiyon tespit edilmedi (Şekil 3.51-52). Pozitif immunohistokimyasal boyamaların farklı toksin tiplerine göre ve toksin tespit edilemeyen diğer hayvanlardaki dağılımı Tablo 3.8'de sunuldu. Enterotoksemili hayvanlarda gözlenen immunohistokimyasal bulguların hayvan türü, yaş ve toksin tiplerine göre lokalizasyonları da Tablo 3.9'de özetlendi.



Grafik 3.3. Enterotoksemili ve *C. perfringens* toksini tespit edilemeyen örneklerin bağırsaklarında yapılan immunohistokimyasal boyama sonuçları.

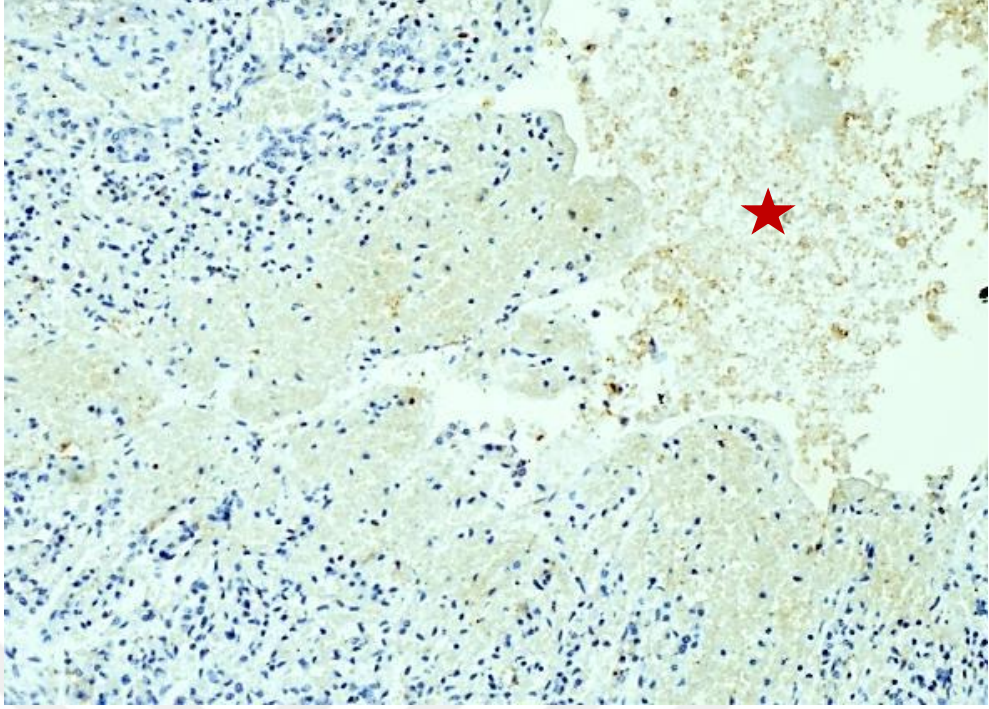
Tablo 3.8. Enterotoksemi tiplerinde ve diğer hayvanlarda immunohistokimyasal boyanmaların lokalizasyonu.

Lokalizasyonu	Enterotoksemili hayvanlar (n=19)									Diğer hayvanlar (n=131)
	Tip A (n=10)			Tip C (n=1)			Tip D (n=8)			Görülme Sayısı ve Oranı (%)
	koyun	keçi	sığır	koyun	keçi	sığır	koyun	keçi	sığır	
Bağırsak lümeninde dökülmüş epitellerin olduğu alanlarda	7	2	1	-	-	1	6	1	1	19 (100)
Nekrotik villus uçlarında	7	2	1	-	-	1	6	1	1	19 (100)
Psödomembranlarda	4	-	1	-	-	1	4	-	-	10 (52,63)
Lamina propriyada	2	-	1	-	-	1	1	-	-	5 (26,32)
Kriptlerde	1	-	-	-	-	1	1	-	-	3 (15,79)
Abomasum lümeninde dökülmüş epitellerde	7	2	-	-	-	-	4	1	-	14 (73,68)
Mezenteriyel lenf düğümlerinde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam pozitif olgu sayısı										19 (100)
										115 (87,79)

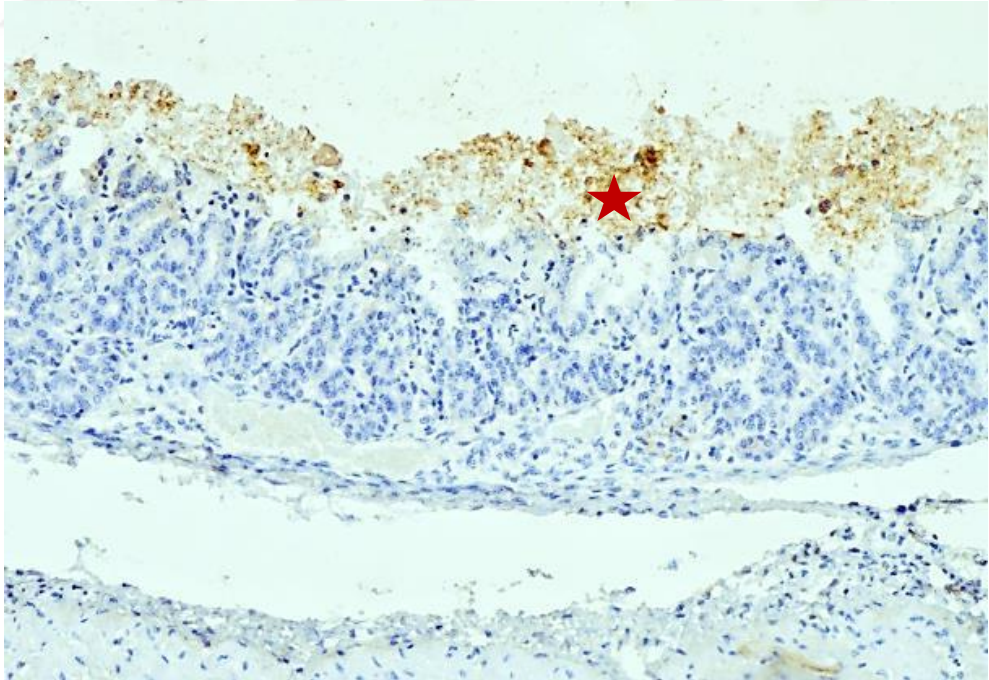
Tablo 3.9. İmmunohistokimyasal bulguların enterotoksemili hayvanlarda tür, yaş ve toksin tiplerine göre lokalizasyonu.

Hayvan No	Mezenterik lenf düğümleri	Abomasum	İnce ve kalın bağırsaklar					IHC*	Tip**
		Lümende dökülmüş epitellerin olduğu alanlarda	Lümende dökülmüş epitellerin olduğu alanlarda	Nekrotik villus uçlarında	Psödomembranlarda	Lamina propriyada	Kriptlerde		
Kuzu-1	-	+	+	+	+	-	-	+	Tip A
Kuzu-37	-	+	+	+	+	-	-	+	Tip D
Kuzu-43	-	+	+	+	+	-	-	+	Tip A
Kuzu-44	-	+	+	+	-	+	-	+	Tip D
Kuzu-48	-	+	+	+	+	-	-	+	Tip A
Kuzu-50	-	+	+	+	-	-	-	+	Tip D
Kuzu-58	-	+	+	+	-	-	-	+	Tip A
Kuzu-66	-	+	+	+	-	-	-	+	Tip A
Koyun-9	-	+	+	+	+	+	+	+	Tip A
Koyun-11	-	-	+	+	+	-	-	+	Tip D
Koyun-12	-	-	+	+	+	-	-	+	Tip D
Koyun-14	-	+	+	+	-	+	-	+	Tip A
Koyun-19	-	+	+	+	+	-	+	+	Tip D
Oğlak-4	-	+	+	+	-	-	-	+	Tip A
Oğlak-12	-	+	+	+	-	-	-	+	Tip A
Oğlak-15	-	+	+	+	-	-	-	+	Tip D
Buzağı-8	-	-	+	+	+	+	+	+	Tip C
Sığır-2	-	-	+	+	-	-	-	+	Tip D
Sığır-3	-	-	+	+	+	+	-	+	Tip A

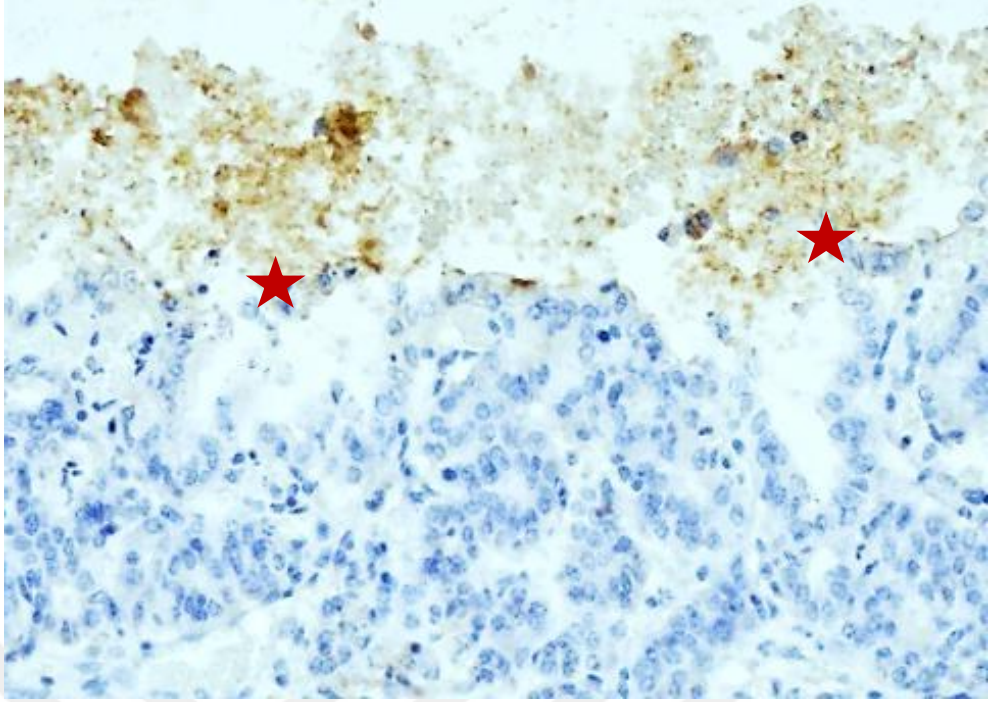
* Anti-*C.perfringens* için immunohistokimyasal boyama.
**ELISA testi sonuçlarına göre yapılan tiplendirme.



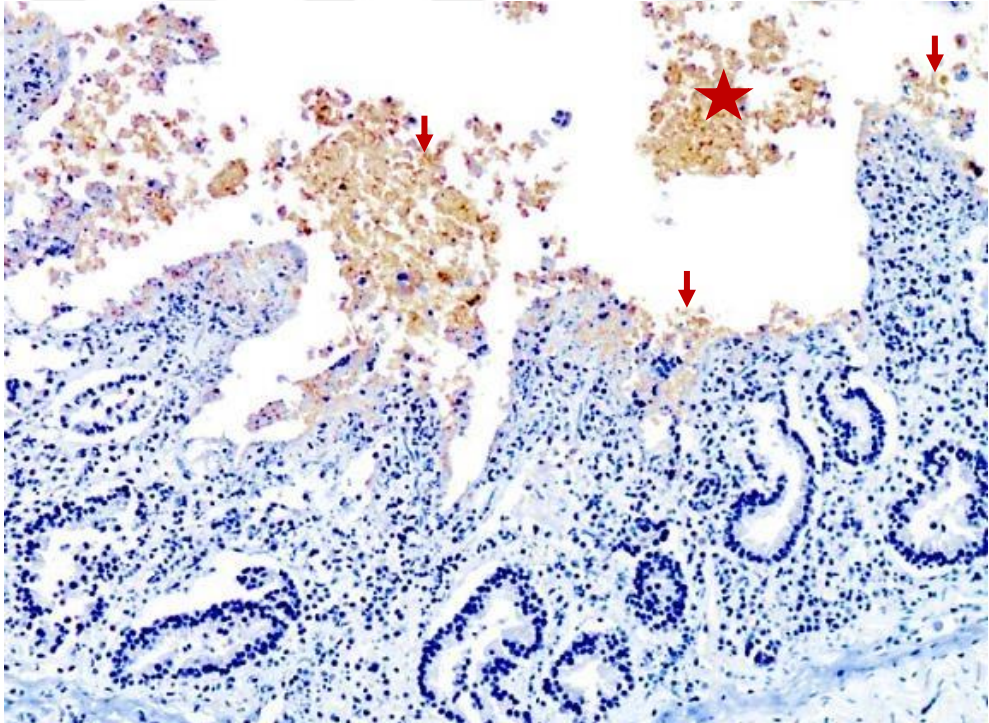
Şekil 3.39. Tip A enterotoksemili kuzuya (kuzu-43) ait ince bağırsak kesiti. Lümeninde dökülmüş epitellerde ve nekrotik villus uçlarında *C. perfringens* için pozitif boyanma (yıldız). X200, IHC, DAB kromojen, Mayer's hematoksilen.



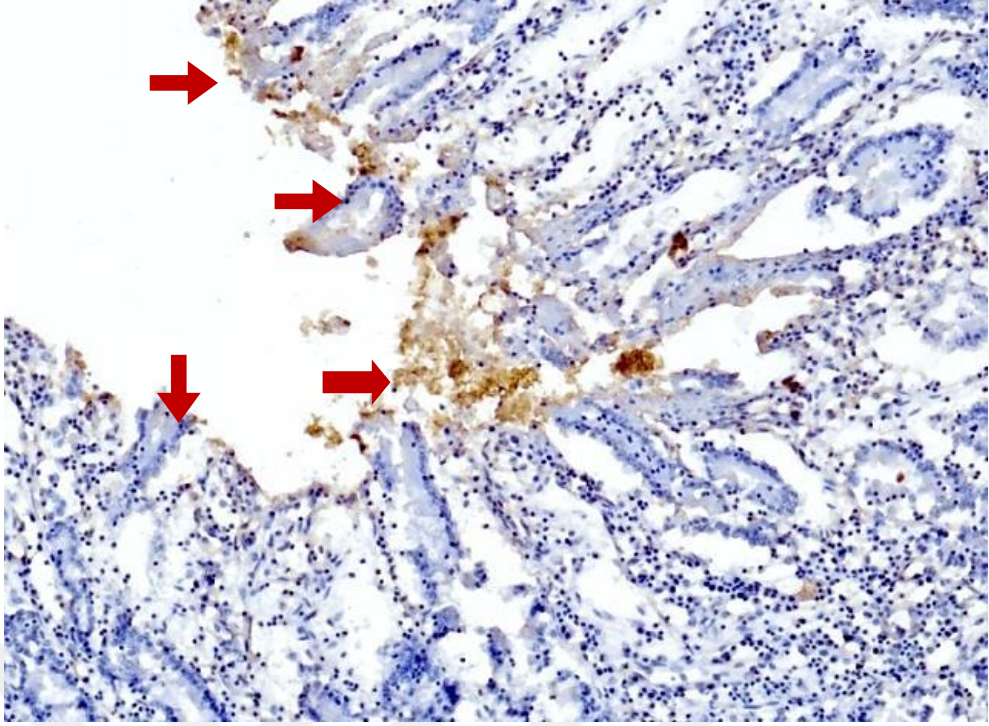
Şekil 3.40. Tip A enterotoksemili kuzuya (kuzu-43) ait ince bağırsak kesiti. Nekrotik villus uçlarında *C. perfringens* için pozitif boyanma (yıldız). X200, IHC, DAB kromojen, Mayer's hematoksilen.



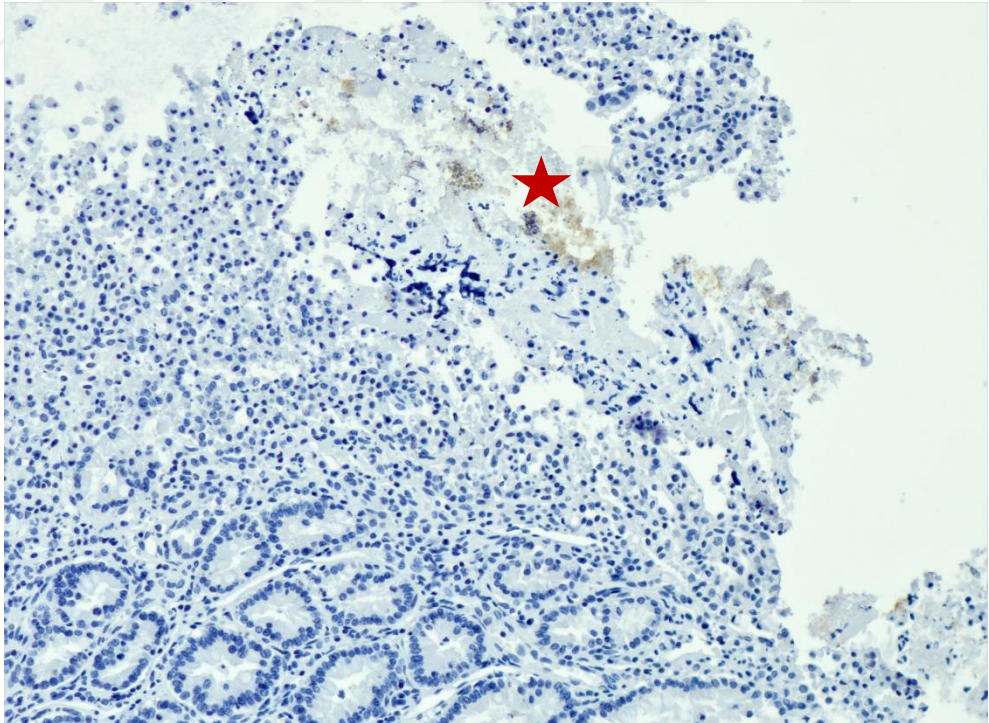
Şekil 3.41. Tip A enterotoksemili kuzuya (kuzu-43) ait ince bağırsak kesitinin yakından görünümü. Nekrotik villus uçlarında *C. perfringens* için pozitif boyanma (yıldızlar). X400, IHC, DAB kromojen, Mayer's hematoksilen.



