

## Atık Sığır Fetüslerinde Brusellozisin Patolojik, İmmunohistokimyasal, Mikrobiyolojik Yöntemlerle ve Gerçek Zamanlı PZR ile Teşhisi

Mehmet TUZCU<sup>1</sup>, Murat ÖZMEN<sup>1</sup>, Nevin TUZCU<sup>1</sup>  
Atıla YOLDAŞ<sup>1</sup>, Hüseyin TOPÇUOĞLU<sup>1</sup>

### Özet:

Brusellozis, sığır yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara sebep olan zoonoz bir hastalıktır. Bu çalışmada brusellozise bağlı atıkların dokularında belirlenen patolojik ve immunohistokimyasal boyama sonuçları ile atık dokularında Gerçek zamanlı PZR ile hesaplanan brucella genomik DNA miktarları arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışmanın materyalini 105 adet atık sığır fetüsü oluşturdu. İncelenen atık sığır fetüslerinin 11'inde gerçek zamanlı PZR ile 8 tanesinde immunohistokimyasal metotla, 4 tanesinde de mikrobiyolojik yöntemlerle brusellozis belirlendi.

Brusellozis belirlenen atıkların deri altı dokusunun ödemli olduğu, göğüs ve karın boşluklarında koyu kırmızı renkli bir sıvının bulunduğu, akciğerlerinde renkleri griden koyu kırmızıya kadar değişen, sert kıvamlı alanların olduğu dikkati çekti. Mikroskopik incelemelerde bronşiyol epitellerinde dejenerasyon ve dökülmeler belirlenirken, lümenlerinde nötrofil lökosit ve makrofaj birikimleri görüldü.

Sonuç olarak; brusellozisin patolojik, immunohistokimyasal, mikrobiyolojik ve gerçek zamanlı PZR ile yapılan karşılaştırmalı tanısında: Gerçek zamanlı PZR teşhiste, daha duyarlı olduğu ve kısa sürede sonuç verdiği; ancak bu imkâna sahip olmayan laboratuvarlarda immunohistokimyasal yöntemlerin de mikrobiyolojik yöntemler kadar güvenle uygulanabileceği kanısına varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Brusellozis, İmmunohistokimya, Mikrobiyoloji, Patoloji, Gerçek zamanlı PZR

## Diagnosis of Brucellosis in the Aborted Bovine Fetuses by Pathological, Immunohistochemical, Microbiological and Real Time PCR Methods

### Abstract:

Brucellosis which causes economic losses in cattle breeding is breeding problems. In this study is determined to relationship of between the pathological findings in tissues of aborted fetus due to brucellosis and brucella genomic DNA which is calculated by the amount of real time PCR of this tissues. The material of this study constituted the number of 105 aborted bovine fetuses. Brucellosis was determined by Real Time PCR in 11 of 105 aborted bovine fetuses, by immunohistochemical method in 8 of them and microbiological method in 4 of them.

In aborted fetuses which determined of brucellosis were seen to edema of subcutaneous tissue, find a dark red fluid in the chest and abdominal cavities. In addition to this lung color ranging from gray to dark red with hard consistency areas. In microscopic examinations, bronchioles epithelial degeneration and desquamation with neutrophil leukocyte and macrophage accumulation were determined in lumen.

As a result; comparative diagnosis of brucellosis with pathological, immunohistochemical, microbiological and Real Time PCR methods: Real Time PCR is more sensitive for diagnosis of Brucellosis and respond in a short time, but immunohistochemical method was concluded to in the laboratories which don't have this opportunity so confidently to microbiological methods

**Keywords:** Brucellosis, Immunohistochemistry, Microbiology, Pathology, Real Time PCR

### Giriş

Atık olguları, sığır yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara sebep olan yetiştiricilik problemlerindedir. Atıkların ancak %50-65'inde etiyolojinin belirlenebildiği; etiyolojisi belirlenen olguların %67'sinin bakteriyel, %5'inin viral, %11'nin mantar kaynaklı olduğu kaydedilmiştir (3). Sığırlarda bakteriyel nedenlere ilişkin atıkların dağılımını ortaya koymak üzere Kuzeydoğu Anadolu Bölgesinde yapılan bir çalışmada Kars bölgesinde görülen sığır atıklarında %40 oranında *Brucella ssp* tespit edilmiştir (23). Arjantin'de 354 atık sığır fetüsü üzerinde yapılan bir araştırmada, 193 olgunun etiyolojisi herhangi bir nedene bağlanamazken, etiyolojisi saptanan 161 (%45.5)

olgudan 80'inde (%22.6) bakteriyolojik etken belirlenmiş; en yaygın bakteriyel etkenin 28 olguda (%7.9) *Brucella abortus* olduğu açıklanmıştır (4). Ülkemizde çeşitli bölgelerde abortlar üzerinde yapılan izolasyon çalışmalarında ruminantlarda brusellozise bağlı abortların %15-40 oranlarında olduğu bildirilmektedir (19,14). Yine ülkemizde çeşitli serolojik yöntemler kullanılarak yapılan bölgesel çalışmalarda ise brusellozis seroprevalansının %1-70 arasında değiştiği rapor edilmiştir (7,8,19,11)

<sup>1</sup>Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, 01122 Adana, Türkiye.

