



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEÇİLERİN DOĞAL PARATÜBERKÜLOZ
ENFEKSİYONLARINDA DOKULARDA OSTEOPONTIN VE
MANNOZ BINDING LEKTİN DÜZEYLERİNİN PATOLOJİK
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Vet. Hek. Leyla Elif Özgü AYÖZGER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman
Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ**

BURDUR – 2021

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEÇİLERİN DOĞAL PARATÜBERKÜLOZ ENFEKSİYONLARINDA
DOKULARDA OSTEOPONTİN VE MANNOZ BINDING LEKTİN
DÜZEYLERİNİN PATOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Vet. Hek. Leyla Elif Özgü AYÖZGER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ

Bu Araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0655-YL-20 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR – 2021

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince bana bilgilerini aktaran ve tez dönemimde bana destek olan, düşüncelerini belirtip beni yönlendiren danışmanım Sayın Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca her daim desteklerini gördüğüm ve hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Özlem ÖZMEN ve değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Volkan İPEK'e, tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm, tez çalışmamın moleküler yöntemler kısmı için değerli vaktini benim için harcayan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ezgi ŞABABOĞLU'na, tez çalışmam sırasında benden desteklerini esirgemeyen, başta değerli meslektaşlarım Vet. Hek. Mehmet Mustafa DEMİR ve Vet. Hek. Adem MİLLETSEVER başta olmak üzere tüm Patoloji Anabilim Dalı ailesine, bana yazım sırasında destek olan, görüşlerini paylaşan, her daim arkamda duran ve çalışmam sırasında kendilerini ihmal ettiğim kıymetli ailem Fatma ÇERİ, Ayşe OKUMUŞ ve Suat AYÖZGER'e, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Veteriner Hekim
Leyla Elif Özgü AYÖZGER

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	i
KABUL ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Paratuberkulozis	4
2.1.1. Etiyoloji	4
2.1.2. Tarihçe	6
2.1.3. Epidemiyoloji ve Patogenezis	8
2.1.4. Klinik Bulgular	14
2.1.5. Makroskopik Bulgular	16
2.1.6. Mikroskopik Bulgular	16
2.1.7. Tanı	18
2.1.8. Tedavi	20
2.1.9. Koruma ve Kontrol	21
2.1.10. Aşılama	22
2.2. Mannoz Bağlayıcı Lektin (Mannose Binding Lectin-MBL)	22
2.2.1. MBL'nin Yangıdaki Rolü	23
2.3. Osteopontin (OPN)	24
2.3.1. OPN'nin Yangıdaki Rolü	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM	28
3.1. Gereç	
3.2. Yöntem	
3.2.1. Histopatolojik Yöntemler	30
3.2.1.1. Hematoksilen & Eozin	30
3.2.1.2. Ziehl-Neelsen	30
3.2.2. İmmunohistokimyasal Yöntem	31
3.2.3. Moleküler Yöntem	31
3.2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	32
3.2.4. Semikantitatif Analiz	33
3.2.5. İstatistiksel Analiz	33
4. BULGULAR	34
4.1. Mikroskopik Bulgular	34
4.1.1. Hematoksilen & Eozin	34
4.1.1.1. Bağırsaklar	35

4.1.1.1.1. Duodenum	35
4.1.1.1.2. Jejunum	36
4.1.1.1.3. İleum	38
4.1.1.1.4. Kontrol Grubu Bağırsakları	42
4.1.1.1.5. Semikantitatif Analiz	42
4.1.1.2. Mezenteriyel Lenf Düğümleri	45
4.1.1.2.1. Kontrol grubu Mezenteriyel Lenf Düğümleri	48
4.1.1.2.2. Semikantitatif Analiz	48
4.1.1.3. İstatistiksel Analiz	50
4.1.2. Ziehl-Neelsen Boyama	52
4.1.2.1. Bağırsaklar	52
4.1.2.1.1. Duodenum	52
4.1.2.1.2. Jejunum	54
4.1.2.1.3. İleum	55
4.1.2.2. Mezenteriyel Lenf Düğümleri	56
4.1.3. İmmunohistokimyasal Bulgular	57
4.1.3.1. Anti-Mannoz Bağlayıcı Lektin (MBL) Boyanmalar	58
4.1.3.1.1. Bağırsaklar	58
4.1.3.1.1.1. Duodenum	58
4.1.3.1.1.2. Jejunum	59
4.1.3.1.1.3. İleum	60
4.1.3.1.2. Mezenteriyel Lenf Düğümleri	64
4.1.3.2. Anti-Osteopontin Boyanmalar	66
4.1.3.2.1. Bağırsaklar	66
4.1.3.2.1.1. Duodenum	66
4.1.3.2.1.2. Jejunum	67
4.1.3.2.1.3. İleum	68
4.1.3.2.1. Mezenteriyel Lenf Düğümleri	69
4.1.3.3. Anti-Mycobacterium tuberculosis Ag85B	78
İmmunohistokimyasal Bulguları	
4.2. Moleküler Yöntem Bulguları	78
5. TARTIŞMA	80
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	87
KAYNAKLAR	88
ÖZGEÇMİŞ	101