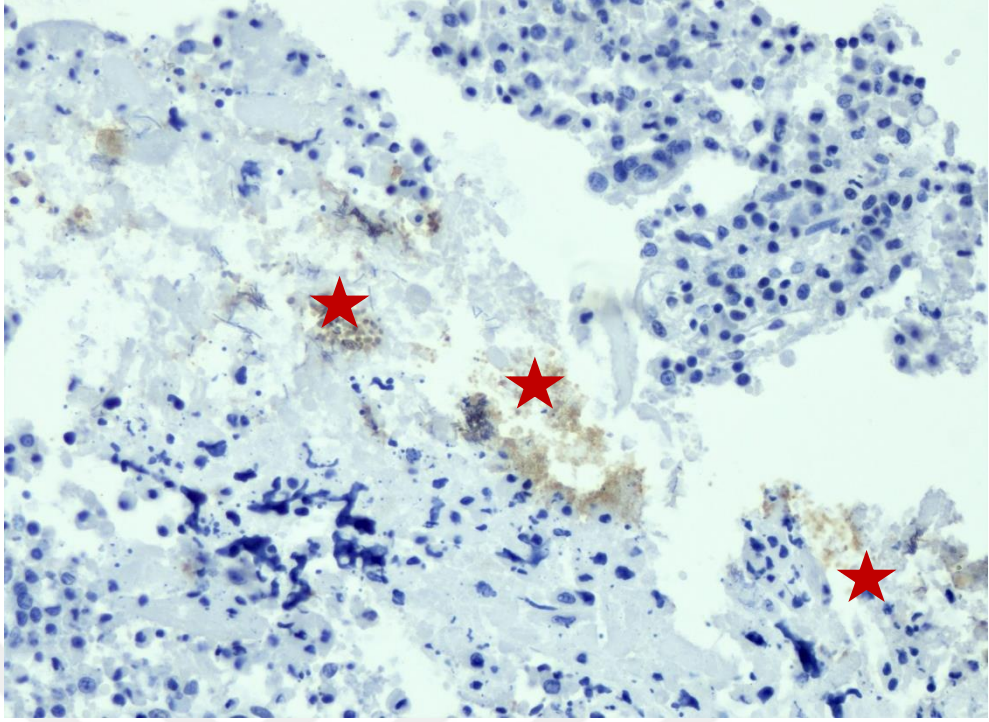
Şekil 3.42. Tip D enterotoksemili kuzuya (kuzu-37) ait ince bağırsak kesiti. Lümeninde dökülmüş epitellerde/eksudatta (yıldız) ve nekrotik villus uçlarında (oklar) *C. perfringens* için pozitif boyanma. X100, IHC, DAB kromojen, Mayer's hematoksilen.



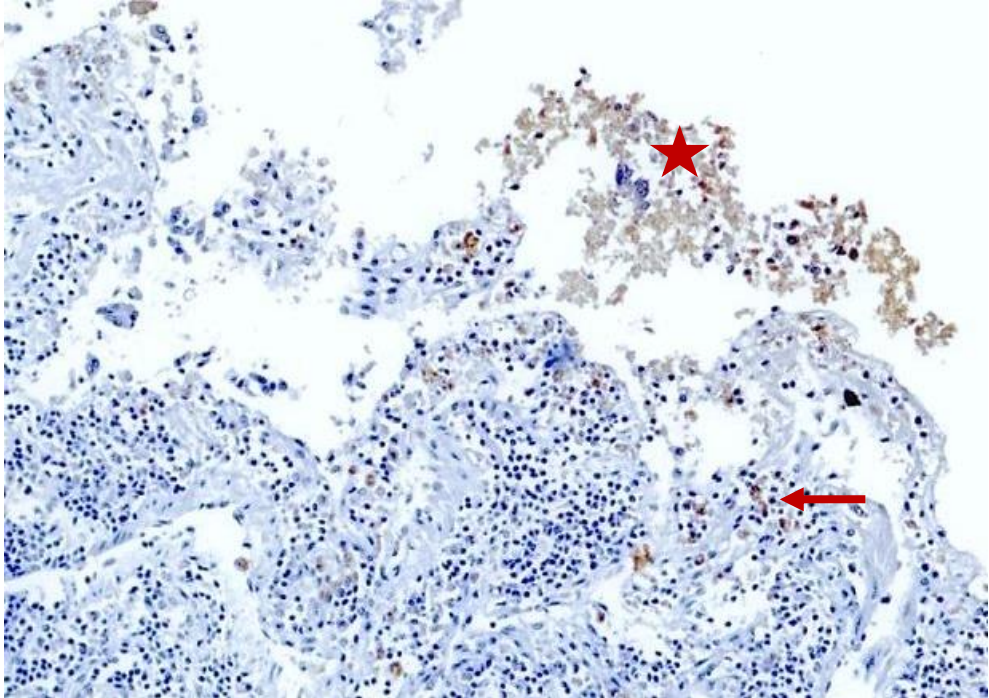
Şekil 3.43. Tip D enterotoksemili oğlağa (oğlak-15) ait ince bağırsak kesiti. Nekrotik villus uçlarında (oklar) *C. perfringens* için pozitif boyanmalar. X200. IHC, DAB kromojen, Mayer's hematoksilen.



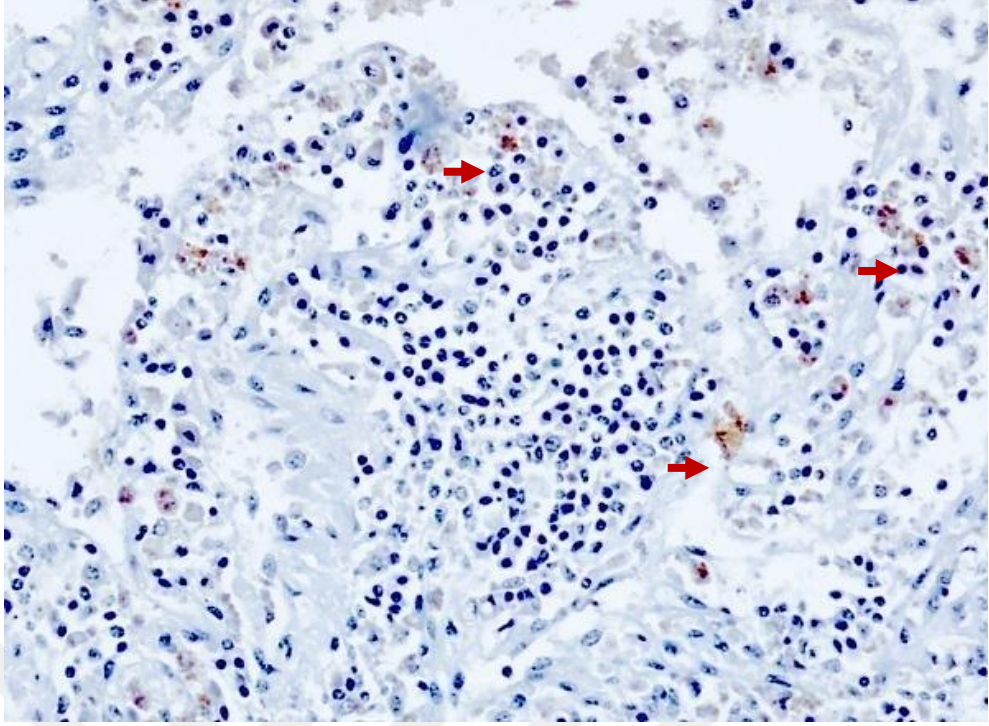
Şekil 3.44. Tip D enterotoksemili koyuna (koyun-12) ait ince bağırsak kesiti. Psödomembranda *C. perfringens* için pozitif boyanmalar (yıldız). X200. IHC, DAB kromojen, Mayer's hematoksilen.



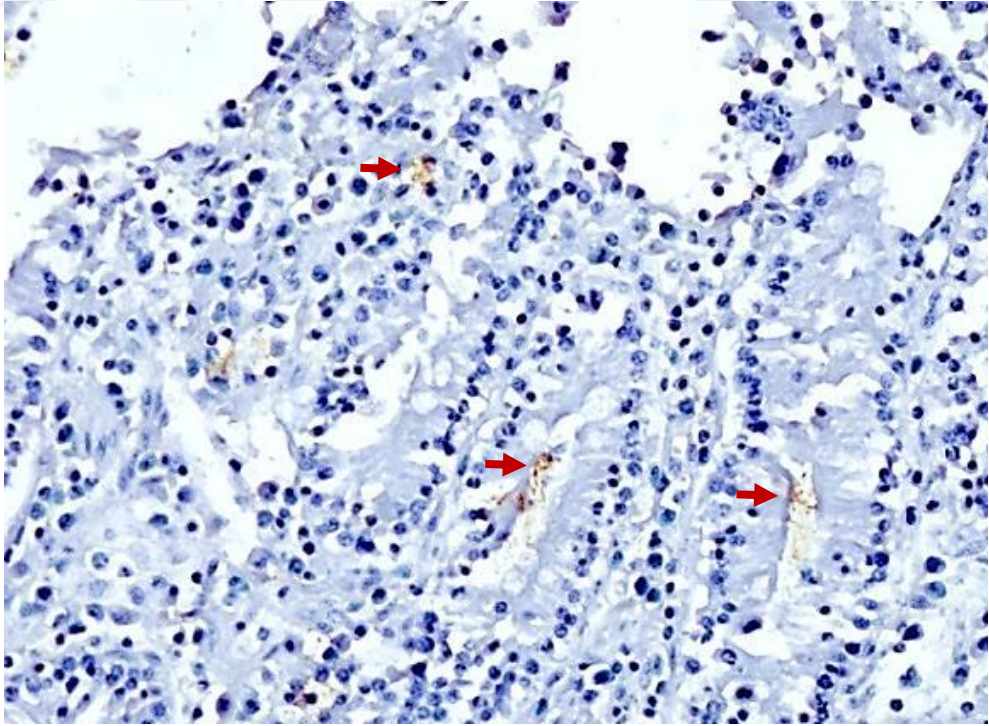
Şekil 3.45. Tip D enterotoksemili koyuna (koyun-12) ait ince bağırsak kesitinin yakından görünümü. Psödomembranda *C. perfringens* için pozitif boyanmalar (yıldızlar). X400. IHC, DAB kromojen, Mayer's hematoksilen.



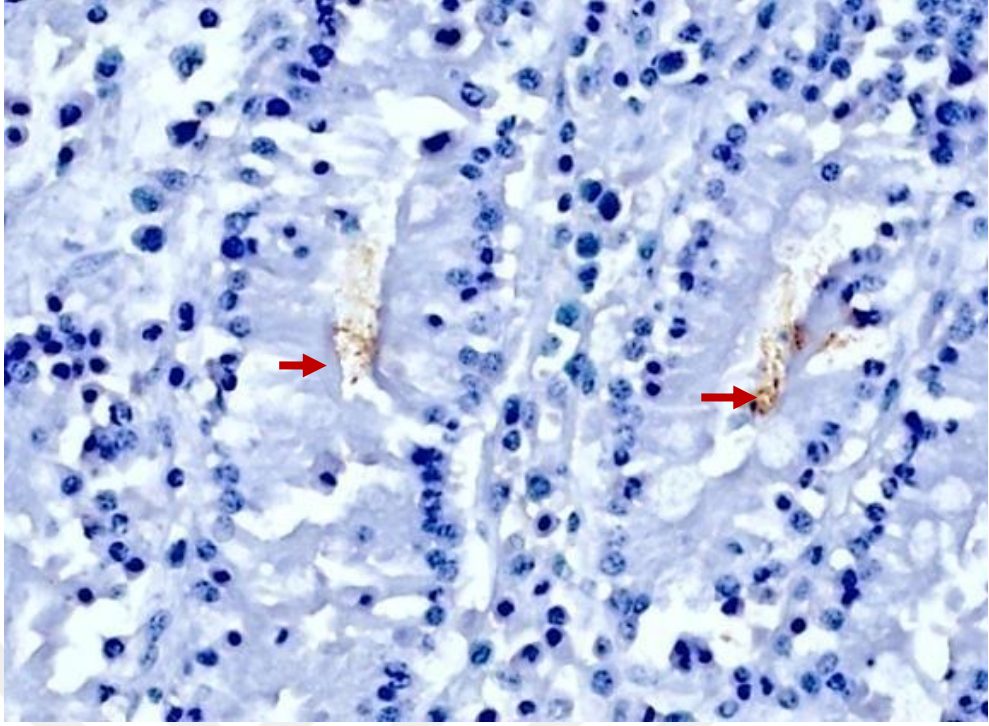
Şekil 3.46. Tip A enterotoksemili sığıra (sığır-3) ait ince bağırsak kesiti. Lümeninde dökülmüş epitellerde (yıldız), nekrotik villus uçlarında ve lamina propriyada (ok) *C. perfringens* için pozitif boyanmalar. X200, IHC, DAB kromojen, Mayer's hematoksilen.



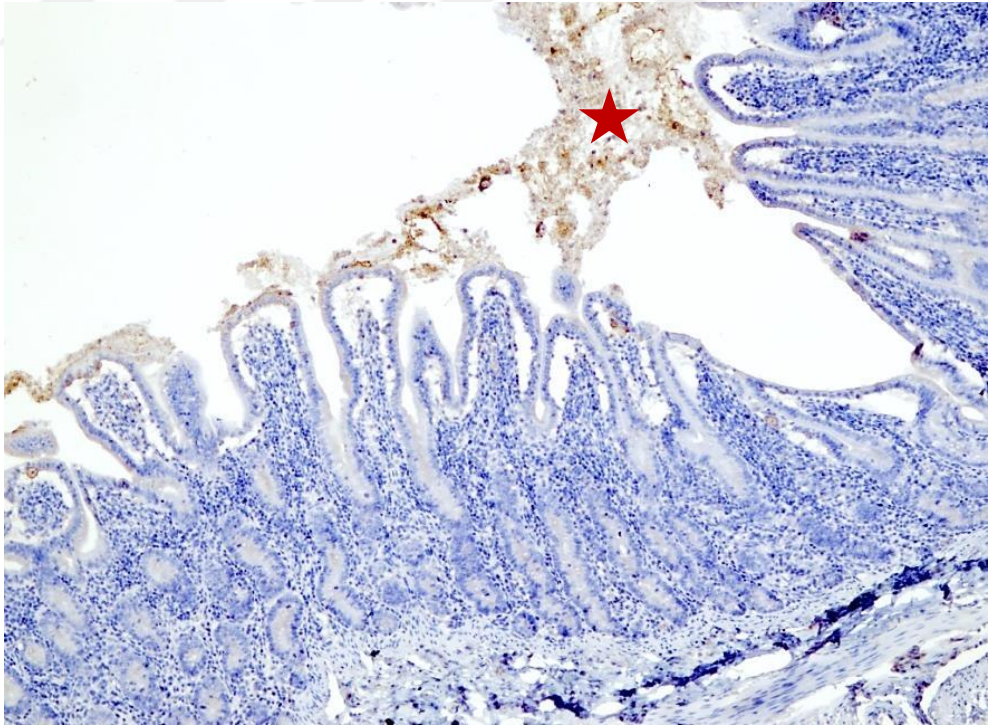
Şekil 3.47. Tip A enterotoksemili sığira (sığır-3) ait bağırsak kesitinin yakından görünümü. Lümeninde dökülmüş epitellerde, nekrotik villus uçlarında ve lamina propriyada *C. perfringens* için pozitif boyanmalar (oklar). X400, IHC, DAB kromojen, Mayer's hematoksilen.



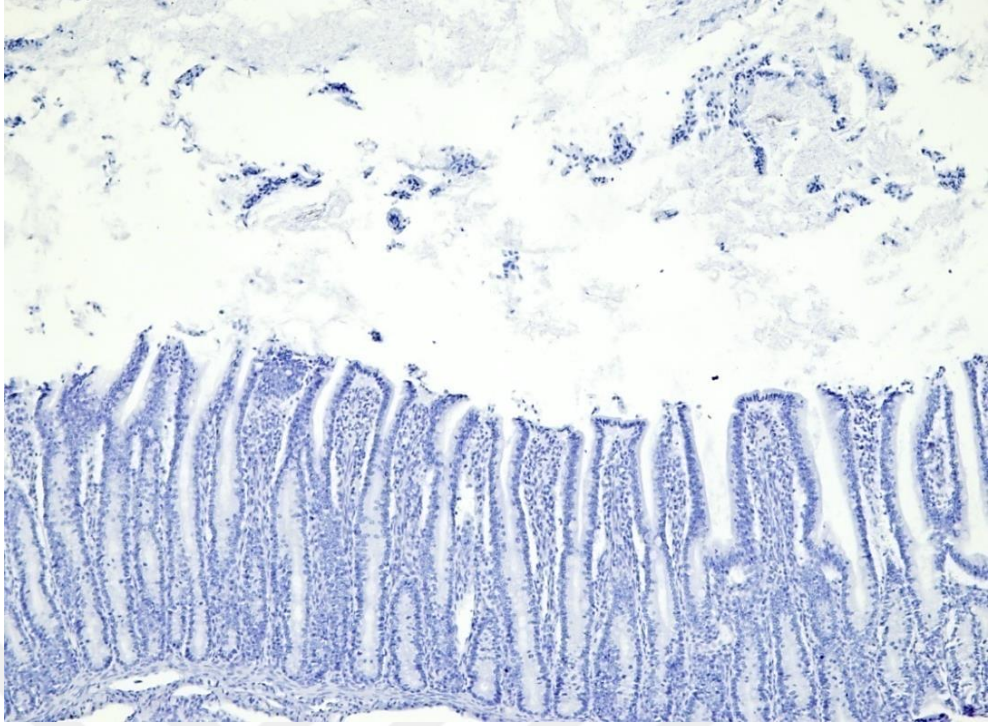
Şekil 3.48. Tip A enterotoksemili koyuna (koyun-9) ait bağırsak kesiti. Lamina propriya ve kriptlerde *C. perfringens* için pozitif boyanmalar (oklar). X400 IHC, DAB kromojen, Mayer's hematoksilen.