Sorumlu Yazar: Mehmet TUZCU

E-mail:mtuzcu42@hotmail.com

Ulaşma tarihi: 12.12.2010

AVKAE Dergisi 2011 1:8-14

Brusellozise ilgili şekillenen atıklarda fötüs çoğunlukla ödemlidir ve deri altında kanlı bir sıvı toplanır. Benzeri sıvı karın ve göğüs boşluklarında da bulunabilir. Brusellozda abomazum sıvısı bulanık, limon sarısı renginde ve pıhtılıdır. Atık fetüslarda şekillenen bronkopnömoni en sık gözlenen lezyon olup brusella enfeksiyonu için diagnostik olarak kabul edilmektedir (5,15,17,20). Ayrıca fötüsde özellikle akciğerde nekrotik arteritise, lenf düğümleri, karaciğer, dalak ve böbreklerde fokal nekroz odakları ile dev hücrelerine rastlandığı bir çok araştırıcı tarafından rapor edilmiştir (14,15,19,26.). Dalakta beyaz pulpada azalma, germinal merkezlerde mitoz ile hafiften orta dereceye kadar değişen lenfositik hiperplazi ve fokal nekroz odakları görüldüğü bildirilmiştir (13,26).

Hastalığın klinik teşhisi mümkün değildir. Kesin teşhis için laboratuvar muayenelerine ihtiyaç vardır. Brusellozisin laboratuvar teşhisi direk yada indirek laboratuvar metotlarıyla yapılmaktadır (2). Etkenin mikrobiyolojik izolasyonu ve identifikasyonu en geçerli yöntemdir. Bunun yanında lam aglutinasyon, tüp aglutinasyon ve ELISA gibi serolojik testler de tarama testleri olarak sıklıkla kullanılmaktadır (6,11). *Brucella ssp.* antijenlerinin tespitine yönelik immunohistokimyasal teknikler ile yapılan çalışmalarda da yüksek oranda spesifite (%94) ve sensitivite (%82) bildirilmektedir (1,17,20). Son yıllarda hastalıkların tanısında kullanılan moleküler yöntemlerin gelişmesine paralel olarak brusellozisin teşhisinde başarı ile kullanılan farklı PZR protokolleri bildirilmektedir (22,25).

Bu çalışmanın amacı; sığırların önemli atık sebeplerinden biri olan bruselloziste atığa ait dokularda belirlenen patolojik bulgular ile bu dokularda Real Time PZR ile hesaplanan brusella genomik DNA miktarları arasındaki ilişkiyi ortaya koymak ve brusellozisin teşhisinde patolojik immunohistokimyasal, mikrobiyolojik yöntemler ile gerçek zamanlı PCR metodunu karşılaştırmaktır.

#### Materyal ve Metod

Çalışmanın materyalini Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne sorumluluk alanında bulunan illerden (Osmaniye, Gaziantep, Kahramanmaraş, Şanlıurfa, Kilis, Mersin, Hatay) 2007-2009 yılları arasında getirilen 105 adet atık sığır fetüsü oluşturdu. Nekropsiyi takiben fetüslerin akciğer, karaciğer, dalak, abomazum, böbrek, kalp, mediastinal lenf bezleri ve beyinden alınan doku örneklerinin yarısı mikrobiyolojik ve PZR muayeneleri için ayrıldı. Diğer yarısı %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edildi. Tespit edilen dokular bilinen yöntemlere göre işlendi ve parafinde bloklandı. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler, hematoksilen eozin (HE) ve immunohistokimyasal boyamalarda kullanıldı.

Öncelikle bütün fetüslerin akciğer ve abomazum sıvılarında Gerçek zamanlı PZRmetodu ile *Brucella ssp.* nükleik asitleri aranarak pozitif bulunanlar ayrıldı ve bu atıkların diğer dokuları da gerçek zamanlı PZR ile *Brucella ssp.* nükleik asitleri yönünden araştırıldı.