ŞEKİLLER

Şekil 4.1.	Duodenum; villuslarda atrofi ve füzyon (oklar). H&E, X40, 200µm Barr.	36
Şekil 4.2.	Jejunum, Lamina propriadan serozaya kadar uzanan geniş yangı, H&E, X40, 200µm Barr	37
Şekil 4.3.	Jejunum, lakteallerde dilatasyon (yıldız) ve lamina propriada orta şiddette diffuz mononukleer hücre infiltrasyonları (oklar), H&E, X100, 100µm Barr.	38
Şekil 4.4.	İleum, villusların apikal bölgelerinde, lamina propriada şiddetli epiteloid histiyosit ve mononukleer hücre infiltrasyonu (yıldızlar), H&E, X100, 100 µm Barr..	39
Şekil 4.5..	İleum, lamina propria ve submukozada ödem ve yangısal hücre infiltrasyonu nedeniyle genişleme (yıldızlar), lenfangitis (oklar) H&E, X40, 200µm Barr.	40
Şekil 4.6.	İleum, paucibasiller form, lakteallerde dilatasyon (oklar), Peyer plaklarında şiddetli hiperplazi (P), H&E, X40, 200µm Barr	41
Şekil 4.7.	İleum, seroza, lenfangitis, lenf damarı, duvarı ve lümeninde granuloamlar (yıldızlar), H&E, X200, 50 µm Barr.	42
Şekil 4.8.	Mezenteriyel lenf düğümü, kapsulada ve devamında trabekülde görülen yangısal infiltrasyon ve kortikal lenf folliküllerinde hiperplazi, H&E, X100, 100µm Barr	45
Şekil 4.9.	Mezenteriyel lenf düğümü, kapsula altında kazeifiye ve mineralize olmuş granuloam. KN: kazeifikasyon nekrozu, ok: Langhans tipi dev hücresi. H&E X200, 50µm Barr	46
Şekil 4.10.	Mezenteriyel lenf düğümü, parakortikal bölgede epiteloid histiyosit kümelerinden oluşan mikrogranuloam alanları (yıldızlar), H&E, X200, 50µm Barr	47
Şekil 4.11.	Duodenum, lamina propriada asit fast reaksiyon pozitif alanlar (oklar). Ziehl-Neelsen, X400, 20µm Barr.	53
Şekil 4.12.	Jejunum, lamina propriada asit fast reaksiyon pozitif alanlar (oklar). Ziehl-Neelsen, X200, 50µm Barr.	55
Şekil 4.13.	İleum, lamina propriada asit fast reaksiyon pozitif alanlar (oklar). Ziehl-Neelsen, X400, 20µm Barr.	56
Şekil 4.14.	Mezenteriyel lenf düğümü, lenf folikülünün periferinde asit fast reaksiyon pozitif alanlar (oklar). Ziehl-Neelsen, X400, 20µm Barr.	57
Şekil 4.15.	Duodenum, lamina propriada anti-MBL şiddetli immunopozitif alanlar, ABC-P, X100, 100µm Barr.	59
Şekil 4.16.	Jejunum, lamina propria ve submukozadaki anti-MBL şiddetli immunopozitif alanlar (oklar), ABC-P, X100, 100µm Barr.	60
Şekil 4.17.	İleum, lamina propria ve submukozada anti-MBL şiddetli immunopozitif alanlar (yıldızlar), ABC-P, X200, 50µm Barr..	62

Şekil 4.18.	İleum, lamina propriada makrofajların sitoplazmasında anti-MBL immunopozitif vakuoller (oklar), ABC-P, X400, 20µm Barr.	62
Şekil 4.19.	İleumda lamina propriadaki makrofajların sitoplazmasında vakuoller içerisinde ve serbest haldeki anti-MBL immunopozitif vakuoller (oklar). ABC-P, X400, 20µm Barr.	63
Şekil 4.20.	Kontrol grubu, jejunum, lamina propriada anti-MBL negatif immunreaksiyon, ABC-P, X40, 200µm Barr.	63
Şekil 4.21.	Mezenteriyel lenf düğümü, parenkim içerisindeki epiteloid histiyositlerde anti-MBL şiddetli immunopozitif alanlar (oklar), ABC-P, X200, 50µm Barr..	65
Şekil 4.22.	Kontrol grubu, mezenteriyel lenf düğümü, anti-MBL negatif immunreaksiyon, ABC-P, X40, 200µm Barr.	66
Şekil 4.23.	Duodenum, enterositlerde (ince oklar), lamina propriada ve bağ dokuda (kalın oklar) anti-OPN şiddetli immunopozitif alanlar, ABC-P, X100, 100µm Barr.	67
Şekil 4.24.	Jejunum, enterositlerde, lamina propriada ve bağ dokuda anti-OPN şiddetli immunopozitif alanlar, ABC-P, X100, 100µm Barr.	68
Şekil 4.25.	İleum, enterositlerde, lamina propria, Peyer plakları ve subserozal dokuda anti-OPN şiddetli immunopozitif alanlar, ABC-P, X40, 200µm Barr.	70
Şekil 4.26.	Kontrol grubu, jejunumda anti-OPN hafif immunopozitif alanlar, ABC-P, X40, 200µm Barr.	71
Şekil 4.27.	Mezenteriyel lenf düğümü, anti-OPN şiddetli immunopozitif alanlar, ABC-P, X40, 200µm Barr.	72
Şekil 4.28.	Mezenteriyel lenf düğümü, mikrogranulomu oluşturan anti-OPN immunopozitif epiteloid histiyositler ve makrofajlar, ABC-P, X400, 20µm Barr	73
Şekil 4.29.	Kontrol grubu, mezenteriyel lenf düğümü anti-OPN negatif immunreaksiyonları, ABC-P, X200, 50µm Barr.	74
Şekil 4.30.	Çalışma grubu, ileum, multibasiller form. A:