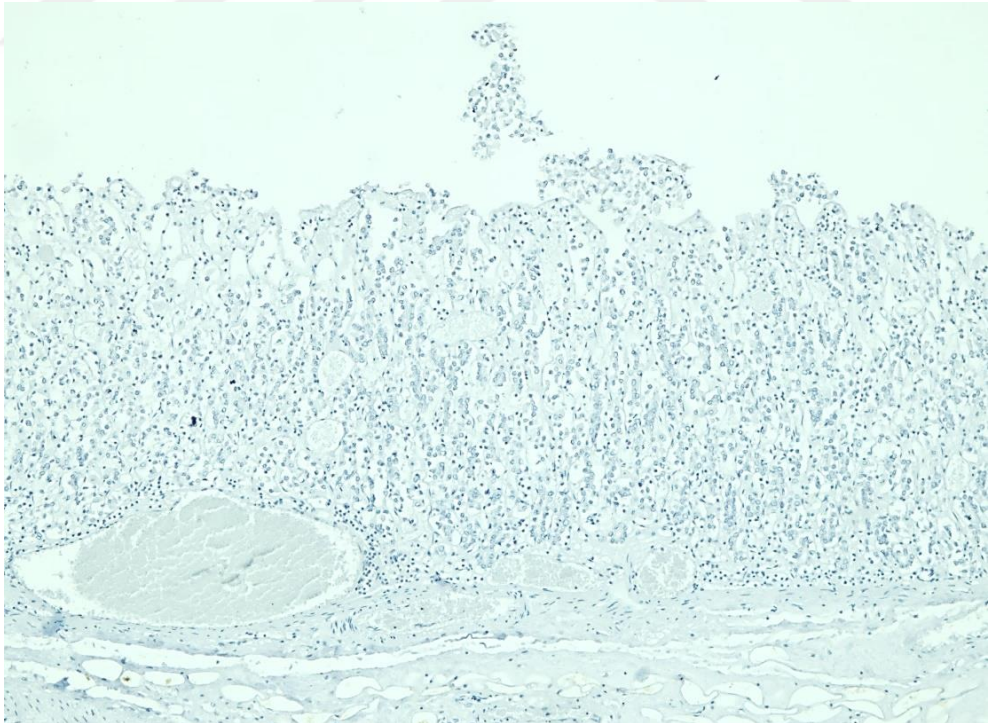
Şekil 3.49. Tip A enterotoksemili koyuna (koyun-9) ait bağırsak kesiti. Kriptlerde *C. perfringens* için pozitif boyanmalar (oklar). X630, IHC, DAB kromojen, Mayer's hematoksilen.



Şekil 3.50. Toksin tespit edilmeyen oğlağa (oğlak-13) ait bağırsak kesiti. Lümeninde *C. perfringens* için pozitif boyanmalar (yıldız). X100, IHC, DAB kromojen, Mayer's hematoksilen.

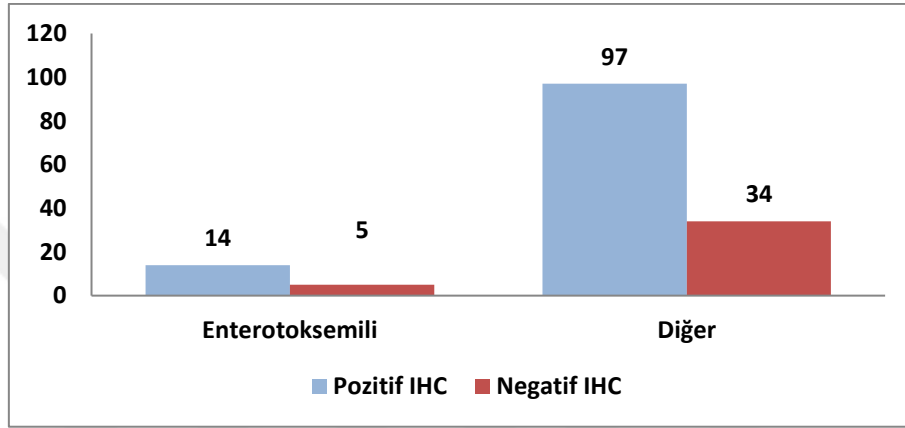


Şekil 3.51. Toksin tespit edilemeyen keçiye (keçi-4) ait ince bağırsak kesiti. Negatif kontrol. X100, IHC (antikorsuz), DAB kromojen, Mayer's hematoksilen.

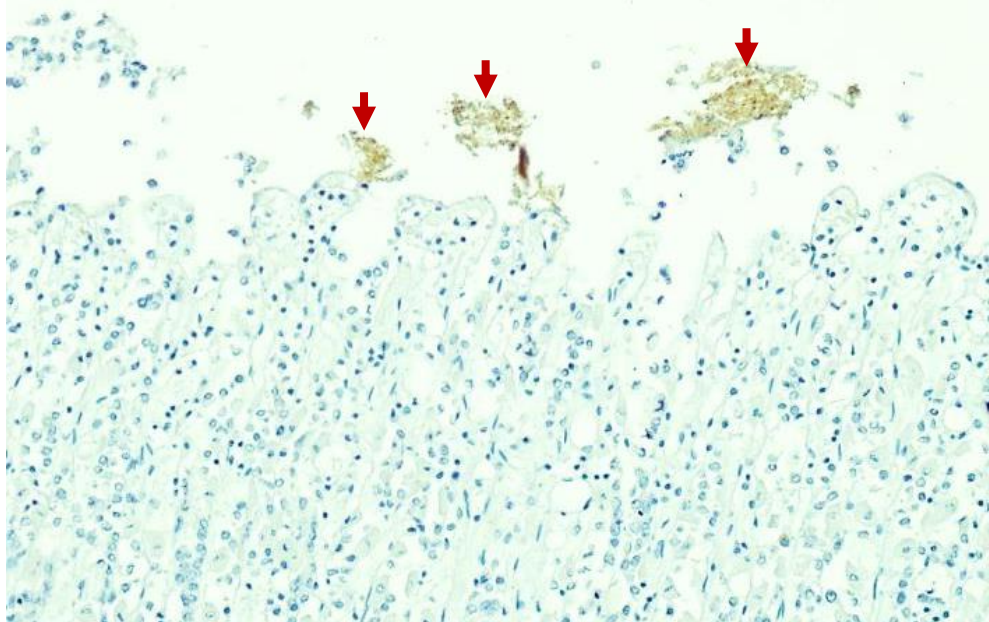


Şekil 3.52. Tip A enterotoksemili kuzuya (kuzu-1) ait abomasum kesiti. Negatif kontrol. X100, IHC (antikorsuz), DAB kromojen, Mayer's hematoksilen.

Çalışmadaki hayvanlara ait abomasum ve mezenteriyel lenf düğümlerinde de anti-*C.perfringens* antikoru kullanılarak immunohistokimyasal boyama yapıldı. Enterotoksemili ve diğer hayvanlara ait mezenterik lenf düğümlerinde pozitif reaksiyon gözlenmezken, enterotoksemili hayvanların 14 (%73,68)'ünde ve toksin tespit edilmeyen hayvanlardan 97 (%74,05)'sinde abomasum kesitlerinde immunohistokimyasal olarak pozitif reaksiyonlar gözlemlendi (Grafik 3.4). Abomasumda görülen pozitif boyanmalar lümende dökülmüş epitellerin olduğu alanlar ile sınırlıydı (Şekil 3.53).



Grafik 3.4. Enterotoksemili ve *C. perfringens* toksini tespit edilmeyen örneklerin abomasumundaki immunohistokimyasal boyama sonuçları.



Şekil 3.53. Tip A enterotoksemili kuzu (kuzu-1) ait abomasum kesiti. Lümende dökülmüş epitellerde *C. perfringens* için pozitif boyanmalar. X200, IHC, DAB kromojen, Mayer's hematoxilen.

3.5. İstatistiksel Bulgular

Mevcut çalışmada ELISA toksin tespiti ve anti-*C. perfringens*'in bağırsak kesitlerinde, bağırsak lümeninde dökülmüş epitellerde ve abomasum lümeninde dökülmüş epitellerde immunohistokimyasal olarak boyanma sonuçları arasında Pearson Chi-kare testine göre anlamlı bir fark belirlenemedi. Ancak ELISA toksin tespiti ile anti-*C. perfringens*'in bağırsak nekrotik villus uçları, psödomembran, lamina propriya ve kript lokalizasyonlarında IHC ile boyanma sonuçları arasında anlamlı bir farkın olduğu tespit edildi ($p<0,01$). Spearman'ın Korelasyon Katsayısı analizine göre ELISA toksin tespiti ile anti-*C. perfringens* için IHC boyama sonuçları değerlendirildiğinde; nekrotik villus uçlarında ($r: 0,485$) ve psödomembranlarda ($r: 0,476$) pozitif yönde ve orta derecede; lamina propriya ($r: 0,254$) ve kriptlerde ($r: 0,255$) ise pozitif yönde ve zayıf derecede istatistiki olarak anlamlı bir ilişkinin olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 3.10).

Tablo 3.10. ELISA toksin tespiti ile anti-*C. perfringens* IHC bulguları arasındaki istatistiksel ilişki.

Değişkenler		ELISA		Pearson Chi-Kare (p değeri)	Spearman Korelasyon Katsayısı (r)	Spearman Korelasyon (p değeri)
		Neg	Poz			
Bağırsak kesitlerinde IHC boyanma	Neg	16	-	0,107	+0,124	0,161
	Poz	115	19			
Bağırsak lümeninde dökülmüş epitellerde IHC boyanma	Neg	19	-	0,076	+0,139	0,116
	Poz	112	19			
Nekrotik villus uçlarında IHC boyanma	Neg	93	-	p<0,01	+0,485	p<0,05
	Poz	38	19			
Psödomembranda IHC boyanma	Neg	124	9	p<0,01	+0,476	p<0,05
	Poz	7	10			
Lamina propriyada IHC boyanma	Neg	128	14	p<0,01	+0,254	p<0,05
	Poz	3	5			
Kriptlerde IHC boyanma	Neg	130	16	p<0,01	+0,255	p<0,05
	Poz	1	3			
Abomasum lümeninde dökülmüş epitellerde IHC boyanma	Neg	34	5	0,973	-0,03	0,973
	Poz	97	14			
Spearman Korelasyon Katsayısı renk skalası:		-1 -0,5 0 0,5 1				

4. TARTIŞMA

Çalışmamız PVKE'ne klostridial enterotoksemi şüpheli farklı yaş ve türden ruminantlar üzerinde yapılmıştır. Çalışmada temel olarak *C. perfringens* toksini tespit edilen enterotoksemili olgularla, toksin tespit edilemeyen hayvanlarda gözlenen makroskobik, mikroskobik ve immunohistokimyasal bulguların karşılaştırılması amaçlanmıştır. Buradan hareketle, *C. perfringens* antijeni yönünden özellikle dejenere/nekrotik villus uçları, dökülmüş epiteller ve lamina propriyadaki pozitif IHC boyanmaların, toksin tespit edilen olgularla uyumluluğunun araştırılması ve patolojik bulgularla birlikte değerlendirildiğinde, lezyonlu bölgelerdeki pozitif IHC boyanmanın, hastalığın tanısındaki olası öneminin belirlenmesi hedeflenmiştir. Enterotokseminin kesin tanısı için bağırsak içeriğinde *C. perfringens* toksinlerinin identifikasyonunu sağlayan in vivo ve in vitro teknikler kullanılır. İn vivo Toksin Nötralizasyon Testi (TNT), PCR ve ELISA toksin tespiti için faydalanan testler arasındadır. ELISA, deney hayvanı kullanımı gerektirmemesi, birden fazla örneğin aynı anda çalışılabilmesi, manipülasyon kolaylığı, kısa sürede tekrarlanabilmesi, daha ekonomik olması, yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle günümüzde *C. perfringens* toksinlerinin tespiti için yaygın şekilde kullanılmaktadır (Songer 1996, Hadimli ve ark 2012, Duracova ve ark 2018, Tutuncu ve ark 2018). Bu çalışmada, *C. perfringens* toksinlerinin tespiti için ELISA sonuçları esas alınmıştır.

Ülke dışında yapılan çalışmalarda %24,13 ile %100 arasında değişen oranlarda enterotoksemi yaygınlığı bildirilmiştir (El Idrissi ve Ward 1992, Miserez ve ark 1998, Greco ve ark 2005, Nazki ve ark 2017). Türkiye'nin farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda ise *C. perfringens* toksinlerinin tespiti ve tiplendirilmesi amacıyla TNT, PCR ve ELISA'nın kullanıldığı görülmektedir. Bu çalışmalarda farklı yaş grubu ve tür düzeyinde (koyun, keçi ve sığır) enterotokseminin %5,3-%84,6 arasında değişen oranlarda görüldüğü bildirilmiştir (Gökce ve ark 2007, Hadimli ve ark 2012, Seyitoğlu ve ark 2012, Arslan ve ark 2016, Tutuncu ve ark 2018). Çalışmamıza benzer olarak farklı yaş ve hayvan türlerinde (koyun, keçi ve sığır) Marmara Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada (Yaman Aydoğan 2019); 21/249 (%8,4) oranında *C. perfringens* toksinlerinden en az biri yönünden pozitiflik belirlenmiştir. Bu çalışmada Marmara Bölgesi illerinden PVKE'ye gönderilen koyun, keçi ve sığır türlerinden farklı yaş gruplarında toplam 150 baş enterotoksemi şüpheli hayvanda

ELISA testi ile 19 (%12,67) olguda *C. perfringens* toksinlerinden (α , β ve ϵ) en az biri yönünden pozitiflik tespit edildi. Çalışmamızdaki toksin pozitifliği daha önce Türkiye'de yapılan çalışmaların sonuçları aralığında olmakla birlikte, Marmara Bölgesi'nde Arslan ve ark (2016) ve Yaman Aydoğan (2019) tarafından bildirilen toksin pozitifliğine yakın bulundu.

ELISA ile Suudi Arabistan'da (Fayez ve ark 2013) koyunlarda %30,42, PCR ile Pakistan'da (Hussain ve ark 2018) keçilerde %80,73 ve İtalya'da (Greco ve ark 2005) kuzu ve oğlaklarda %100, Yunanistan'da (Gkiourtzidis ve ark 2001) kuzularda %58,8 oranında *C. perfringens* toksin varlığı bildirilmiştir. Türkiye'de ise ELISA yöntemi kullanılarak tür düzeyinde enterotoksemi şüpheli hayvanlarda yapılan çalışmalarda; Kars yöresindeki kuzularda %57,1 (Gökçe ve ark 2010), Konya'daki kuzularda %21,33 (Hadimli ve ark 2012), Kars ilindeki koyunlarda %84,61 (Gökçe ve ark 2007), Erzurum yöresindeki koyunlarda %52,8 (Seyitoğlu ve ark 2012), Samsun ilindeki koyun ve keçilerde %45,2 (Tutuncu ve ark 2018), Kars yöresindeki buzağılarda %81,33 (Koç ve Gökçe 2007) oranlarında *C. perfringens* toksinlerinden en az birinin varlığı rapor edilmiştir. Yaman Aydoğan (2019) tarafından Marmara Bölgesi'nde yapılan çalışmada; kuzularda 8/93, koyunlarda 6/67, oğlaklarda 2/34, keçilerde 4/25, buzağılarda 1/16 oranlarında toksin pozitifliği tespit edilmiştir. TNT kullanılarak yapılan çalışmalarda ise enterotoksemi şüpheli küçük ruminantlarda; Elazığ'da (Özcan ve Gürçay 2000) %38,6 (51/132) oranında, Marmara Bölgesi'nde (Arslan ve ark 2016) kuzu ve oğlaklarda %5,3 (6/114) oranında *C. perfringens* toksinleri yönünden pozitiflik belirlenmiştir. Görüldüğü üzere gerek dünyada gerekse ülkemizde yapılan çalışmalarda, kullanılan yöntemle göre değişmekle birlikte çok geniş aralıklarda *C. perfringens* toksin varlığı rapor edilmektedir. Bu değişkenlik hastalığın zaman zaman artıp azalmakla birlikte her zaman var olduğunu ve ruminant yetiştirme işletmeleri için de halen büyük bir sorun olmaya devam ettiğini ortaya koymaktadır.

Hayvan türü ve yaş grubu bazında Tablo 3.2'de sunduğumuz veriler ile daha önceden yapılan çalışma sonuçları değerlendirildiğinde, özetle bu çalışmadaki toksin pozitifliğinin, ülke dışında örnekleri verilen ve ülkemizde de Kars, Erzurum, Elazığ, Konya ve Samsun illerinde yapılan çalışmalardan düşük, Marmara Bölgesi'nde yapılan çalışma sonuçlarına ise yakın olduğu gözlenmektedir. Küçük ruminantlarda

%12,21 (16/131) oranında belirlediğimiz toksin pozitifliği Elazığ (Özcan ve Gürçay 2000) ve Samsun (Tutuncu ve ark 2018) illerinde belirlenen oranlardan düşük bulunmuştur. Kuzu ve oğlaklarda belirlediğimiz %11,46 (11/96) oranında toksin pozitifliği, Marmara Bölgesi'nde Arslan ve ark (2016) tarafından bildirilenden yüksek bulunmuştur. Yine çalışmamızdaki kuzu, koyun, oğlak ve buzağılardaki toksin pozitifliği oranları, Marmara Bölgesi'nde (Yaman Aydoğan 2019) bildirilenlerden yüksek bulunmuştur. Aynı çalışmada keçilerde toksin tespit edilmiş olmasına karşılık bizim çalışmamızda toksin varlığı belirlenememiştir. Genel olarak bakıldığında bizim çalışmamızdaki toksin pozitiflik oranı çoğu yurt içi ve yurt dışı araştırmalara göre daha düşük çıkmış olup, bu durum Marmara Bölgesi'nde mera hayvancılığının yukarıdaki bölgelere göre daha az yapılması, aşılama stratejileri ve çevresel faktörlerle ilişkilendirilebilir.