#### İmmunhistokimyasal muayene

İmmunhistokimyasal incelemeler için avidin-biotin-peroksidaz kompleks (ABC) yöntemi kullanıldı. 3-aminopropyltriethoxsilane ile kaplı lamlara alınan kesitler, ksilol serilerinden geçirilerek parafini giderildi ve alkol serilerinde rehidre edildi. Endojen peroksid aktivitesini gidermek için hidrojen peroksid'in %70'lik metanoldeki %3'lük çözeltisinde 15 dakika bekletildi. PBS (phosphate-buffered saline; pH:7.3) ile yıkanan kesitler % 0.1'lik tripsin ile oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi ve tekrar PBS ile yıkandı. Daha sonra, kesitlerin üzeri 1/1000 sulandırılmadığı poliklonal rabbit-anti *Brucella* (Becton Dickinson and Company Kat No: 240934) primer antikoru ile +4°C'de 1 saat inkübe edildi. PBS ile yıkanan kesitler 1/300 oranında sulandırılmış biotinle işaretli tavşan anti-keçi sekonder antikoru (Santa Cruz Biotechnology; Kat No: sc 2774) ile oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Lamlar PBS ile yıkandıktan sonra 1/300 oranında sulandırılan avidinperoksidase (Sigma; Kat No: E-2886-250UG) ile 1 saat süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi.

Kromojenik substrat DAP (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, (Sigma; Kat No: D 3939-SET) ile renk reaksiyonu sağlandıktan sonra Mayer'in hematoksilen boyasıyla karşıt boyamaya tâbi tutulup alkol serilerinde dehidre edildi ve lamelle kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi.

Reaktif kontrol olarak mikrobiyolojik metotla etken izole edilen atıklardan birine ait karaciğer kesitleri kullanıldı. Bu kesitlere boyama prosedürü sırasında poliklonal keçi-anti *Brucella ssp.* antikoru yerine PBS uygulandı.

#### PCR analizleri

Gerçek zamanlı PZRanalizlerinde ticari brucella genus tespit kiti (Way2Gene; Kat No: WG40-0294-16) kullanıldı. PCR işlemleri kit prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Kültür örneklerinden DNA ekstraksiyonu amacıyla High Pure PCR template (Roche Katolog no: 11796828001) DNA ekstraksiyon kiti kullanıldı. Bakteri kültüründen eppendorf içerisine 200 µl alınarak 13000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatat uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 200 µl PBS eklendi. Karışıma 5 µl lizozim katılıp 37°C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra karışıma 200 µl binding buffer ve 40 µl proteinaz-k eklenerek 70°C'de 10 dakika tekrar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra süspansiyona 100 µl isopropanol eklenerek iyice karıştırıldı.

Süspansiyon filtreli tüplere konularak 8000 rpm 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatat uzaklaştırıldı. Filtreli tüpler collection tüpün içerisine yerleştirilip 500 µl inhibitör removal buffer ilave edildi ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Filtreli tüpler collection tüplerin içerisine yerleştirilip 500 µl wash buffer ilave edilerek 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Filtreli tüpler collection tüplerin içerisine yerleştirilip 500 µl wash buffer ilave edilerek 8000 rpm de 1 dakika ve 13000 rpm de 10 saniye santrifüj edildi. Son aşamada filtreli tüpler temiz bir eppendorf tüpünün içerisine yerleştirilerek 70 °C ısıtılmış 100 µl elution buffer eklenerek 8000 rpm de

1 dakika santrifüj edildi. İzole edilen DNA lar -20 °C de PCR yapılıncaya kadar saklandı.

Doku örneklerinden DNA ekstraksiyonu amacıyla HighPure PCR template DNA ekstraksiyon kiti (Roche; Kat no:11796828001) kullanıldı. DNA izolasyonu için doku örneklerinden 25-50 mg alınarak üzerine 200 µl doku Lysis Buffer ve 40 µl Proteinaz K ilave edildi. Daha sonra 55°C'de 1 saat inkübe edildi. 200 µl Binding Buffer ilave edilerek 70°C'de 10 dakika tekrar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra süspansiyona 100 µl isopropanol eklenerek iyice karıştırıldı. Süspansiyon filtreli tüplere konularak 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Temiz collection tüpün içerisine yerleştirilip 500 µl İnhibitör Removal Buffer ilave edildi ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra iki defa temiz collection tüplerin içerisine yerleştirilip 500 µl Wash Buffer ilave edilerek 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. En son aşamada filtreli tüpler temiz bir eppendorf tüpünün içerisine yerleştirilerek 70 °C ısıtılmış 100 µl Elution Buffer eklenerek 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. İzole edilen DNA lar -20 °C de PCR yapılıncaya kadar saklandı. DNA miktarı spektrofotometre (NanoDrop ND-1000) ile 260 ve 280 nm de ölçülerek belirlendi.

Macfarland yöntemi ile mililitredeki konsantrasyonu  $3 \times 10^8$  CFU/ml olarak belirlenen *Brusella abortus* kültüründen elde edilen genomik DNA'nın 10'lu dilüsyonları ve  $3 \times 10^0$ 'dan  $3 \times 10^7$ ' e kadar olan kopya sayıları standart eğrinin oluşturulmasında kullanıldı.