Ülke dışında enterotoksemili hayvanlarda ELISA ile yapılan tiplendirme çalışmaları incelendiğinde, Suudi Arabistan'da (Fayez ve ark 2013) koyunlarda %47,95 tip A, %6,85 tip B, %19,18 tip C ve %26,03 oranında tip D tespit edilmiştir. PCR ile yapılan çalışmalarda Yunanistan'da (Gkiourtzidis ve ark 2001) kuzuların %46'sı tip B, %20'si tip C ve %28'i tip D; Hindistan'da (Nazki ve ark 2017) koyunların %29,16'sı tip A ve %70,84'ü tip D; Pakistan'da (Hussain ve ark 2018) keçilerin %78,06'sı tip A, %5,16'sı tip B, %3,23'ü tip C ve %13,55'i tip D; İtalya'da (Greco ve ark 2005) kuzu ve oğlakların %50'si tip A ve %50'si tip D olarak tiplendirilmiştir. Ülkemizde ise ELISA ile *C. perfringens* tiplendirilmesi yapılan çalışmalarda, Kars yöresinde (Gökçe ve ark 2010) enterotoksemili kuzuların %18,8'i tip A, %21,9'u tip B, %28,2'si tip C ve %31,3'ü tip D; Konya'da (Hadimli ve ark 2012) enterotoksemili kuzuların, %40,62'si tip A, %3,12'si tip B, %28,12'si tip C ve %28,12'si tip D olarak belirlenmiştir. Kars ilinde (Gökçe ve ark 2007) enterotoksemili koyunlarda %47,27 tip A, %9,09 tip B, %4,54 tip C ve %39,07 tip D; Erzurum'da (Seyitoğlu ve ark 2012) yine enterotoksemili koyunlarda %32,4 tip A, %18,9 tip B, %24,3 tip C ve %24,3 tip D bulunmuştur. Samsun ilinde (Tutuncu ve ark 2018) enterotoksemili küçük ruminantların %65'i tip A, %1'i tip B, %5'i tip C ve %29'u tip D olarak tiplendirilmiştir. Marmara Bölgesi'nde (Yaman Aydoğan 2019) ise enterotoksemili ruminantlarda *C. perfringens* tip A, C ve D dağılımı sırasıyla 7/21, 3/21 ve 11/21 oranlarında raporlanmıştır. Çalışmaların sonuçları karşılaştırıldığında, o bölgedeki tip yaygınlığını ortaya koymakla birlikte, tipler

arasında belirgin bir korelasyon bulunmadığı ancak genel olarak tip A ve D'nin diğerlerine göre daha yüksek oranlarda belirlendiği dikkati çekmektedir. Bu çalışmada da tip A daha fazla olmakla birlikte, tip A ve tip D'nin yaygın olduğu görüldü.

Araştırmacılar tarafından Kars (Gökce ve ark 2007, Gökçe ve ark 2010), Erzurum (Seyitoğlu ve ark 2012), Konya (Hadimli ve ark 2012) ve Samsun (Tutuncu ve ark 2018) illerinde enterotoksemili hayvanlarda *C. perfringens* tip B bildirilmesine rağmen Marmara Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada (Yaman Aydoğan 2019) bu toksin tipinin tespit edilemediği raporlanmıştır. Buna benzer şekilde bizim çalışmamızda da hiçbir olguda *C. perfringens* tip B belirlenememiştir. Çalışmamız sonuçlarıyla paralel şekilde *C. perfringens* tip A ve tip D enterotoksemi ülkemizde (Gökce ve ark 2007, Tutuncu ve ark 2018, Yaman Aydoğan 2019) ve yurt dışında (Greco ve ark 2005, Fayez ve ark 2013, Nazki ve ark 2017, Hussain ve ark 2018) daha önceden yapılan çalışmalarda en sık belirlenen tip olarak dikkati çekmektedir. Tip C ise çalışmamızda sadece bir adet buzağıda tespit edilmiş olup bu durum, daha önceden bu toksin tipinin buzağılarda görüldüğünü bildiren ülke içi (Koç ve Gökce 2007) ve ülke dışından (Garcia ve ark 2013) ELISA çalışmalarıyla uyumlu bulunmuştur. Buzağılarda Marmara Bölgesi'nde (Yaman Aydoğan 2019) tip A enterotoksemi ve Kars ilinde (Koç ve Gökce 2007) tip A, B, C ve D enterotoksemi raporlanmış olmasına karşın, ELISA toksin testi sonuçlarına göre yetişkin bir sığırdan tip D enterotoksemi teşhisi ülkemizde ilk kez bu çalışmada gerçekleştirilmiştir.

Sunulan çalışmada Marmara Bölgesi'nde daha önceden yapılan çalışmaya (Yaman Aydoğan 2019) benzer şekilde farklı yaş ve türden hayvanlarda (koyun, keçi ve sığır) *C. perfringens* toksin tipleri değerlendirilmiştir. Bulgularımızın bu bölgede enterotoksemi yaygınlığını ve tiplerin dağılımını ortaya koyması açısından değerli olduğu düşünülmektedir. Ülkemizde ve ülke dışında *C. perfringens* toksinlerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda farklı oranlarda ve değişken sonuçlar elde edildiği gözlenmektedir. Mevcut çalışmamızda daha önceden yapılan araştırmalardan farklı oranların elde edilmesinde; çalışma metotlarının farklılığı, hastalığın sporadik seyretmesi, hayvanların tür ve yaş aralığına göre örnek büyüklüğünün değişken olması, örneklerin elde edildiği işletmelerde etkin koruyucu

aşılama çalışmalarının yapılması veya yapılmaması, bakım ve besleme şartlarındaki değişiklikler gibi durumların etkili olabileceği düşünülmüştür.

Sunulan çalışmamızda daha önceden bildirilen literatür bulgularından farklı olarak ELISA toksin testi sonuçlarına göre *C. perfringens* tip B'nin belirlenememesi ve *C. perfringens* tip C'nin ise sadece bir adet örnekte tespit edilmesinde; numunelerin laboratuvara ulaştırılmasında yaşanan gecikme ve uygunsuz şartlarda gönderilmesi sonucu beta ve epsilon toksinlerin hızlıca tahrip olması ve *C. perfringens* tiplerinin dağılımında bölgesel farklılık görülme ihtimali gibi değişikliklerin etkili olabileceği öngörülmüştür. Ek olarak bu iki *C. perfringens* tipinin ana virülans faktörü olan beta toksinin proteolitik enzimler (pepsin, tripsin, kimotripsin vb.) tarafından hızla parçalanması bu duruma yol açmış olabilir (Lawrence ve Cooke 1980, Popoff 1998, Fisher ve ark 2006, Sayeed ve ark 2008, Uzal ve ark 2010, Diab ve ark 2012). Serolojik ve moleküler testlerin hassas olmasına karşın; *C. perfringens* toksinlerinin stabil olmaması, marazi maddelerin hazırlanmasındaki gecikme, hava sıcaklığı, örneklerin yetersiz miktarda ve uygun olmayan koşullar altında laboratuvara ulaştırılması toksinlerin tahrip olmasına ve titresinde azalmaya neden olabilmektedir (Songer 1996, Uzal ve ark 2003).

Soğuk hava şartlarına bağlı çevresel stres, taze yeşil otların bulunduğu meraların kullanımı ve yemlemede yapılan ani değişiklikler sonrası enterotoksemi vakalarında artış görüldüğü ifade edilmiştir (Uzal ve ark 1994, Özcan ve Gürçay 2000, Uzal ve ark 2016). Literatür bulgularına uyumlu olarak çalışmamızdaki vakaların mevsim kayıtları incelendiğinde, Marmara Bölgesi illerinden enterotoksemi şüpheli hayvanların %42,67 (64/150) ve %28 (42/150) oranlarında sırasıyla kış ve ilkbahar mevsimlerinde daha sık örneklendiği görülmüştür. Pozitif olgu bazında bakıldığında ise ilkbahar mevsimi, %19,05 (8/42)'lik oranla enterotoksemilerin en fazla tespit edildiği dönem olarak belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen hayvanlar 128 farklı hayvancılık işletmesinden temin edilmiştir. Enterotoksemi tespit edilen 19 vaka 18 ayrı işletmeden örneklenmiştir. Bu işletmelerde toplam hayvan sayısı ve ölüm oranları hakkında kesin bilginiz olmamasına karşın, ölümlerin sporadik olarak gözlenmesi, genel olarak işletmelerde aşılanmanın yapılması ve bazı hayvanlarda antikor yanıtının yeterli olmaması ile ilişkilendirilmiştir. Marmara Bölgesi illerinden Edirne (24/150) ve Bursa (22/150)

enterotoksemi şüpheli örneklerin en çok gönderildiği iller olarak tespit edilmiştir. Enterotoksemili olduğu tespit edilen hayvanların illere göre dağılımı incelendiğinde Kocaeli'den 4, Bursa, Edirne ve Kırklareli'den 3'er olgunun PVKE'ne geldiği belirlenmiştir. Çalışmamızdaki örneklerin elde edildiği işletmelerin aşılama programları, bakım ve besleme koşulları gibi predispoze faktörler hakkında kesin bir bilgi edinilememiştir. Ancak ilkbaharda enterotoksemi vakalarının sık görülmesi bölgemizde doğumların kış ve ilkbahar aylarında yoğunlaşmasına, koruyucu aşılama yetersizliğine, hayvanların yeşil otlaklara ya da yüksek karbonhidrat içeren rasyonlara adaptasyon süreci olmaksızın erişimine ve ani sıcaklık değişikliklerinin hayvanlarda stres oluşturmaya bağlanmıştır.

Enterotoksemili hayvanlarda spesifik olmamakla birlikte makroskopik olarak ince ve kalın bağırsaklarda konjesyon, bağırsak lümeninde fazla miktarda koyu-kırmızımsı içerik, mukozada hemoraji ve ülser belirgindir. Bu bulgulara ek olarak perineal bölgenin sıvı içerikle kirlenmesi, asites, hidrotoraks, hidroperikardiyum, pulmoner ödem, kalpte epikardiyal peteşiyel hemoraji, böbreklerde supkapsüler hemoraji ve konjesyon, karaciğerde solgun renk değişikliği ve kıvamında gevreklik görülebilir (Greco ve ark 2005, Gökce ve ark 2007, Savic ve ark 2012, Hassanein ve ark 2017, Singh ve ark 2017). Histopatolojik olarak ince ve kalın bağırsak mukozasında nekroz ve epitellerinde deskuamasyon, nekrotik alanlarda çok sayıda *Clostridium* basili, villuslarda atrofi, propriyada yangısal hücre infiltrasyonu, mukozal ve submukozal damarlarda konjesyon en belirgin bulgular olarak bildirilmektedir. Bunların dışında akciğerde alveoler ödem ve konjesyon, böbreklerde intersitisyel hemoraji, tubul epitellerinde koagülasyon nekrozu, karaciğerde konjesyon ile birlikte hepatositlerde sitoplazmik vakuolasyon ve nekroz, serebral korteks ve serebellumda konjesyon ve perinöral ödem görülebilir (Hassanein ve ark 2017, Singh ve ark 2017).

Bu çalışmada da ELISA ile kesin enterotoksemi tanısı konulan 19 olguda literatür bulgularıyla uyumlu ancak farklı görülme sıklığında makroskopik ve mikroskopik bulgular gözlenmiştir. Bu bulgulardan makroskopik olarak bağırsak serozasında hiperemi, lümeninde hemorajik içerik ve mukozasında hemoraji, mezenterik lenf düğümlerinde büyüme, pulmoner ödem, subepikardiyal peteşiyel hemoraji, karaciğerde solgun renk değişimi ve kıvamında gevrekleşmenin ön plana

çıkacağı dikkati çekti. Mikroskopik olarak ise bağırsak villuslarında nekroz ve deskuamasyon, villuslarda atrofi, psödomembran oluşumu, nekroze villus uçlarında ve lümende bazofilik bakteri kümeleri, lamina propriyada yangısal hücre infiltrasyonu, kriptlerde dejenerasyon ve deskuamasyon, akciğerde alveoler ve intersitisyel ödem, miyokardiyal hemoraji, hepatositlerde vakuoler dejenerasyon, böbreklerde tubuler dejenerasyon ve nekroz enterotoksemili hayvanlarda en sık gözlenen bulgular arasındaydı. Literatür verilerinde de (Dray 2004, Abutarbush ve Radostits 2005, Miyakawa ve ark 2007, Morris ve ark 2011, Valgaeren ve ark 2015, Diab 2016, Uzal 2016) sıklıkla söz edilen bu patolojik bulguların, enterotoksemi için tip ayırt edici olmamakla birlikte büyük ölçüde tanıya yardımcı olabileceği ve toksin izolasyonunun da her zaman, her olguda tam olarak gerçekleştirilemediği göz önüne alındığında saha şartlarında bu hastalığın ön teşhisi için rahatlıkla kullanılabileceği değerlendirilmiştir.

Koyunlarda *C. perfringens* tip A enterotoksemisinin makroskopik ve mikroskopik olarak spesifik bulguları olmamasına rağmen bu tip tarafından oluşturulan Sarı Kuzu Hastalığı'nda generalize ikterus, idrar kesesinin koyu kırmızı renkte idrarla dilatasyonu, karaciğer kıvamında gevreklik, böbreklerde koyu renk ve genişleme görüldüğü ifade edilmiştir. Histopatolojik olarak ise hemoglobinürik nefrozis, pulmoner konjesyon ve ödem, hepatositlerde nekroz görüldüğü bildirilmiştir (Uzal ve Songer 2008, Uzal 2016). Bu çalışmadaki tip A enterotoksemili koyunlarda bağırsak serozasında hiperemi, lümeninde hemorajik içerik ve mukozasında hemoraji, mezenterik lenf düğümlerinde büyüme, pulmoner ödem, subepikardiyal peteşiyel hemoraji, karaciğerde solgun renk ve gevrek kıvam makroskopik incelemelerde en sık kaydedilen lezyonlardı. Ek olarak iki adet tip A enterotoksemili kuzuda “Sarı Kuzu Hastalığı” bulgularının ifade edildiği literatürle (Uzal ve Songer 2008, Uzal 2016) uyumlu generalize ikterus, idrar kesesinin koyu kırmızı renkte idrarla dilatasyonu, karaciğerde solgun renk ve kıvamında gevreklik ile böbreklerde koyu renk ve büyüme tespit edildi. Histopatolojik incelemelerde tip A enterotoksemili koyunların tamamında bağırsak villuslarında nekroz ve deskuamasyon, lamina propriyada yangısal hücre infiltrasyonu, nekrotik villus uçlarında ve lümende bakteri kümelenmesi, kriptlerde dejenerasyon ve deskuamasyonun bulunduğu dikkati çekti. İkterusla karakterize patolojik değişiklikler gözlemlendiğinde tespiti nispeten daha kolay olan Sarı Kuzu Hastalığı

dışında koyunlarda *C. perfringens* tip A üzerine fazla sayıda araştırma olmaması nedeniyle çalışma bulgularımızın, bu tipi ön plana çıkarması ve özellikle kuzu ve oğlaklar için öncelikle değerlendirilmesi gerektiğine işaret etmesi açısından değerli olacağı düşünülmüştür.

Enterotokseminin buzağılarda ani ölüm veya diyareye neden olduğu bilinir. Garcia ve ark (2013) tarafından tip C enterotoksemili buzağılarda ince bağırsak mukozasında yaygın hemoraji ve lümende hemorajik içerik, rumende serozal multifokal hemoraji, mikroskobik incelemede ince bağırsak villus epitellerinde başlayan ve daha derin tabakalara ilerleyen diffuz koagülasyon nekrozu, villuslarda atrofi, nekrozlu mukozayı kaplayan fibrinonekrotik bir katman, villus kalıntılarının çevresi ve Lieberkühn kriptlerinin içinde gram pozitif çubuk şeklinde bakteriler ile lamina propriada hemoraji ve yangısal hücre infiltrasyonu tespit edilmiştir. Tip A enterotoksemili sığırlarda yine ince bağırsak lümeninde hemorajik içerik birikimi ve mukozal hemoraji ile karakterize hemorajik enteritis görüldüğü bildirilmiştir (Abutarbush ve Radostits 2005, Kalender ve ark 2007). Çalışmamızdaki tip C enterotoksemili buzağı ile tip A enterotoksemili sığırdaki da literatür bulgularıyla uyumlu bağırsak lezyonları görülmüştür. Çalışmada toplam 14 buzağı ve 5 sığır enterotoksemi şüphesi ile incelenmiş olup, toksin izolasyonuna göre bunlardan sadece 1 buzağıda tip C, 1 sığırdaki tip A ve 1 sığırdaki tip D enterotoksemi tanısı doğrulanmıştır. Buradan hareketle patolojik inceleme ve toksin analizlerine göre Marmara Bölgesi'nde kuzu ve oğlaklara oranla enterotokseminin buzağılarda çok daha az görüldüğü yorumu yapılabilir. Bununla birlikte kesin kanıya varabilmek için serolojik incelemeyi de içine alan daha geniş çaplı ve çok sayıda hayvanın değerlendirileceği çalışmalara ihtiyaç vardır.

C. perfringens tip D enterotokseminin koyun ve keçilerde en yaygın görülen klostridial hastalıklardan biri olması, bu hastalığın patolojik bulgularının belirlenmesi için çok sayıda çalışma yapılmasına neden olmuştur. Diğer toksin tiplerinde görülen ve yukarıda bahsedilenlere benzer makroskobik ve mikroskobik bulgular yanında, tip D enterotoksemili hayvanlarda nörolojik ve kardiyopulmoner bulguların ön planda olduğu vurgulanmıştır (Uzal ve ark 2016). Pulmoner ödem, hidroperikardiyum, hidrotoraks, asites, meningeal hiperemi, leptomeningeal ödem ve serebellar konikleşmeden oluşan lezyonlar sıklıkla bildirilmiştir (Mete ve ark 2013, Jones ve

ark 2015, Watson ve Scholes 2015). Koyun ve sığırlarda tanımlanan fokal simetrik ensefalomalasi (FSE), özellikle subakut ve kronik tip D enterotoksemili koyunlarda bütün vakalarda görülmemesine rağmen patognomik olarak kabul edilmiştir (Uzal ve ark 2016). Epsilon toksinin dozuna ve klinik bulguların süresine bağlı olarak mikroskobik nöropatolojik değişiklikler oluşur. Beyinde kapıllar konjesyon, fokal nekroz alanları, hemoraji, perivasküler ve perinöral ödem gözlenebilir. Tip D enterotoksemili koyun vakalarının tamamında mevcut olmamasına rağmen beyinde görülen perivasküler proteinöz ödem, diagnostik bir bulgu olarak ifade edilmiştir (Uzal ve ark 2016). Tip D enterotoksemili oğlaklara ait beyin kesitlerinde yapılan incelemelerde eozinofilik ve proteinöz sıvı ile damar duvarlarının genişlediği tespit edilmiştir (Ortega ve ark 2019).

Mevcut çalışmadaki tip D enterotoksemili hayvanlarda, bahsedilen literatür bulgularıyla (Mate ve ark 2013, Jones ve ark 2015, Watson ve Scholes 2015, Uzal ve ark 2016, Ortega ve ark 2019) uyumlu olarak pulmoner ödem, subepikardiyal peteşiyel hemoraji, hidroperikardiyum, beyinde meningeal hiperemi, serebellumda konikleşme ve bağırsaklarda serozal hiperemi sıklıkla gözlenen lezyonlar olarak dikkati çekti. Meningeal hiperemi ve serebellumda konikleşme tip D enterotoksemili koyunlarda tespit edilmesine rağmen diğer hayvan türlerinde gözlenmedi. Spesifik olmamakla birlikte söz konusu dolaşım sistemi bağlantılı bu lezyonların, epsilon toksinin kapıllar damar endotelleri üzerine olan etkisinden kaynaklandığı değerlendirildi ve özellikle pulmoner ödem, hidroperikardiyum, beyinde meningeal hiperemi, ödem, serebellumda konikleşme gibi bulguların diğer enterotoksemi tiplerinden ayırt etmede kısmen de olsa bir belirteç olarak göz önünde bulundurulabileceği öngörüldü.

Koyun ve sığırlarda doğal oluşan hastalığa benzer bulgular deneysel oluşturulan tip D enterotoksemili kuzu (Uzal ve ark 2004, Giannitti ve ark 2021) oğlak (Kumar ve ark 2019) ve buzağılarda (Uzal ve ark 2002, Filho ve ark 2009) da bildirilmiştir. Kuzu ve oğlaklarda yapılan deneysel bir çalışmada (Uzal ve Kelly 1997) ise sentral sinir sistemi lezyonlarının sadece kuzularda tespit edildiği ifade edilmiştir. Çalışmamızdaki tip D enterotoksemili hayvanlarda kaydedilen kadiyopulmoner lezyonlar ile beyinde kapıllar hiperemi, ödem ve serebellar konikleşme, deneysel çalışmaların bulgularıyla da uyumlu bulunmuştur. Bu

çalışmada yaygın şekilde belirlenen kardiyopulmoner lezyonlar, araştırmacılar (Uzal ve ark 2002, Uzal ve ark 2004, Filho ve ark 2009, Kumar ve ark 2019) tarafından da vurgulanmıştır. Kardiyopulmoner lezyonlar tek başına tanı için yeterli olmasa da akut tip D enterotoksemi teşhisine yardımcı olan nispeten tutarlı postmortem değişiklikler olarak düşünüldü.

Giannitti ve ark (2014) tip D enterotoksemili kuzularda, Sarı Kuzu Hastalığı'na benzer şekilde ikterus, böbrek korteks ve medullasında diffuz koyu-kırmızı renk değişikliği, idrar kesesinde bol miktarda koyu-kırmızı renkte idrar birikimi, histopatolojik olarak böbrek tubul epitellerinde eozinofilik hiyalin damlacıkları, akciğerde alveoler ve intersitisyel proteinöz ödem, alveol lümenlerinde fibrin eksudasyonu, karaciğerde hepatositlerde sentrilobüler dejenerasyon ve nekroz tespit etmişlerdir. Tip D enterotoksemili bir koyunda belirlediğimiz ikterus, karaciğerde solgun renk ve kıvamında gevreklik, böbrekte koyu-siyah renk değişikliği, idrar kesesinde bol miktarda koyu-kırmızı renkte idrar birikimi, benzer bulguların ifade edildiği Giannitti ve ark (2014)'nın sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Tip D enterotoksemiden ölmüş taze hayvan kadavralarında "yumuşak böbrek-pulpy kidney" olarak adlandırılan böbrek kıvamının yumuşamasının gözlenmediği ifade edilmiştir (Uzal ve ark 2016). Tip D enterotokseminin isimlendirilmesinde de kullanılan bu postmortem değişiklik çalışmamızdaki tip A (3/10), tip C (1/1) ve tip D (3/8) enterotoksemili hayvanlarda farklı görülme sıklığında belirlendi. Esas olarak böbrekteki otolitik değişikliklerle ilişkilendirilen bu yumuşamanın, enterotoksemiden ölmüş hayvanlarda diğer sebeplerle ölmüş hayvanlara oranla daha hızlı gelişmiş olabileceği ve dolayısıyla üzerinden çok zaman geçmemiş ve diğer organlarında yeterince otolitik değişikliklerin şekillenmemiş olduğu hayvanlar için bu hastalığı öncelikle düşündürmesi gerektiği şeklinde yorumlanmıştır. Bununla birlikte tip D enterotoksemi için bu lezyonun tanısallığının öneminin düşük olduğu değerlendirilmiştir.

Mikroskopik incelemelerde, paraziter enteritis ile tip D enterotokseminin birlikte seyrettiğini bildiren literatürle (Uzal ve ark 1994) uyumlu olarak, bu çalışmadaki tip D enterotoksemili hayvanların 5/8'inde bağırsak epitellerinde parazitlerin farklı gelişim evreleri görüldü. Araştırmacıların (Uzal ve Kelly 1997, Uzal ve ark 2004, Uzal ve ark 2016) sonuçlarıyla uyumlu olarak çalışmamızdaki tip

D enterotoksemili kuzu ve koyunlarda hemoraji, hiperemi ve perinöral ödemden oluşan sentral sinir sistemi bulgularının daha sık görüldüğü belirlendi. Ancak çalışmadaki tip D enterotoksemili hayvanlarda perivasküler proteinöz ödem ve FSE tespit edilemedi. Hem spontan hem de deneysel çalışmalarda araştırmacılar (Uzal ve Kelly 1997, Uzal ve ark 2004, Uzal ve ark 2016, Ortega ve ark 2019) tip D enterotoksemili hayvanların tamamında ve her zaman için bu diagnostik lezyonların görülmediğini bildirmişlerdir. Ayrıca deneysel bir çalışmada (Filho ve ark 2009), 8 gün hayatta kalan bir buzağıda FSE'nin gözlemlendiği ifade edilmiştir. Çalışmamızdaki tip D enterotoksemili hayvanlarda bu karakteristik nöropatolojik değişikliklerin görülmemesi bu hayvanların muhtemelen hastalığın akut döneminde ölmüş olması ve tip D pozitif örnek sayısının düşük olması ile ilişkilendirildi.

Tip D enterotoksemide fazla miktarda toksin dolaşıma girdiğinde, ani ölümle ve ön belirti göstermeden hastalık perakut seyreder. Akut formda ise şiddetli konvülsiyonlar ardından hayvanlarda ölüm gözlemlenebilir (Uzal ve ark 2016). Daha düşük dozda epsilon toksine maruz kalan ya da kısmen bağışık olan hayvanlarda, körlük, ataksi, nistagmus ve opistotonus klinik bulgularıyla birlikte hastalığın subakut veya kronik (1-7 günlük) formu gelişebilir. Epsilon toksinin en önemli etkisi damar endotellerinde hasar oluşturması ve özellikle sentral sinir sistemi damarlarında proteinden zengin, intramural ve/veya perivasküler ödemlere neden olmasıdır. Sentral sinir sistemi dolaşımdaki yüksek epsilon toksine maruz kalsa bile, az sayıdaki damarda bu lezyonların görülebileceği bildirilmiştir (Filho ve ark 2009, Garcia ve ark 2015, Ortega ve ark 2019). Deneysel oluşturulan tip D enterotoksemilerde epsilon toksin kaynaklı sentral sinir sistemi lezyonlarının gelişmesinde, hedef hayvan türü, dolaşımdaki epsilon toksin miktarı, klinik bulgular ve ötenazi arasındaki zaman aralığının etkili olduğu ifade edilmiştir (Uzal ve Kelly 1997, Uzal ve ark 2004, Filho ve ark 2009). Ayrıca epsilon toksin verilen farelerde, tekrarlayan sub-lethal toksin dozlarının, tek bir dozdan daha geniş bir nöroanatomik bölgede lezyonlar oluşturduğu bildirilmiştir (Finnie ve ark 2020). Bu bilgiler ışığında, araştırmacılarca başta tip D enterotoksemili koyunlar olmak üzere nadiren keçi ve sığırlarda görüldüğü ifade edilen FSE, intramural ve perivasküler proteinöz ödem, çalışmamızdaki tip D enterotoksemili koyun, keçi ve sığırlarda kaydedilmemiştir. Çalışmamızdaki enterotoksemili hayvanların anamnezinden elde edilen ani ölüm bilgisinin varlığı bu lezyonların görülmemesinin nedenini açıklayabilir.

C. perfringens toksinlerinin TNT, ELISA ve PCR metotlarıyla tespitinin mümkün olmadığı durumlarda immunohistokimyasal boyama, enterotoksemi teşhisi için faydalı bir yöntemdir. Bazı hayvan türlerinde *C. perfringens* kaynaklı sindirim kanalı hastalıklarında *C. perfringens* ve toksinlerinin lezyonlu dokularda tespitine yönelik sınırlı sayıda immunohistokimyasal çalışmalar yapılmıştır.

Deneyisel yapılan çalışmalarda *C. perfringens* antijenin immunohistokimyasal yöntemle tespiti için oğlaklarda ince bağırsak ve kolonda (Garcia ve ark 2012), farelerin bağırsak mukozasında ve epitel hücrelerinde (Navarro ve ark 2018b), klostridial miyozitisli farelerin lezyonlu kas dokusunda (Navarro ve ark 2020) araştırmacılar tarafından başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Toksinlerin tespiti üzerine yapılan deneysel araştırmalarda ise Schumacher ve ark (2013) beta toksini için domuzlara ait bağırsak damar endotellerinde, Kumar ve ark (2019) epsilon toksini için tip D enterotoksemili oğlakların bağırsak villus ve kript epitelinde pozitif reaksiyonlar tespit etmişlerdir.

C. perfringens kaynaklı doğal hastalıklarda çoğunluğu vaka düzeyinde olmak üzere immunohistokimyasal çalışmalar bildirilmiştir. Atlara ait bağırsak kesitlerinde (Diab ve ark 2012), bir adet kediye ait nekrotik mide ve bağırsak mukozasında (Burn ve ark 2017), tavuklarda bağırsak kanalının lezyonlu alanlarında (Kaldhusdal ve ark 1995, França ve ark 2016) IHC ile *C. perfringens* antijenleri tespit edilmiştir. Yine tip B enterotoksemili kuzularda (Munday ve ark 2020) ve tip C enterotoksemili buzağılarda (Garcia ve ark 2013) lezyonlu bağırsak bölümlerinde *C. perfringens* antijeni için pozitif IHC reaksiyonlar belirlenmiştir. Ayrıca IHC ile toksin tespitine yönelik yapılan çalışmalarda araştırmacılar doğal oluşan *C. perfringens* kaynaklı sindirim kanalı hastalıklarında; atlarda mide, ince ve kalın bağırsaklarda beta2 toksini (Bacciarini ve ark 2003, Hazlett ve ark 2011), *C. perfringens* tip A izole edilen enteritisli bir babunun (*Papio hamadryas*) (Nikolaou ve ark 2009) bağırsak kesitlerinde beta2 toksini, domuzlarda bağırsak kanalının damar endotellerinde beta toksini (Miclard ve ark 2009), keçilerde ince ve kalın bağırsaklarda beta2 toksin (Uzal ve ark 2008), bir adet oğlağın ileum mukozasında enterotoksin (Miyakawa ve ark 2007) ve bir adet klostridial abomazitisli buzağının bağırsaklarında beta2 toksin (Nowell ve ark 2012) için pozitif reaksiyonlar gözlediklerini bildirmişlerdir.

Yukarıda aktarılan literatür bulgularına uyumlu şekilde sunulan çalışmamızda da lezyonlu abomasum, ince ve kalın bağırsak kesitlerinde anti-*C. perfringens* ile yapılan immunohistokimyasal boyamalarda enterotoksemili ruminantlarda %100 (19/19) ve *C. perfringens* toksini tespit edilemeyen enterotoksemi şüpheli olgularda ise %87,79 (115/131) oranında pozitif reaksiyon gözlemlendi. Enterotoksemili ruminantların tamamında belirlediğimiz pozitif reaksiyonlar, deneysel (Garcia ve ark 2012, Navarro ve ark 2018b) ve doğal oluşan (Kaldhusdal ve ark 1995, Diab ve ark 2012, Garcia ve ark 2013, França ve ark 2016, Burn ve ark 2017, Munday ve ark 2020) *C. perfringens* kaynaklı sindirim kanalı hastalıklarında gözlenen intralezyonel immunohistokimyasal bulgularla uyumlu bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda enterotoksemili hayvanların tümünde bağırsak lümeninde dökülmüş enterositlerde ya da mukozada enterositlere yakın ve/veya yapışık şekilde gözlediğimiz pozitif reaksiyonlar, Redondo ve ark (2015) tarafından farelerde yapılan deneysel çalışma bulguları ile de desteklenmiş gözükmektedir. Bu bakterinin normal şartlarda da bağırsaklarda bulunduğu düşünüldüğünde, IHC ile boyayarak bağırsaklarda varlığını göstermek başta çok anlamlı gözükme de, çalışmamızda özellikle lezyonlu alanlarda ve epitel üzerinde yoğun şekilde boyandığında hastalıkla ilişkili olduğu yönünde yorumlanabileceği değerlendirildi. Bu hastalığın kesin tanısı için toksin izolasyonu altın standart yöntem olarak kullanılmakla birlikte, pozitif olduğu bilinen her olguda bile toksin izolasyonu her zaman mümkün olamadığından ve ayrıca toksin araştırma imkanına her şartta ulaşamadığından, klinik ve patolojik olarak enterotoksemi şüpheli olgularda intralezyonel IHC pozitif boyanmanın, teşhis açısından anlamlı ve değerli olabileceği düşünüldü. Toksin belirlenen tüm hayvanlarda bağırsaklardaki lezyonlu bölgelerde %100 *C. perfringens* pozitif boyanma gözlenmiş olması bu düşüncenin çok da yanlış olmayacağını ortaya koymaktadır. Öte yandan toksin belirlenemeyip şüpheli kalan diğer olgularda da %87,79 oranında pozitif boyanma olması, bu olguların da aslında enterotoksemi açısından kesin negatif kabul edilemeyeceğini, toksin izolasyonundaki kısıtlara bağlı olarak toksin belirlenememiş olabileceğini ve makroskopik ve histopatolojik bulgular ışığında bunların da muhtemelen enterotoksemi bağlantılı olduğunu kuvvetle muhtemel kılmaktadır. IHC ile dokularda direkt toksin boyama ve gösterme yöntemi daha kesin bir yol olmakla birlikte çalışmamızda bu hastalığa yönelik IHC için antitoksin antikorları temin edilemediği için bu yöntem uygulanamamıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Enterotoksemi yüksek ölüm oranı, verim kaybı ve artan aşılama maliyetleri nedeniyle hayvancılık işletmelerinde önemli ekonomik kayıplara neden olur. Marmara Bölgesi, Türkiye'de endüstri ve sanayileşmede ilk sırada yer almasının yanında entansif ve ekstansif hayvancılığın yapıldığı önemli bir bölgedir. Sunulan çalışmada Marmara Bölgesi illerinden PVKE'ne gönderilen 150 adet enterotoksemi şüpheli ruminanta ait örnekler kullanılmıştır. Ülkemizde enterotoksemi ile ilgili araştırmaların çoğu farklı test teknikleri ile *C. perfringens* toksininlerinin tespiti ve bölgesel düzeyde toksin tiplerinin belirlenmesi üzerine yapılmıştır. Sunulan çalışmada ise enterotoksemi şüpheli hayvanlarda ELISA ile toksin tespiti ve tip tayini doğrulaması yanında, Türkiye'de ilk kez bu hayvanlarda klinik, makroskopik, histopatolojik ve etken düzeyinde immunohistokimyasal bulgular birlikte araştırılmış ve sonuçları karşılaştırılmıştır. Bu projede ELISA toksin testi sonuçlarına göre Marmara Bölgesi'nde farklı yaş ve türden ruminantlarda enterotoksemi %12,67 (19/150) oranında tespit edilmiştir.