*Brusella ssp.* nükleik asitlerinin amplifikasyonları gerçek zamanlı PZR cihazı (Roche Light Cycler 2.0) kullanılarak 95°C 10 dakika inkübasyonu takiben 95°C 3 saniye, 60°C'de 30 saniye ve 72°C 1 saniye olacak şekilde 45 döngülük inkübasyon ile gerçekleştirildi.

PCR'nun tüm aşamalarında pozitif kontrol olarak Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü *Brusella Referans Laboratuvarı* tarafından doğrulanan *Brusella abortus* şuşu ve negatif kontrol olarak da distile su kullanıldı.

#### Mikrobiyolojik muayene

Atık fetuslardan aseptik şartlarda alınan doku ve abomazum içeriklerinden *Brusella* izolasyon ve identifikasyonu amacıyla %7'lik kanlı agar ve selektif (Oxoid; SR209E) ilave içeren *Brucella* agarlara ekim yapıldı. Agarların aerobik ve mikroaerofilik ortamda 37 °C'de 48-72 saat inkübasyonundan sonra üreyen kolonilerin *Brucella ssp.* yönünden makroskopik görünümü, gram boyama, oksidaz, H<sub>2</sub>S,ürezaz, katalaz üretimi, boyalara duyarlılık ve monospesifik serumlarla aglütinasyon gibi konvansiyonel yöntemler kullanılarak identifikasyonu gerçekleştirildi (2).

#### Bulgular

Çalışmada incelenen 105 atık sığır fetüsünün laboratuvar incelemelerinde atıkların 11'inde brusellozis, 13'inde listeriozis, 7'sinde kampilobakteriozis, 2'inde klamidiozis, 1'inde leptospirozis, 3'ünde salmonellozis, 7'sinde streptokokkozis, 2'sinde toksikozis, 2'sinde IBR ve 1'inde de mikozis belirlendi.

Çalışmada gerçek zamanlı PZR ile *Brucella ssp.* nükleik asitleri belirlenen 11 olgunun 8 tanesinde immunhistokimyasal yöntemle, 4 tanesinde de mikrobiyolojik olarak brusellozis belirlendi. Atıkların geldiği odaklar ile teşhis metotlarına göre brusellozisin belirlenme oranları Tablo 1'de verilmiştir.

Geldiği Odak	n	PZR	İH	M
Gaziantep	17	3	2	2
Kahramanmaraş	9	3	2	1
Şanlıurfa	12	2	2	-
Mersin	15	1	1	1
Hatay	14	1	1	-
Adıyaman	16	1	-	-

Tablo 1: Atıkların geldiği odaklar ile brusellozisin teşhis metotlarına göre belirlenme oranları

Çalışmada brusellozis belirlenen atıklarda makroskopik olarak derialtı dokusunun ödemli olduğu, göğüs ve karın boşluklarında koyu kırmızı renkli bir sıvının bulunduğu görüldü. Akciğer loblarında farklı büyüklüklerde renkleri griden koyu kırmızıya kadar değişen, sert kıvamlı alanlar belirlendi. Bütün olgularda abomazumda sarı-bulanık renkli sıvı tespit edildi.

Brusellozis belirlenen atıkların tamamında mikroskopik olarak bronşiyol lumenlerinde ve alveollerde nötrofil lökosit ve makrofaj infiltrasyonu tespit edildi (Resim 1A). Atık olgularının hepsinde farklı şiddetlerde olmak üzere bronşiyol ve alveol epitellerinde dejenerasyon ve dökülmeler tespit edildi. İncelenen 4 atığın hepatositlerinde vakuoler dejenerasyonun geliştiği, remark kordonlarının dizilişinin bozulduğu, sinuzoidlerin genişlemiş ve hiperemik oldukları dikkati çekti. Dejenerasyonlara ek olarak atıklardan 2 tanesinde karaciğerde fokal nekroz alanları ile mononükleer hücre infiltrasyonlarının bulunduğu belirlendi (Resim 1B). Yine bu atıkların böbreklerinde yaygın konjesyon ve intertubuler kanamalar ile birlikte tubulus epitellerinde dejenerasyonlar tespit edildi. İncelenen atıkların 4 tanesinde dalakta beyaz pulpada atrofi ve fokal nekroz alanları dikkati çekti. Gerçek zamanlı PZR ile brusellozis belirlenen 11 atıkta belirlenen patolojik bulgular ve bu bulguların görülme oranları tablo 2 de gösterilmiştir.