Çalışmada enterotokseminin yüksek oranda genç hayvanları (%63,16) etkilediği görülmüştür. Ancak bu hastalığın yetişkin sığır ve koyunlarda da ölümlere neden olabileceği göz ardı edilmemelidir. Bu nedenle genç ve yetişkin ruminantlarda görülen diyare ve ani ölümlerin etiyolojisinde enterotoksemi ilk sırada düşünülmelidir. Genç hayvanlarda zamanında ve yeterli bağışıklığın elde edilememesi en büyük handikaptır. Özellikle yeni doğan ve henüz aşılama yaşına ulaşmamış veya yapılan aşının henüz koruyucu düzeye ulaşmadığı kuzu ve oğlaklarda, anneleri de etkin şekilde aşılama için kolostrumla yeterli antikor alınamadığında klostridial enterotoksemi büyük risk teşkil etmektedir. Yeni doğanların aşılama süreci geciktiğinde de hastalık çıkışı hızlanmakta ve sonraki aşılama süreci hastalığı önleyemediği gibi ölüm oranlarını da artırabilmektedir. Bu yüzden ruminant yetiştiricilerimizin ve kurumsal yetkililerin bu konuda tetikte olması ve aşılama yaşına ulaşan yeni doğanların bir an önce rutin aşılama programlarına alınması, başkaca bir tedavi ve korunma yöntemi bulunmayan bu hastalığın önlenmesinde büyük önem arz etmektedir.

Çalışmamızda görülen enterotoksemi vakalarının %84,21 (16/19)'ini küçük ruminantlar oluşturmuştur. Küçükbaş hayvan sayısının daha fazla olmasına paralel

beklenen bir durum olsa da bu sonuç, Marmara Bölgesi'nde enterotokseminin daha çok küçük ruminantları etkilediğini ve özellikle koyun-keçi yetiştiriciliğinde bu hastalığın çok daha fazla dikkate alınması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Sunulan çalışmadaki *C. perfringens* tiplerinin yaygınlığı ele alındığında tip A, tip C ve tip D sırasıyla 10 (%53,63), 1 (%5,26) ve 8 (%42,11) vaka olarak tespit edildi. Daha çok sayıda örnekle araştırma yapılması önerilmekle birlikte çalışmamız sonuçlarına göre Marmara Bölgesi'nde hastalığın insidansının azaltılması için özellikle *C. perfringens* tip A ve tip D'ye karşı koruyucu aşılama programlarına öncelik verilmesi gerektiği ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızdaki hayvanlarda klinik olarak enterotoksemiyle uyumlu ani ölüm ve diyare bulguları sıklıkla belirlenmiştir. Pulmoner ödem, subepikardiyal peteşiyel kanama, karaciğerde diffuz solgun renk değişikliği ve kıvamında gevreklik, mezenteriyel lenf düğümlerinde büyüme ve bağırsaklarda sulu-gazlı içerikle birlikte serozal hiperemi enterotoksemili hayvanlarda makroskopik olarak yaygın şekilde gözlenmiştir. Bu bulgular, enterotoksemi için birinci derecede araştırılması ve göz önüne alınması gereken patolojik-anatomik işaretler olarak değerlendirilmiştir.

Makroskopik olarak hemorajik enteritis ile pulmoner ödem, subepikardiyal kanama ve hidroperikardiyum gibi kardiyopulmoner lezyonların gözleendiği vakalarda bağırsak içeriğinin *C. perfringens* toksinleri yönünden değerlendirilmesi önerilir. Enterotoksemi şüpheli vakalarda postmortem muayene ölüm sonrası kokuşmaya fırsat vermeden yapılmalı, bütün organlar ve toksin tespiti için mutlaka bağırsaklar zaman geçirilmeden soğuk zincir altında laboratuvara ulaştırılmalıdır.

Bağırsakların histopatolojik incelenmesinde parazitlerin gelişim dönemleri tip D enterotoksemi vakalarında daha yüksek oranda (5/8) olsa da tüm toksin tiplerinde belirlenmiştir. Parazitlerin neden olduğu mukozal hasar nedeniyle bakteriyel etkenlerin derin katmanları etkileyebileceği ve toksinlerin emilimini kolaylaştırarak enterotoksemilere predispozisyon oluşturabileceği veya hastalığın şiddetini artırabileceği düşünüldüğünden, veteriner hekimler tarafından yetiştiricilerin paraziter ilaçlama konusunda bilinçlendirilmesi ve teşvik edilmesi önerilir.

Sunulan çalışmada temel amaçlardan biri, toksin tespitiyle doğrulanmış enterotoksemili ruminantlarda IHC boyama sonuçlarına göre *C. perfringens* varlığı ile bağırsaklarda gözlenen lezyonlar arasındaki ilişkinin araştırılması idi. Bu ilişki, bağırsak içeriklerinde ELISA ile toksinlerin tespit edilmesi ve *C. perfringens* antijenlerinin immunohistokimyasal yöntemle histopatolojik olarak lezyonlu alanlarda belirlenmesi temeline dayandırıldı. Enterotoksemili ruminantlarda abomasum ve bağırsaklarda çok sayıda intralezyonel alanlarda kümelenmiş bakteri kolonileri ile karakterize edilen histopatolojik değişiklikler görüldü. İndirekt IHC boyama metodu ile söz konusu lezyonlu bağırsak bölümlerindeki bu bakterilerin *C. perfringens* olduğu doğrulanmıştır. Toksin tespit edilemeyen hayvanlarda %87,79 (115/131), enterotoksemili hayvanlarda %100 (19/19) oranında IHC pozitif reaksiyon belirlenmiştir. Toksin tespit edilemeyen ruminantlarda pozitif reaksiyonlar lümende dökülmüş epitellerin olduğu alanlarda daha sık görülürken, enterotoksemili ruminantlarda nekrotik villus uçlarında, psödomembranlarda, lamina propria ve kriptlerde pozitif boyanmaların yoğunlaştığı belirlenmiştir.

C. perfringens'in mide ve bağırsak mukozal invazyonunun mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen, çalışmamızda lezyonlu alanlardaki IHC pozitif reaksiyonlar, *C. perfringens* ve lokal olarak üretilen toksinlerinin, enterotoksemide gözlenen makroskopik ve histopatolojik bağırsak lezyonlarının patogeneğinde önemli rol oynadığını göstermiştir. Lezyonlu bağırsak bölümlerindeki etkene yönelik pozitif IHC reaksiyonlar, toksin tespiti ile birlikte değerlendirildiğinde, *C. perfringens* kaynaklı enteritis tanısını kuvvetle desteklemiştir.

Sonuç olarak, ELISA ile toksin tespit edilen hayvanlarda gözlemlediğimiz makroskopik ve histopatolojik bulgular klostridial enterotoksemi ile uyumlu bulunmuştur. Bağırsaklarda gözlenen intralezyonel çubuk şeklindeki bakterilerin *C. perfringens* olduğu IHC ile doğrulandığı için, özellikle histopatolojik bulgular eşliğinde immunohistokimyasal incelemenin, üzerinden zaman geçmiş ve toksin tespiti yapılamayan şüpheli olgularda enterotoksemi teşhisine önemli katkı sağlayacağı söylenebilir. Enterotoksemili ruminantlarda gözlenen makroskopik ve histopatolojik bulgularda *C. perfringens*'in kesin rolünün belirlenmesi için gelecekte bu mikroorganizma ve toksinlerini de kapsayan detaylı immunohistokimyasal ve moleküler çalışmaların yapılması önerilir.

6. KAYNAKLAR

- Abutarbush SM, Radostits OM, 2005. Jejunal hemorrhage syndrome in dairy and beef cattle: 11 cases (2001 to 2003). *Can Vet J.* 46, 8,711-5.
- Ahsani M, Bafti MS, Esmailizadeh A and Mohammadabadi M, 2011. Genotyping of isolates of *Clostridium perfringens* from vaccinated and unvaccinated sheep. *Small Ruminant Research*, 95, 65-69.
- Alves GG, Machado de Ávila RA, Chávez-Olórtegui CD, Lobato FC, 2014. *Clostridium perfringens* epsilon toxin: the third most potent bacterial toxin known. *Anaerobe*, 30, 102-7.
- Arslan S, Öncel T, Malal ME, Satır E, Sait A, Ünsal Baca A, Yaman Aydoğan D, 2016. Bacteriological, virological and parasitological etiology in diarrhea cases in determined in post-mortem lambs and kids in Marmara Region. *Van Vet J*, 27,3, 147-52.
- Assie S, Douart A, Guatteo RR, Laval A, 2006. Diagnostic des entérotoxémies et mort subite des bovins. *Le Nouveau Praticien Vétérinaire. Elevages et Santé*, 2, 21-4.
- Awad MM, Ellemor DM, Boyd RL, Emmins JJ, Rood JI, 2001. Synergistic effects of alpha-toxin and perfringolysin O in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene. *Infect Immun*, 69,12,7904-10.
- Bacciarini LN, Boerlin P, Straub R, Frey J and Grone A, 2003. Immunohistochemical localization of *Clostridium perfringens* beta2-toxin in the gastrointestinal tract of horses. *Veterinary Pathology*, 40, 376-81. doi:10.1354/vp.40-4-376.
- Blackwell TE, Butler DG, Bell JA, 1983. Enterotoxemia in the goat: the humoral response and local tissue reaction following vaccination with two different bacterin-toxoids. *Can J Comp Med*, 47,2, 127-32.
- Borriello SP, Carman RJ, 1992. editors. *Clostridia in gastrointestinal disease*. Boca Raton (FL), CRC Press, 195–221.
- Bos J, Smithee L, McClane B, Distefano RF, Uzal F, Songer JG, Mallonee S, Crutcher JM, 2005. Fatal necrotizing colitis following a foodborne outbreak of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A infection. *Clin Infect Dis*, 15,40,10,78-83. doi: 10.1086/429829.
- Bosworth TJ, 1943. On a new type of toxin produced by *Clostridium welchii*. *J Comp Pathol Ther*, 53, 245–55.
- Bueschel DM, Jost BH, Billington SJ, Trinh HT, Songer JG, 2003. Prevalence of cpb2, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Vet Microbiol*, 94,2,121-129. doi:10.1016/s0378-1135(03)00081-6.
- Bull CG, Pritchett IW, 1917. Toxin and antitoxin of and protective inoculation against *Bacillus welchii*. *J Exp Med*, 1, 26, 1, 119-38. doi: 10.1084/jem.26.1.119.
- Burgstaller J, Wittek T, Smith GW, 2017. Invited review: Abomasal emptying in calves and its potential influence on gastrointestinal disease. *J Dairy Sci*, 100, 1, 17-35. doi: 10.3168/jds.2016-10949.
- Burn J, Rousset N, Henderson DW, Legge C, Uzal FA, 2017. Emphysematous gastritis associated with *Clostridium perfringens* type A in a cat. *Vet Rec Case Rep*, 5, e000540. doi:10.1136/vetreccr-2017-000540.
- Chassin C, Bens M, de Barry J, Courjaret R, Bossu JL, Cluzeaud F, Ben Mkaddem S, Gibert M, Poulain B, Popoff MR, Vandewalle A, 2007. Pore-forming epsilon toxin causes membrane permeabilization and rapid ATP depletion-mediated cell death in renal collecting duct cells. *American journal of physiology. Renal physiology*, 293,3, 927–37. doi:10.1152/ajprenal.00199.2007
- Chitayat S, Adams JJ, Furness HS, Bayer EA, Smith SP, 2008. The solution structure of the C-terminal modular pair from *Clostridium perfringens* mu-toxin reveals a noncellulosomal dockerin module. *J Mol Biol*, 19, 381, 5, 1202-12. doi: 10.1016/j.jmb.2008.06.050.

- Clarkson MJ, Faull WB, Kerry JB, 1985. Vaccination of cows with clostridial antigens and passive transfer of clostridial antibodies from bovine colostrum to lambs. *Vet Rec*, 116, 17, 467-69. doi:10.1136/vr.116.17.467
- Deguchi A, Miyamoto K, Kuwahara T, Miki Y, Kaneko I, Li J, McClane BA, Akimoto S, 2009. Genetic characterization of type A enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains. *PLoS One*. 19, 4, 5, e5598. doi: 10.1371/journal.pone.0005598.
- Dennison AC, VanMetre DC, Callan RJ, Dinsmore P, Mason GL, Ellis RP, 2002. Hemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle: 22 cases (1997-2000). *J Am Vet Med Assoc*, 1, 221, 5, 686-9. doi: 10.2460/javma.2002.221.686.
- Diab SS, Kinde H, Moore J, Shahriar MF, Odani J, Anthenill L, Songer G, Uzal FA, 2012. Pathology of *Clostridium perfringens* type C enterotoxemia in horses. *Vet Pathol*, 49, 2, 255-63. doi: 10.1177/0300985811404710.
- Diab SS, 2016. Diseases produced by *Clostridium perfringens* type C. In: Uzal FA, Songer G, Prescott JF, et al, editors. In: *Clostridial Diseases of Animals*. Willy and Blackwell, 143–55.
- Dray T, 2004. *Clostridium perfringens* type A and beta2 toxin associated with enterotoxemia in a 5-week-old goat. *Can Vet J*, 45, 3, 251-3.
- Dupré M, Gilquin B, Fenaille F, Feraudet Tarisse C, Dano J, Ferro M, Simon S, Junot C, Brun V, Becher F, 2015. Multiplex quantification of protein toxins in human biofluids and food matrices using immunoextraction and high-resolution targeted mass spectrometry. *Anal Chem*, 18, 87, 16, 8473-80. doi: 10.1021/acs.analchem.5b01900.
- Duracova M, Klimentova J, Fucikova A, Dresler J, 2018. Proteomic methods of detection and quantification of protein toxins. *Toxins (Basel)*, 28, 10, 3, 99. doi: 10.3390/toxins10030099.
- El Idrissi AH, Ward GE, 1992. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Clostridium perfringens* enterotoxemias. *Vet. Microbiol*, 31, 4, 389-96.
- Eröksüz Y, Otlu B, Çalıcıoğlu M, Eröksüz H, Akdeniz İncili C, Karabulut B, Abaylı H, 2018. Enterotoxemia caused by *Clostridium perfringens* type E in a calf. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24, 6, 905-8.
- Ewaschuk JB, Naylor JM, Chirino-Trejo M, Zello GA, 2004. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG is a potential probiotic for calves. *Can J Vet Res*, 68,4, 249-53.
- Fayez MM, Al Musallam A, Al Marzoog A and Suleiman MB, 2013. Prevalence and toxinotyping of the toxigenic *Clostridium perfringens* in sheep with suspected enterotoxemia. *Nat Sci*, 11, 8, 15-21.
- Ferrarezi MC, Curci VC, Cardoso TC, 2013. Cellular vacuolation and mitochondrial-associated factors induced by *Clostridium perfringens* epsilon toxin detected using acoustic flow cytometry. *Anaerobe*, 24, 55-9. doi:10.1016/j.anaerobe.2013.09.009
- Filho EJ, Carvalho AU, Assis RA, Lobato FF, Rachid MA, Carvalho AA, Ferreira PM, Nascimento RA, Fernandes AA, Vidal JE, Uzal FA, 2009. Clinicopathologic features of experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in cattle. *Vet Pathol*, 46, 6, 1213-20. doi: 10.1354/vp.08-VP-0304-U-FL.
- Finnie JW, Navarro MA, Uzal FA, 2020. Pathogenesis and diagnostic features of brain and ophthalmic damage produced by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 32, 2, 282–6. doi:10.1177/1040638719900190.
- Fisher DJ, Miyamoto K, Harrison B, Akimoto S, Sarker MR, McClane BA, 2005. Association of beta2 toxin production with *Clostridium perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. *Mol Microbiol*, 56, 3, 747-62. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04573.x.
- Fisher DJ, Fernandez-Miyakawa ME, Sayeed S, Poon R, Adams V, Rood JI, Uzal FA, McClane BA, 2006. Dissecting the contributions of *Clostridium perfringens* type C toxins to lethality in the mouse intravenous injection model. *Infect Immun*, 74, 9, 5200-10. doi: 10.1128/IAI.00534-06.