Patolojik Bulgu	Adet	Oran(%)
<b>Makroskobik bulgular</b>		
Vücut boşluklarında serohemorajik eksudat	8	72
Akciğerde sertleşmiş, griden koyu kırmızıya kadar değişen alanlar	8	72
Karaciğerde farklı büyüklükte sarı-boz renkte alanlar	2	18
Kokuşma	3	27
Deri altında yaygın ödem	6	56
Abomazumda sarı bulanık renkli içerik	8	72
<b>Mikroskobik bulgular</b>		
Karaciğerde fokal nekroz ve hepatitis	2	18
Kataral bronkopnömoni	8	72
Karaciğerde vakuoler dejenerasyon	4	36
Böbreklerde intertubuler kanama	2	18
Dalağın beyaz pulpasında atrofi ve nekroz	4	36

Tablo 2: PZR ile Brusellozis teşhis edilen sığır atıklarında belirlenen patolojik bulgular ve görülme oranları

Spesifik antikolar kullanılarak yapılan immunhistokimyasal incelemelerde 8 atıkta brucella spesifik reaksiyonlar belirlendi. Brusella antijenleri akciğerlerde kahverengi ve küçük granüller şeklinde olmak üzere makrofaj ve nötrofillerin sitoplazmalarında tespit edildi. Makrofajların sitoplazmalarının koyu boyanmış, amorf görünüşteki antijenler ile dolu oldukları görüldü (Resim 1C).

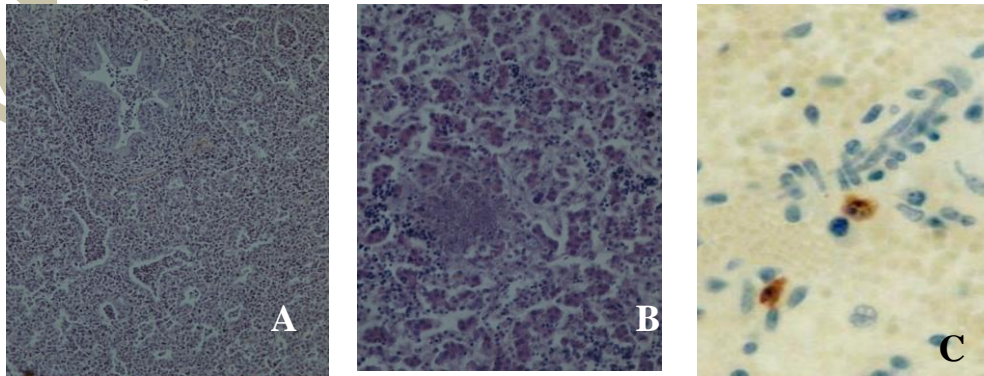
Karaciğerde immunhistokimyasal pozitiflik 3 olguda tespit edildi. Bu atıklarda brusella antijenlerinin hepatosit ve Kupffer hücrelerinin sitoplazmalarını doldurduğu tespit edildi.

Atığa ait organlardan ve abomazum sıvısından hazırlanan inokulumlardan brusella besi yerine yapılan ekimlerde etken izole edilen 4 olgunun *Brusella abortus* olduğu belirlendi. Dört olgunun 3 tanesinde akciğer, karaciğer ve abomazum sıvısından, 1 olguda ise akciğer ve abomazum sıvısından *Brusella abortus* izole edildi.

Çalışmada sığır atıklarının akciğer, karaciğer, dalak, abomazum, böbrek, kalp, beyin ve lenf yumrularından alınan doku örneklerinde Gerçek zamanlı PZR ile belirlenen *Brusella* genomik DNA kopya sayıları ve CP değerlerinin ortalamaları Tablo 3 de verilmiştir.

Brucella Genomik DNA	CP Değerlerin Kopya Sayıları(Kop/ml)	Ortalamaları
Akciğer	$2,74 \times 10^4$	27,23
Karaciğer	$1,33 \times 10^4$	28,04
Böbrek	$1,29 \times 10^4$	28,08
Dalak	$14,6 \times 10^0$	35,70
Kalp	-	-
Mez. Lenf Yum.	-	-
Abomazum	$1,86 \times 10^4$	27,76

Tablo 3: Çalışmada Real-Time PCR ile atık dokularında belirlenen *Brucella* genomik DNA kopya sayıları ve CP Değer ortalamaları



Şekil 1: Bronkopnömoni, akciğerde bronşiol ve alveol lümenlerinde nötrofil lökosit ve makrofaj infiltrasyonu (A) Hematoksilen Eozin, x200, Karaciğerde fokal nekroz (B) Hematoksilen Eozin x260, Akciğerde makrofaj stoplazmalarında *Brucella* spesifik boyanma (C) x380 İmmunperoksidaz Hematoksilen.



	Karaciğer			Akciğer			Böbrek			Dalak			Beyin			Kalp			Abomasum			Mez. Lenf Yum		
	P C R	İ H	M	P C R	İ H	M	P C R	İ H	M	P C R	İ H	M	P C R	İ H	M	P C R	İ H	M	P C R	İ H	M	P C R	İ H	M
G.Antep 1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G.Antep 2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
G.Antep 3	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
K.Maraş 1	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
K.Maraş 2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
K.Maraş 3	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Ş.Urfa 1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Ş.Urfa 2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Mersin	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Hatay	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adıyaman	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
TOPLAM	6	3	3	11	7	4	4	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	4	-	-	-

**Tablo 5:** Real Time PCR ile Brusellozis belirlenen sığır atıklarının immunhistokimyasal (IH) ve mikrobiyolojik (M) muayene sonuçlarının dokulara göre karşılaştırılması.

### Tartışma ve Sonuç

Sığırlarda atıklara sebep olan bakteriyel hastalıkların klinik belirtileri atipik olduğundan bu hastalıkların laboratuvar tanısı oldukça önemlidir. Bu bağlamda, sunulan çalışmada belirlendiği üzere, atık fetüslerin nekropsileri sırasında tespit edilen vücut boşluklarında birikmiş serohemorajik eksudat, karaciğerde belirlenen nekroz odakları, deri altında şekillenen yaygın ödem, abomasumda sarı bulanık renkli içerik ve akciğerlerde şekillenen griden kırmızıya kadar değişen renk değişiklikleri gibi makroskopik bulgular ile histopatolojik incelemelerde farklı yoğunluklarda belirlenen kataral bronkopnömoni, böbreklerde intertubuler kanama, dalağın beyaz pulpasında atrofi ve nekroz ile karaciğerdeki nekroz ve hepatitis gibi bulguların sığırlarda atıklara sebep olan kampilobakteriozis, listeriozis ve klamidiozis gibi hastalıklarda da bildirilmiş olması (9, 12) patolojik tanının etken izolasyonunun yanında immunohistokimyasal ve moleküler yöntemlerle desteklenmesi gereğini ortaya koymaktadır.

Brusellozis nedeniyle meydana gelen atıklarda en fazla bildirilen patolojik bulgu bronkopnömonidir (5,15,17,20). Bu çalışmada da gerçek zamanlı PZR ile brusellozis belirlenen atıkların hepsinde en sık

karşılaşılan patolojik lezyon benzer çalışmalarda da bildirildiği gibi bronkopnömoni oldu (14,19,26). Diğer çalışmalarda bildirilen bronşiyal nekrozis (15,20) ve yangısal hücre infiltrasyonları içerisinde görülen dev hücreleri (5) bu çalışmada tespit edilemedi.

Gerçek zamanlı PZR ile akciğerlerde belirlenen brusella genomik DNA sayısının diğer dokulara nazaran daha fazla olması ve akciğerlerin tamamında patolojik olarak pnömoni belirlenmesi brusella etkenlerinin yavruya annede gelişen nekrotik plasentitis sonucu amniyotik sıvıya dökülen etkenlerin fetus tarafından aspire edilmesi sonucu geçtiği fikrini kuvvetlendirmektedir (15).

Çalışmada karaciğerde belirlenen ortalama brucella genomik DNA sayısı ( $1,33 \times 10^4$  kopya/ml) akciğerlere nazaran daha düşüktür. Ancak karaciğerlerin patolojik muayenesinde 4 atıkta hepatositlerde farklı şiddetlerde vakuoler dejenerasyon belirlenmiş olması ve bu atıklardan sadece 2 tanesinde hepatitis belirlenmesi, oluşan hasarın brusella etkenlerinden ziyade korionik trofoblastlarda şekillenen nekroz sonucu bozulan dolaşıma bağlı gelişen hipoksi ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmada Gerçek zamanlı PZR ile 11 atıkta brusellozis belirlenmesine rağmen 4 atığa ait iç organlarından ve fetal abomasum sıvısından bakteriyolojik olarak *Brusella abortus* izole edilebilmiş

olması, PCR yönteminin bakteriyolojik yöntemle göre daha duyarlı olduğunu düşündürmektedir (4,21). Ancak bu durum laboratuara teşhis için getirilen atıkların çoğu kez kokuşmuş yada dondurulmuş olması ile de ilgili olabilir.

Brusellozis zoonoz bir hastalık olmasından dolayı etkenin izolasyon ve identifikasyonunu yapan laboratuvarlar açısından da yüksek düzeyde biyolojik risk oluşturmaktadır. Bunun yanında brusellozisin mikrobiyolojik teşhisinde kullanılan etken izolasyon ve identifikasyonuna yönelik yöntemlerin uzun zaman alması, tecrübeli personel gerektirmesi, etkenin nükleik asitlerini belirlemeye yönelik PCR temeline dayanan teşhis metotlarını ve tespit edilmiş dokularda etkeni belirlemeye yönelik immunohistokimyasal yöntemlerini atıkların teşhisinde ön plana çıkarmaktadır.