- França M, Barrios MA, Stabler L, Zavala G, Shivaprasad HL, Lee MD, Villegas AM, Uzal FA, 2016. Association of beta2-positive *Clostridium perfringens* type A with focal duodenal necrosis in egg-laying chickens in the United States. *Avian Dis*, 60, 1, 43-9. doi: 10.1637/11263-081915-Reg.1.
- Freedman JC, McClane BA, Uzal FA, 2016. New insights into *Clostridium perfringens* epsilon toxin activation and action on the brain during enterotoxemia. *Anaerobe*, 41, 27-31. doi:10.1016/j.anaerobe.2016.06.006.
- Gao J, Xin W, Huang J, Ji B, Gao S, Chen L, Kang L, Yang H, Shen X, Zhao B, Wang J, 2018. Hemolysis in human erythrocytes by *Clostridium perfringens* epsilon toxin requires activation of P2 receptors. *Virulence*, 9, 1, 1601-14. doi:10.1080/21505594.2018.1528842.
- Garcia JP, Beingesser J, Fisher DJ, Sayeed S, McClane BA, Posthaus H, Uzal FA, 2012. The effect of *Clostridium perfringens* type C strain CN3685 and its isogenic beta toxin null mutant in goats. *Vet Microbiol*, 15, 157,3-4, 412-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.01.005.
- Garcia JP, Anderson M, Blanchard P, Mete A, Uzal FA, 2013. The pathology of enterotoxemia by *Clostridium perfringens* type C in calves. *J Vet Diagn Invest*, 25, 3, 438-42. doi: 10.1177/1040638713483467.
- Garcia JP, Li J, Shrestha A, Freedman JC, Beingesser J, McClane BA, Uzal FA, 2014. *Clostridium perfringens* type A enterotoxin damages the rabbit colon. *Infection and immunity*, 82, 6, 2211–18. <https://doi.org/10.1128/IAI.01659-14>.
- Garcia JP, Giannitti F, Finnie JW, Manavis J, Beingesser J, Adams V, Rood JI, Uzal FA, 2015. Comparative neuropathology of ovine enterotoxemia produced by *Clostridium perfringens* type D wild-type strain CN1020 and its genetically modified derivatives. *Vet Pathol*, 52, 3, 465-75. doi: 10.1177/0300985814540543.
- Giannitti F, Rioseco MM, García JP, Beingesser J, Woods LW, Puschner B, Uzal FA, 2014. Diagnostic exercise: hemolysis and sudden death in lambs. *Veterinary pathology*, 51, 3, 624–7. <https://doi.org/10.1177/0300985813501339>.
- Giannitti F, García JP, Rood JI, Adams V, Armendano JI, Beingesser J, Uzal FA, 2021. Cardiopulmonary lesions in sheep produced by experimental acute *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia. *Veterinary pathology*, 58, 1, 103–13. doi:10.1177/0300985820965554.
- Girish KS, Kemparaju K, 2007. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci*, 1, 80, 21, 1921-43. doi: 10.1016/j.lfs.2007.02.037.
- Gkiourtzidis K, Frey J, Bourtzi-Hatzopoulou E, Iliadis N, Sarris K, 2001. PCR detection and prevalence of alpha-, beta-, beta 2-, epsilon-, iota- and enterotoxin genes in *Clostridium perfringens* isolated from lambs with clostridial dysentery. *Vet Microbiol*, 3, 82, 1, 39-43. doi: 10.1016/s0378-1135(01)00327-3.
- Glenny AT, Barr M, Llewellyn-Jones M, Dalling T and Ross HE, 1933. Multiple toxins produced by some organisms of the *Cl. welchii* group. *J Pathol*, 37:53–74.
- Goldstein J, Morris WE, Loidl CF, Tironi-Farinati C, McClane BA, Uzal FA and Fernandez Miyakawa ME, 2009. *Clostridium perfringens* epsilon toxin increases the small intestinal permeability in mice and rats. *PloS one*, 4,9, e7065. doi:10.1371/journal.pone.0007065.
- Goossens E, Valgaeren BR, Pardon B, Haesebrouck F, Ducatelle R, Deprez PR, Van Immerseel F, 2017. Rethinking the role of alpha toxin in *Clostridium perfringens*-associated enteric diseases: a review on bovine necro-haemorrhagic enteritis. *Vet Res*, 16, 48, 1, 9. doi: 10.1186/s13567-017-0413-x.
- Gökçe HI, Genç O, Sözmen M and Gökçe G, 2007. Determination of *Clostridium perfringens* toxintypes in sheep with suspected enterotoxemia in Kars Province, Turkey. *Turk. J. Vet. Anim. Sci*, 31,5, 355-60.
- Gökçe E, Ünver A, Erdoğan HM, 2010. İshalli neonatal kuzularda enterik patojenlerin belirlenmesi *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16, 717-22.

- Granum PE, Whitaker JR, Skjelkvåle R, 1981. Trypsin activation of enterotoxin from *Clostridium perfringens* type A: fragmentation and some physicochemical properties. *Biochim Biophys Acta*, May 29;668(3):325-32. doi: 10.1016/0005-2795(81)90165-3.
- Greco G, Madio A, Buonavoglia D, Totaro M, Corrente M, Martella V and Buonavoglia C, 2005. *Clostridium perfringens* toxin-types in lambs and kids affected with gastroenteric pathologies in Italy. *Vet. J*, 170, 3, 346-50.
- Gui L, Subramony C, Fratkin J, Hughson MD, 2002. Fatal enteritis necroticans (pigbel) in a diabetic adult. *Mod Pathol*, 15, 1, 66-70. doi: 10.1038/modpathol.3880491.
- Guo S, Liu D, Zhang B, Li Z, Li Y, Ding B, Guo Y, 2017. Two *Lactobacillus* species inhibit the growth and α -toxin production of *Clostridium perfringens* and induced proinflammatory factors in chicken intestinal epithelial cells in vitro. *Front Microbiol*, 25, 8, 2081, doi: 10.3389/fmicb.2017.02081.
- Guttenberg G, Hornei S, Jank T, Schwan C, Lü W, Einsle O, Papatheodorou P, Aktories K, 2012. Molecular characteristics of *Clostridium perfringens* TpeL toxin and consequences of mono-O-GlcNAcylation of Ras in living cells. *The Journal of biological chemistry*, 287,30, 24929–40. doi:10.1074/jbc.M112.347773.
- Hadimli HH, Erganiş O, Sayın Z and Aras Z, 2012. Toxinotyping of *Clostridium perfringens* isolates by ELISA and PCR from lambs suspected of enterotoxemia. *Turk J Anim Sci*, 36, 4, 409-15.
- Harkness JM, Li J & McClane BA, 2012. Identification of a lambda toxin-negative *Clostridium perfringens* strain that processes and activates epsilon prototoxin intracellularly. *Anaerobe*, 18, 5, 546–52. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.09.001>.
- Hassan KA, Elbourne LD, Tetu SG, Melville SB, Rood JJ, Paulsen IT, 2015. Genomic analyses of *Clostridium perfringens* isolates from five toxinotypes. *Res Microbiol*, 166, 255–63.
- Hassanein KMA, Sayed MM, Hassan AM, 2017. Pathological and biochemical studies on enterotoxemia in sheep. *Comp Clin Pathol*, 26, 513–8. <https://doi.org/10.1007/s00580-017-2407-5>.
- Hazlett MJ, Kircanski J, Slavic D, Prescott JF, 2011. Beta 2 toxigenic *Clostridium perfringens* type A colitis in a three day old foal. *J Vet Diagn Invest*, 23, 2, 373-6. doi: 10.1177/104063871102300232.
- Hunter SE, Brown JE, Oyston PC, Sakurai J, Titball RW, 1993. Molecular genetic analysis of beta-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 61, 9, 3958-65. doi: 10.1128/iai.61.9.3958-3965.1993.
- Hussain K, Ijaz M, Durrani AZ, Anjum AA, Farooqui SH, Aqib AI, Ahmad AS, 2018. Molecular typing of *Clostridium perfringens* toxins (α , β , ϵ , ι) and type 'A' multidrug resistance profile in diarrheic goats. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 24, 2, 251-5. doi:10.9775/kvfd.2017.18774.
- Hynes WL, Walton SL, 2000. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 15, 183, 2, 201-7. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb08958.x.
- Ivie SE, Fennessey CM, Sheng J, Rubin DH, McClain MS, 2011. Gene-trap mutagenesis identifies mammalian genes contributing to intoxication by *Clostridium perfringens* ϵ -toxin. *PLoS One*, 6, 3, e17787. doi:10.1371/journal.pone.0017787.
- Jewell SA, Titball RW, Huyet J, Naylor CE, Basak AK, Gologan P, Winlove CP, Petrov PG, 2015. *Clostridium perfringens* α -toxin interaction with red cells and model membranes. *Soft Matter*, 21, 11, 39, 7748-61. doi: 10.1039/c5sm00876j.
- Johansson A, Aspan A, Bagge E, Båverud V, Engström BE, Johansson KE, 2006. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge. *BMC microbiology*, 6, 47. doi:10.1186/1471-2180-6-47.
- Jones AL, Dagleish MP, Caldow GL, 2015. *Clostridium perfringens* type-D enterotoxaemia in cattle: the diagnostic significance of intestinal epsilon toxin. *The Veterinary record*, 177, 15, 390. doi:10.1136/vr.103097.

- Kaldhusdal M, Evensen O, Landsverk T, 1995. *Clostridium perfringens* necrotizing enteritis of the fowl: a light microscopic, immunohistochemical and ultrastructural study of spontaneous disease. *Avian Pathol*, 24, 3, 421-33. doi: 10.1080/03079459508419082.
- Kalender H, Ertas HB, Cetinkaya B, Muz A, Arslan N and Kilic A, 2005. Typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased sheep by multiplex PCR. *Vet Med Czech*, 50, 10, 439-42.
- Kalender H, Kılıç A, Atıl E, 2007. Enterotoxemia in a cow due to *Clostridium perfringens* type A. *Turk J Vet Anim Sci*, 31, 1, 83-4.
- Kamaras J, Murrell WG, 2001. The effect of bacterial enterotoxins implicated in SIDS on the rabbit intestine. *Pathology*, 33, 2, 187-96. doi: 10.1080/00313020120038692.
- Keyburn AL, Boyce JD, Vaz P, Bannam TL, Ford ME, Parker D, Di Rubbo A, Rood JI, Moore RJ, 2008. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog*, 4, 2, e26. doi:10.1371/journal.ppat.0040026.
- Kim HY, Byun JW, Roh IS, Bae YC, Lee MH, Kim B, Songer JG, Jung BY, 2013. First isolation of *Clostridium perfringens* type E from a goat with diarrhea. *Anaerobe*, 22, 141-3. doi:10.1016/j.anaerobe.2013.06.009.
- Kiu R, Hall LJ, 2018. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerging microbes & infections*, 7, 1, 141. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0144-8>
- Koç R, Gökçe Hİ, 2007. Determination of the toxins and biotypes of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic calves in the kars district of Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 31, 3, 207-211.
- Kumar R, Kumaresan G, Pawaiya R, Mishra A, Chaturvedi V, Varshney M, Andani D, Jena D, Sharma A, Gangwar N, Singh R, 2019. Pathology of experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxaemia in goats. *Indian J Vet Pathol*, 43, 2, 94-103, doi:10.5958/0973-970X.2019.00019.1
- Lawrence G, Cooke R, 1980. Experimental pigbel: the production and pathology of necrotizing enteritis due to *Clostridium welchii* type C in the guinea-pig. *Br J Exp Pathol*, 61, 3, 261-71.
- Lebrun M, Mainil FG, Linden A, 2010. Cattle enterotoxaemia and *Clostridium perfringens*: description, diagnosis and prophylaxis. *Veterinary Record*, 167, 13-22.
- Li J, Miyamoto K, Sayeed S, McClane BA, 2010. Organization of the cpe locus in CPE-positive *Clostridium perfringens* type C and D isolates. *PloS one*, 5, 6, e10932. doi:10.1371/journal.pone.0010932.
- Li J, McClane BA, 2014. Contributions of NanI sialidase to Caco-2 cell adherence by *Clostridium perfringens* type A and C strains causing human intestinal disease. *Infect Immun*. 2014 Nov;82(11):4620-30. doi: 10.1128/IAI.02322-14.
- Li J, Freedman JC, Evans DR, McClane BA, 2017. CodY promotes sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A strain SM101. *Infect Immun*. 85, 3, e00855-16. doi:10.1128/IAI.00855-16.
- Lonchamp E, Dupont JL, Wioland L, Courjaret R, Mbebi-Liegeois C, Jover E, Doussau F, Popoff MR, Bossu JL, de Barry J, Poulain B, 2010. *Clostridium perfringens* epsilon toxin targets granule cells in the mouse cerebellum and stimulates glutamate release. *PloS one*, 5, 9, e13046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013046>.
- Lucey BP, Hutchins GM, 2004. William H. Welch, MD and the discovery of *Bacillus welchii*. *Arc Pathol Lab Med*, 128, 1193-5. doi: 10.5858/2004-128-1193-WHWMAT.
- Luna LG, 1968. Routine harris hematoxylin and eosin stain. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, ed 3, 38-9.
- Manich M, Knapp O, Gibert M, Maier E, Jolivet Reynaud C, Geny B, Benz R, Popoff MR, 2008. *Clostridium perfringens* delta toxin is sequence related to beta toxin, NetB, and Staphylococcus pore-forming toxins, but shows functional differences. *PLoS one*, 3, 11, e3764. doi:10.1371/journal.pone.0003764.

- Manteca C, Daube G, Jauniaux T, Limbourg B, Kaeckenbeeck A, Mainil JG, 2000. Study of bovine enterotoxaemia in Belgium. II. Epizootiology, clinical signs and pathology. *Annales De Medecine Veterinaire*, 144, 75-82.
- Manteca C, Daube G, Pirson V, Limbourg B, Kaeckenbeeck A, Mainil JG, 2001. Bacterial intestinal flora associated with enterotoxaemia in Belgian blue calves. *Veterinary Microbiology* 81,21-32.
- Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D, 2013. Chapter 16 *Clostridium* species. In: *Clinical Veterinary Microbiology* (2nd Edition), Mosby Elsevier, St.Louis, 215-37.
- Martin PK, Naylor RD, 1999. A Latex agglutination test for the qualitative detection of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *Res Vet Sci*, 56, 259-61.
- Matsushita O, Yoshihara K, Katayama S, Minami J, Okabe A, 1994. Purification and characterization of *Clostridium perfringens* 120-kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene. *J Bacteriol*, 176, 1, 149-56. doi:10.1128/jb.176.1.149-156.1994.
- McClane BA, Robertson SL, Li J, 2013. *Clostridium perfringens*. In: Doyle MP, Buchanan RL, editors. In: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 4th ed. ASM press: Washington D.C. 465–89.
- Mehdizadeh Gohari I, Parreira VR, Nowell VJ, Nicholson VM, Oliphant K, Prescott JF, 2015. A novel pore-forming toxin in type A *Clostridium perfringens* is associated with both fatal canine hemorrhagic gastroenteritis and fatal foal necrotizing enterocolitis. *PLoS One*, 10, 4, e0122684. doi:10.1371/journal.pone.0122684.
- Mete A, Garcia J, Ortega J, Lane M, Scholes S, Uzal FA, 2013. Brain lesions associated with *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in a holstein heifer calf. *Veterinary pathology*, 50, 5, 765–8. <https://doi.org/10.1177/0300985813476058>.
- Miclard J, Jäggi M, Sutter E, Wyder M, Grabscheid B, Posthaus H, 2009. *Clostridium perfringens* beta-toxin targets endothelial cells in necrotizing enteritis in piglets. *Vet Microbiol*, 12, 137, 320-5. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.025.
- Miserez R, Frey J, Buogo C, Capaul S, Tontis A, Burnens A, Nicolet J, 1998. Detection of alpha- and epsilon-toxigenic *Clostridium perfringens* type D in sheep and goats using a DNA amplification technique (PCR). *Lett Appl Microbiol*, 26(5):382-6. doi:10.1046/j.1472-765x.1998.00356.x
- Miyakawa ME, Saputo J, Leger JS, Puschner B, Fisher DJ, McClane BA, Uzal FA, 2007. Necrotizing enterocolitis and death in a goat kid associated with enterotoxin (CPE)-producing *Clostridium perfringens* type A. *Can Vet J*, 48, 12, 1266-9.
- Miyamoto K, Fisher DJ, Li J, Sayeed S, Akimoto S, McClane BA, 2006. Complete sequencing and diversity analysis of the enterotoxin-encoding plasmids in *Clostridium perfringens* type A non-food-borne human gastrointestinal disease isolates. *J Bacteriol*, 188, 4, 1585-98. doi: 10.1128/JB.188.4.1585-1598.2006.
- Montagne L, Toullec R, Formal M, Lallès JP, 2000. Influence of dietary protein level and origin on the flow of mucin along the small intestine of the preruminant calf. *J Dairy Sci*, 83, 12, 2820-8. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)75181-2.
- Morris WE, Venzano AJ, Elizondo A, Vilte DA, Mercado EC, Fernandez-Miyakawa ME, 2011. Necrotic enteritis in young calves. *J Vet Diagn Invest*. 23, 2, 254-9. doi:10.1177/104063871102300209.
- Morris WE, Dunleavy MV, Diodati J, Berra G, Fernandez-Miyakawa ME, 2012. Effects of *Clostridium perfringens* alpha and epsilon toxins in the bovine gut. *Anaerobe*. 18, 1, 143-7. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.12.003.
- Munday JS, Bentall H, Aberdein D, Navarro M, Uzal FA, Brown S, 2020. Death of a neonatal lamb due to *Clostridium perfringens* type B in New Zealand. *N Z Vet J*. 68, 4, 242-6. doi: 10.1080/00480169.2019.1706660.
- Murrel TGC, 1983. Pigbel in Papua New Guinea: an ancient disease rediscovered. *Int. J. Epidemiol*. 12, 211–4.