Yapılan çalışmalarda *Brucella* antijeninin immunohistokimyasal yöntem ile tespitinde yüksek oranda duyarlılık bildirilmesine rağmen (1,10,17,26), bu çalışmada *Brucella* antijeni için spesifik immunohistokimyasal boyanma 7 olguda akciğerlerde makrofajların sitoplazmalarında, 3 olguda da akciğerle birlikte karaciğerde hepatositlerde ve kumpfer hücrelerinde tespit edildi. Çalışmada PZR ile akciğer, karaciğer, dalak, böbrek, abomazum gibi dokularda *brucella* nükleik asitleri belirlenmiş olmasına rağmen immunohistokimyasal metotla incelenen dokulardan sadece karaciğer ve akciğerlerde *brucella* antijenlerinin belirlenmiş olması, atık dokularında *Brucella* antijeninin immunohistokimyasal yöntemlerle tespit edilebilecek eşik seviyesinin altında olması veya otolizin bakteri antijenleri üzerindeki olumsuz etkisi ile açıklanabilir. Benzer şekilde Meador ve ark (1986) ABC immunohistokimyasal boyama yönteminin kullanıldığı çalışmalarda pozitif sonuç elde edilebilmesi

için bir gram dokuda en az  $10^6$  adet bakterinin bulunması gerektiğini bildirmektedir.

Otoliz ve kokuşmaya bağlı değişikliklerde etkenlerin nükleotid yapılarının antijenik yapılarına göre daha uzun süre dayanıklı kalması etkene özgü nükleotidlerin belirlenmesi esasına dayanan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemleri ile kokuşmuş dokularda da teşhisi mümkün kılmaktadır (24). Bu durum çoğunlukla otolitik olarak atılan fetuslarda gerçek zamanlı PZR ile teşhis için önemli bir avantaj sağlamaktadır.

Bu çalışmada gerçek zamanlı PZR ile incelenen atıkların 11 tanesinde *Brucella ssp* nükleik asitleri belirlenmiştir. PCR ile brusellozis belirlenen atıkların tamamında akciğer dokusunda ve abomazumdan alınan örneklerde, yüksek oranda bakteri nükleik asitleri amplifiye edilmiş olması ve benzer şekilde çalışmada akciğer, karaciğer ve abomazumdan alınan örneklerden etken izolasyonu ve identifikasyonu yapılabilmüş olması mikrobiyolojik teşhis için örneklerde yüksek miktarlarda etkenin bulunması gerektiğini ortaya koymakla birlikte mikrobiyolojik muayenelerde akciğer ve abomazumdan alınan örneklerin etken izolasyonunda kullanılmasının başarıyı artırabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak; bu çalışma ile sığırların önemli atık sebeplerinden olan brusellozisin patolojik, immunohistokimyasal, mikrobiyolojik ve gerçek zamanlı PZR ile yapılan karşılaştırmalı tanısında: Gerçek zamanlı PZR'in daha duyarlı olduğu ve kısa sürede sonuç verdiği, ancak bu imkâna sahip olmayan laboratuvarlarda immunohistokimyasal yöntemlerinin de mikrobiyolojik yöntemler kadar güvenle uygulanabileceği kanısına varılmıştır.

#### Kaynaklar

1. Alberts JN, Erasmus, J, (1995). Detection of *Brucella abortus* antigens by immunoperoxidase histochemical staining of lochia smears. Onderstepoort J Vet Res. 62: 147-150
2. Arda M, Minbay A, Leleoğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker KS, (1999). Özel Mikrobiyoloji, 5. Baskı, Medisan Yayın Evi, Ankara
3. Augustine TP (2000). Abortions in dairy cows: New insights and economic impact. Advances in Dairy Technology 12: 233-244
4. Campero CM, Moore DP, Odeon AC, Cipolla AL, Odriozola E, (2003). Aetiology of bovine abortion in Argentina. Vet Res Commun 27(5):359-369
5. Enright FM, Walker JV, Jeffers G, Deyoe BL, (1984). Cellular and humoral responses of *Brucella abortus*-infected bovine fetuses. Am J Vet Res 45:424-430
6. Fidancı HA, Akın S, Alabay M, Güvener N, (1995). Sığırlarda *Brucella abortus*'a karşı oluşan antikorları saptamada ELISA ve diğer serolojik tekniklerin karşılaştırılması. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 42: 553-557
7. Genç O, Otlı S, Şahin M, Aydın F, Gökçe HI, (2005). Seroprevalance of brucellosis and leptospirosis in aborted dairy cows. Türk J Vet. Anim. Sci. 29:359-36
8. Gürtürk K, Alan M, Boynukara B, Solmaz H, (1994). Van ve yöresinde koyun ve sığır Brucellosis'inin insidensi üzerinde sero-epidemiolojik araştırmalar. YYÜ Vet Fak Derg, 5, 121-125
9. Hazıroğlu R ve Milli ÜH, (1998). Veteriner Patoloji, Cilt II, Tamer Matbaacılık, Yayıncılık, Tan Hiz Tic ve Paz Ltd, Şti, Ankara
10. İlhan F, Yener Z, (2008). Immunohistochemical detection of *Brucella melitensis* antigens in cases of naturally occurring abortions in sheep. J Vet Diagn Invest, 20:803-806
11. İyisan AS, Akmaz Ö, Düzgün S, Ersoy Y, Eskiizmirli S, Güler L, Gündüz K, Işık N, İçyerioğlu K, Kalender H, Karaman Z, Küçükayan U, Özcan C, Seyitoğlu Ş, Tuna İ, Tunca T, Üstünakın K, Yurtalan S, (2000). Türkiyede sığır ve koyunlarda brusellosisin seroepidemiolojisi. Pendik Mikrobiyoloji Der. 31 (1):21-75

12. Jerret IV, Mcorist S, Waddington J, Browning JW, Malecki JC, Mccausland IP, (1992). Diagnostic Studies Of Fetus, Placenta and Maternal Blood From 265 Bovine Abortion. J Vet Diagn Invest. 4 (2):175-180
13. Jones TC, Hunt RD, King NW, (1997). Veterinary Pathology, Sixth Ed., Williams and Wilkins, Pennsylvania
14. Kıran MM, Baysal T, Gözün H, Güler L, Gündüz K, Kuyucuoğlu Ö, Küçükayan U, (1997). Konya yöresinde koyun abortusları üzerinde patolojik, bakteriyolojik ve serolojik çalışmalar. Etlik Vet Mikrobiyol Derg. 9:109-127
15. López A, Hitos F, Perez A, Navarro-Fierro RR, (1984). Lung lesions in bovine fetuses aborted by *Brucella abortus*. Can J Comp Med 48: 275-277
16. McEntee K, (1990). Reproductive Pathology of Domestic Mamals, Academic Press, Inc, New York
17. Meador VP, Tabatabai LB, Hagemoser WA, Deyoe BL, (1986). Identification of *Brucella abortus* in formalin-fixed, paraffin embedded tissues of cows, goats and mice with avidin-biotin-peroxidase complex immunoenzymatic staining technique, Am J Vet Res 47, 2147-2150
18. Murray RD, (1990). A field investigation of causes of abortion in dairy cattle, Veterinary Record 1:543-547
19. Muz A, Özer H, Eröksüz H, Ertaş HB, Öngör H, Gülcü HB, Dabak M, Başbuğ O, Kalender H, (1999). Elazığ ve çevresinde koyun ve keçilerde abortus olgularının bakteriyolojik, serolojik, ve patolojik olarak incelenmesi, Turk J Vet Anim Sci 23:177-188
20. Pérez J, Quezada M, Lopez J, Casquet O, Sierra MA, Martin De Las Mulas J, (1998). Immunohistochemical detection of *Brucella abortus* antigens in tissues from aborted bovine fetuses using commercially available polyclonal antibody. J Vet Diagn Invest 10: 17-21,
21. Pritchard G, (1990). Diagnosing thi cause of bovine abortion, In Practice 12(3):92-95
22. Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL, Graves MH, (2004). Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella spp.*, *B. abortus*, and *B. melitensis*. J Clin Microbiol, 42:1290-1293
23. Sağlam YS, Türkütanıt SS, Tastan R, Bozoglu H, Otlu S, (1998). Kuzeydoğu Anadolu Bölgesinde görülen bakteriyel sığır ve koyun abortlarının etiyojik ve patolojik yönden incelenmesi Vet Bil Derg. 14:133-145,
24. Türkyılmaz S, Esendal MÖ, (2002). Polimeraz zincir reaksiyonu ve mikrobiyolojide kullanım alanları. Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 8 (1): 71-76
25. Ünver A, Erdoğan HM, Atabay İH, Şahin M, Güneş V, Çitil M, Gökçe İH, (2006) Sığır atıklarından izole edilen *Brucella* türlerinin PAPD-PCR ile genotiplendirilmesi, Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 12 (2):121-127
26. Yazıcıoğlu O, (1997). Koyunlarda bruselloza bağlı abortuslarda fetal lezyonlar üzerinde patolojik ve immunoperoksidaz çalışmalar. Ankara Univ Vet Fak Derg.44, 291-307