- Nagahama M, Hayashi S, Morimitsu S, Sakurai J, 2003. Biological activities and pore formation of *Clostridium perfringens* beta toxin in HL 60 cells. J Biol Chem. 19, 278, 38, 36934-41. doi: 10.1074/jbc.M306562200.
- Nagahama M, Shibutani M, Seike S, Yonezaki M, Takagishi T, Oda M, Kobayashi K, Sakurai J, 2013. The p38 MAPK and JNK pathways protect host cells against *Clostridium perfringens* beta-toxin. Infect Immun. 81, 10, 3703-8. doi: 10.1128/IAI.00579-13.
- Nagahama M, Ochi S, Oda M, Miyamoto K, Takehara M, Kobayashi K, 2015. Recent insights into *Clostridium perfringens* beta-toxin. Toxins (Basel). 3, 7, 2, 396-406. doi: 10.3390/toxins7020396.
- Navarro MA, McClane BA, Uzal FA, 2018a. Mechanisms of action and cell death associated with *Clostridium perfringens* toxins. Toxins (Basel). 10, 212, 1-21. doi: 10.3390/toxins10050212.
- Navarro MA, Li J, McClane BA, Morrell E, Beingesser J, Uzal FA, 2018b. NanI Sialidase Is an Important Contributor to *Clostridium perfringens* Type F Strain F4969 Intestinal Colonization in Mice. Infect Immun. Nov 20;86(12):e00462-18. doi: 10.1128/IAI.00462-18.
- Navarro MA, Li J, Beingesser J, McClane BA, Uzal FA, 2020. The Agr-Like Quorum-Sensing System Is Important for *Clostridium perfringens* type A strain ATCC 3624 To Cause Gas Gangrene in a Mouse Model. mSphere. 17, 5, 3, e00500-20. doi:10.1128/mSphere.00500-20.
- Naylor RD, Martin PK, Barker LT, 1997. Detection of *Clostridium perfringens* alpha toxin by enzyme-linked immunosorbent assay. Res Vet Sci. 63, 1, 101-2. doi: 10.1016/s0034-5288(97)90168-5.
- Nazki S, Wani SA, Parveen R, Ahangar SA, Kashoo ZA, Hamid S, Dar ZA, Dar TA, Dar PA, 2017. Isolation, molecular characterization and prevalence of *Clostridium perfringens* in sheep and goats of Kashmir Himalayas, India. Veterinary World, 10, 12, 1501-7. doi: 10.14202/vetworld.2017.1501-1507.
- Nikolaou GN, Kik MJ, Van Asten AJ, Gröne A, 2009. Beta-2 toxin of *Clostridium perfringens* in a hamadryas baboon (*Papio hamadryas*) with enteritis. J Zoo Wildl Med. 40, 4, 806-8. doi:10.1638/2008-0081.1.
- Nowell VJ, Kropinski AM, Songer JG, MacInnes JJ, Parreira VR, Prescott JF, 2012. Genome sequencing and analysis of a type A *Clostridium perfringens* isolate from a case of bovine clostridial abomasitis. doi:10.1371/journal.pone.0032271.
- O'Brien DK, Melville SB, 2004. Effects of *Clostridium perfringens* alpha-toxin (PLC) and perfringolysin O (PFO) on cytotoxicity to macrophages, on escape from the phagosomes of macrophages, and on persistence of *C. perfringens* in host tissues. Infect Immun. 72, 9, 5204-15. doi:10.1128/IAI.72.9.5204-5215.2004.
- Olkowski AA, Wojnarowicz C, Chirino-Trejo M, Laarveld B & Sawicki G, 2008. Sub-clinical necrotic enteritis in broiler chickens: novel etiological consideration based on ultra-structural and molecular changes in the intestinal tissue. Research in veterinary science, 85, 3, 543-53. doi:10.1016/j.rvsc.2008.02.007
- Ortega J, Verdes JM, Morrell EL, Finnie JW, Manavis J, Uzal FA, 2019. Intramural vascular edema in the brain of goats with *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia. Vet Pathol. 56, 3, 452-9. doi: 10.1177/0300985818817071.
- Özcan C ve Gürçay M, 2000. Elazığ ve çevresinde 1994-1998 yılları arasında küçük ruminantlarda enterotoksemi insidensi. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 24, 3, 283-6.
- Pawaiya RS, Gururaj K, Gangwar NK, Singh DD, Kumar R and Kumar A, 2020. The challenges of diagnosis and control of enterotoxaemia caused by *Clostridium perfringens* in small ruminants. Advances in Microbiology, 10, 238-73. doi:10.4236/aim.2020.105019.
- Petit L, Maier E, Gibert M, Popoff MR and Benz R, 2001. *Clostridium perfringens* epsilon toxin induces a rapid change of cell membrane permeability to ions and forms channels in artificial lipid bilayers. The Journal of Biological Chemistry, 276, 19, 15736-40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010412200>.
- Philippeau C, Goncalves S, Jullian V, 2003. Diagnostic bacteriologique des enterotoxemies. Point Ve, 34, 237, 12-13.

- Popoff MR, 1998. Interactions between bacterial toxins and intestinal cells. *Toxicon* 36, 665-85.
- Popoff MR, 2011. Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin. *The FEBS Journal*, 278, 23, 4602–15. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08145.x.
- Popoff MR, 2014. Clostridial pore-forming toxins: powerful virulence factors. *Anaerobe*.30, 220-38. doi:10.1016/j.anaerobe.2014.05.014.
- Prescott JF, Parreira VR, Mehdizadeh Gohari I, Lepp D, Gong J, 2016. The pathogenesis of necrotic enteritis in chickens: what we know and what we need to know: a review. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.*, 45, 3, 288–94. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1139688>.
- Redondo LM, Carrasco JM, Redondo EA, Delgado F, Miyakawa ME, 2015. *Clostridium perfringens* type E virulence traits involved in gut colonization. *PloS one*, 10, 3, e0121305. doi:10.1371/journal.pone.0121305.
- Rehman H, Ijaz A, Specht A, Dill D, Hellweg P, Männer K, Zentek J, 2009. In vitro effects of alpha toxin from *Clostridium perfringens* on the electrophysiological parameters of jejunal tissues from laying hens preincubated with inulin and N-acetyl-L-cysteine. *Poult Sci.* 88, 1, 199-204. doi: 10.3382/ps.2008-00054.
- Revitt-Mills SA, Rood JI and Adams V, 2015. *Clostridium perfringens* extracellular toxins and enzymes: 20 and counting. *Microbiology Australia*, 36, 114-7.
- Rings DM, 2004. Clostridial disease associated with neurologic signs: tetanus, botulism, and enterotoxemia. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*20, 2, 379-91, doi: 10.1016/j.cvfa.2004.02.006.
- Robertson SL, Li J, Uzal FA, McClane BA, 2011. Evidence for a prepore stage in the action of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *PLoS One*.6, 7, e22053. doi:10.1371/journal.pone.0022053.
- Rood JI, Keyburn AL, Moore RJ, 2016. NetB and necrotic enteritis: the hole movable story. *Avian Pathology: Journal of The W.V.P.A.*, 45, 3, 295–301. doi:10.1080/03079457.2016.1158781.
- Rood JI, Adams V, Lacey J, Lyras D, McClane BA, Melville SB, Moore RJ, Popoff MR, Sarker MR, Songer JG, Uzal FA, Van Immerseel F, 2018. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe*.53, 5-10. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.04.011.
- Rosadio R, Londoño P, Pérez D, Castillo H, Véliz A, Llanco L, Yaya K, Maturrano L, 2010. *Eimeria macusaniensis* associated lesions in neonate alpacas dying from enterotoxemia. *Vet Parasitol.* 26, 168, 1-2, 116-20. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.10.010.
- Sakurai J, Nagahama M, Oda M, Tsuge H & Kobayashi K, 2009. *Clostridium perfringens* iota-toxin: structure and function. *Toxins*, 1, 2, 208–28. <https://doi.org/10.3390/toxins1020208>.
- Savic B, Prodanovic R, Ivetic V, Radanovic O, Bojkovski J, 2012. Enteritis associated with *Clostridium perfringens* type A in 9-month-old calves. *Can Vet J*.53, 2, 174-6.
- Savva CG, Fernandes da Costa SP, Bokori-Brown M, Naylor CE, Cole AR, Moss DS, Titball RW & Basak AK, 2013. Molecular architecture and functional analysis of NetB, a pore-forming toxin from *Clostridium perfringens*. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 5, 3512–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.430223>.
- Sayeed S, Uzal FA, Fisher DJ, Saputo J, Vidal JE, Chen Y, Gupta P, Rood JI, McClane BA, 2008. Beta toxin is essential for the intestinal virulence of *Clostridium perfringens* type C disease isolate CN3685 in a rabbit ileal loop model. *Mol Microbiol*.67, 1, 15-30. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.06007.x.
- Schlegel BJ, Nowell VJ, Parreira VR, Soltes G, Prescott JF, 2012. Toxin-associated and other genes in *Clostridium perfringens* type A isolates from bovine clostridial abomasitis (BCA) and jejunal hemorrhage syndrome (JHS). *Can J Vet Res*.76, 4, 248-54.
- Schumacher VL, Martel A, Pasmans F, Van Immerseel F, Posthaus H, 2013. Endothelial binding of beta toxin to small intestinal mucosal endothelial cells in early stages of experimentally induced *Clostridium perfringens* type C enteritis in pigs. *Vet Pathol.* 50, 4, 626-9. doi: 10.1177/0300985812461362.

- Seike S, Takehara M, Kobayashi K, Nagahama M, 2019. *Clostridium perfringens* delta-toxin damages the mouse small intestine. *Toxins* (Basel).11, 4, 232. doi:10.3390/toxins11040232
- Seyer A, Fenaille F, Féraudet-Tarisse C, Volland H, Popoff MR, Tabet JC, Junot C, Becher F, 2012. Rapid quantification of clostridial epsilon toxin in complex food and biological matrixes by immunopurification and ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 84, 11, 5103-9. doi: 10.1021/ac300880x.
- Seyitoğlu S, Cengiz S, Altun SK, Küçükkalem OF, Sözdutalmaz I, 2012. Investigation of *Clostridium perfringens* toxins in sheep in the region of Erzurum by toxin neutralization, ELISA and latex agglutination tests. *J. Etlik Vet. Microbiol.* 23, 39-43.
- Shindo Y, Dobashi Y, Sakai T, Monma C, Miyatani H, Yoshida Y, 2015. Epidemiological and pathobiological profiles of *Clostridium perfringens* infections: review of consecutive series of 33 cases over a 13-year period. *Int J Clin Exp Pathol.* 8, 1, 569-77.
- Silva ROS, Uzal FA, Oliveira CA, Lobato FCF, 2016. Gas gangrene (malignant edema). In *Clostridial Diseases of Animals*; Uzal FA, Songer JG, Prescott JF, Popoff MR, Eds.; Wiley Blackwell: Ames, IA, USA, 243–54.
- Simpson KM, Callan RJ, Van Metre DC, 2018. Clostridial abomasitis and enteritis in ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*34, 1, 155-84. doi: 10.1016/j.cvfa.2017.10.010.
- Singh DD, Pawaiya RVS, Gururaj K, Gangwar NK, Mishra AK, Singh R, Pathak A, Andani D, Gautam TK, Kumar A, 2017. Pathological studies on spontaneous cases of enterotoxaemia in goat kids at organized and unorganized farms. *Indian J. Vet. Pathol.*, 41, 4, 245-50.
- Songer JG, 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev.* 9, 216–34.
- Songer JG, 2016. Infections by *Clostridium perfringens* type E. In *Clostridial Diseases of Animals*; Uzal FA, Songer JG, Prescott JF, Popoff MR, Eds.; Wiley Blackwell: Ames, IA, USA, 173–6.
- Sorg JA and Sonenshein AL, 2008. Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores. *J Bacteriol.* 190, 7, 2505-12. doi: 10.1128/JB.01765-07.
- Stevens DL, Aldape MJ, Bryant AE, 2012. Life-threatening clostridial infections. *Anaerobe.*18, 2, 254-9. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.11.001.
- Stiles BG, Barth G, Holger B, Popoff MR, 2013. *Clostridium perfringens* E Toxin: A malevolent molecule for animals and man. *Toxins*, 5, 2138-60.
- Thiede S, Goethe R, Amtsberg G, 2001. Prevalence of beta2 toxin gene of *Clostridium perfringens* type A from diarrhoeic dogs. *Vet Rec.* 149, 9, 273-4. doi:10.1136/vr.149.9.273.
- Timmerman HM, Mulder L, Everts H, et al, 2005. Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *J Dairy Sci.*88, 6, 2154-65. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72891-5.
- Titball RW, Naylor CE, Basak AK, 1999. The *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Anaerobe.* 5, 2, 51-64. doi: 10.1006/anae.1999.0191.
- Tutuncu M, Kilicoğlu Y, Guzel M, Pekmezci M, Gulhan T, 2018. Prevalence and toxinotyping of *Clostridium perfringens* enterotoxins in small ruminants of Samsun Province, Northern Turkey *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 28, 4, 1204-7.
- Uzal FA, Pasini MI, Olaechea FV, Robles CA, Elizondo A, 1994. An outbreak of enterotoxaemia caused by *Clostridium perfringens* type D in goats in Patagonia. *Vet Rec.*135, 12, 279-80. doi:10.1136/vr.135.12.279.
- Uzal FA and Kelly WR, 1997. Effects of the intravenous administration of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin on young goats and lambs. *J Comp Pathol.* 116(1):63-71. doi: 10.1016/s0021-9975(97)80044-8. PMID: 9076601.
- Uzal FA, Kelly WR, 1998. Protection of goats against experimental enterotoxaemia by vaccination with *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid. *Vet Rec.*142, 26, 722-5. doi: 10.1136/vr.142.26.722.
- Uzal FA, Kelly WR, Morris WE, Assis RA, 2002. Effects of intravenous injection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in calves. *J Comp Pathol.*126, 1, 71-5. doi:10.1053/jcpa.2001.0514.

- Uzal FA, Kelly WR, Thomas R, Hornitzky M, Galea F, 2003. Comparison of four techniques for the detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in intestinal contents and other body fluids of sheep and goats. J Vet Diagn Invest.15, 2, 94-9. doi:10.1177/104063870301500202.
- Uzal FA, 2004. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. Anaerobe. 10, 2, 135-43. doi: 10.1016/j.anaerobe.2003.08.005.
- Uzal FA, Kelly WR, Morris WE, Bermudez J, Baison M, 2004. The pathology of peracute experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in sheep. J Vet Diagn Invest, 16, 403-11.
- Uzal FA, Plattner BL, Hostetter JM, 2007. The alimentary system, disease associated with enteric clostridial infections. Jubb Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Eds Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, Eds: Maxie MG, Vol 2. 6th edn. Mosby Elsevier, St.Louis, 183-94.
- Uzal FA and Songer JG, 2008. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. J Vet Diagn Invest, 20, 253-65.
- Uzal FA, Fisher DJ, Saputo J, Sayeed S, McClane BA, Songer G, Trinh HT, Fernandez Miyakawa ME, Gard S, 2008. Ulcerative enterocolitis in two goats associated with enterotoxin- and beta2 toxin-positive *Clostridium perfringens* type D. J Vet Diagn Invest. 20, 5, 668-72. doi: 10.1177/104063870802000526.
- Uzal FA, Vidal JE, McClane BA, Gurjar AA, 2010. *Clostridium perfringens* toxins involved in mammalian veterinary diseases. Open Toxinology J, 3, 24-42.
- Uzal FA and McClane BA, 2011. Recent progress in understanding the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type C infections. Vet Microbiol 153, 37-43. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.048.
- Uzal FA, Freedman JC, Shrestha A, Theoret JR, Garcia J, Awad MM, Adams V, Moore RJ, Rood JJ, McClane BA, 2014. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. Future Microbiol. 9, 3, 361-77. doi: 10.2217/fmb.13.168.
- Uzal FA, 2016. Diseases produced by *Clostridium perfringens* type A in mammalian species. In: Clostridial Diseases of Animals. Uzal FA, Songer JG, Prescott JF, Popoff MR, IA: Wiley-Blackwell:Ames, IA, USA, 109–16.
- Uzal FA and SongerJG, 2016. Infections by *Clostridium perfringens* type B. In: Clostridial Diseases of Animals. Uzal FA, Songer JG, Prescott JF, Popoff MR, IA: Wiley-Blackwell:Ames, IA, USA, 139–42.
- Uzal FA, Giannitti F, Finnie JW, García JP, 2016. Diseases produced by *Clostridium perfringens* type D. In: Clostridial Diseases of Animals. Uzal FA, Songer JG, Prescott JF, Popoff MR, IA: Wiley-Blackwell:Ames, IA, USA, 157–72.
- Uzal FA, Navarro MA, Li J, Freedman JC, Shrestha A, McClane BA, 2018. Comparative pathogenesis of enteric clostridial infections in humans and animals. Anaerobe. 53, 11-20. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.06.002.
- Valgaeren B, Pardon B, Goossens E, Verherstraeten S, Schauvliege S, Timbermont L, Ducatelle R, Deprez P, Van Immerseel F, 2013. Lesion development in a new intestinal loop model indicates the involvement of a shared *Clostridium perfringens* virulence factor in haemorrhagic enteritis in calves. J Comp Pathol.149, 1, 103-12. doi:10.1016/j.jcpa.2012.11.237.
- Valgaeren BR, Pardon B, Verherstraeten S, Goossens E, Timbermont L, Haesebrouck F, Ducatelle R, Immerseel FV, Deprez P, 2015. Haemorrhagic enteritis in newborn calves associated with *Clostridium perfringens* and colostrum delivery. JMM Case Reports. Volume 2, Issue 4. <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.000088>.
- Verherstraeten S, Goossens E, Valgaeren B, Pardon B, Timbermont L, Vermeulen K, Schauvliege S, Haesebrouck F, Ducatelle R, Deprez P, Van Immerseel F, 2013. The synergistic necrohemorrhagic action of *Clostridium perfringens* perfringolysin and alpha toxin in the bovine intestine and against bovine endothelial cells. Vet Res 44:5.

- Vidal JE, Ma M, Saputo J, Garcia J, Uzal FA, McClane BA, 2012. Evidence that the Agr-like quorum sensing system regulates the toxin production, cytotoxicity and pathogenicity of *Clostridium perfringens* type C isolate CN3685. Mol Microbiol. 83, 1, 179-94. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07925.x.
- Waters M, Savoie A, Garmory HS, et al, 2003. Genotyping and phenotyping of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets. J Clin Microbiol. 41, 8, 3584-91. doi:10.1128/JCM.41.8.3584-3591.2003.
- Watson PJ, Scholes SF, 2009. *Clostridium perfringens* type D epsilon intoxication in one-day-old calves. Vet Rec. 164, 26, 816-7. doi: 10.1136/vr.164.26.816.
- Wilsdon AS, 1931. Second Report. University of Cambridge Institute of Animal Pathology.53–85.
- Yaman Aydoğan D, 2019. *Clostridium perfringens* Toksinlerinin tespitinde ELISA (Enzyme Link Immunosorbent Assay) ve farelerde in vivo toksin nötralizasyon testinin karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi.
- Yonogi S, Matsuda S, Kawai T, Yoda T, Harada T, Kumeda Y, Gotoh K, Hiyoshi H, Nakamura S, Kodama T, Iida T, 2014. BEC, a novel enterotoxin of *Clostridium perfringens* found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks. Infect Immun. 82, 6, 2390-9. doi: 10.1128/IAI.01759-14.

7. TURNİTİN RAPORU

MARMARA BÖLGESİNDE RUMİNANTLARDA GÖRÜLEN ENTEROTOKSEMİ OLGULARININ HİSTOPATOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULARININ ARAŞTIRILMASI VE ELISA İLE TİPLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 7	% 7	% 2	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 3
2	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
3	www.tarimorman.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	vetkontrol.tarimorman.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<% 1
6	turkiyeparazitolojidernegi.org İnternet Kaynağı	<% 1
7	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
8	iksadyayinevi.com İnternet Kaynağı	<% 1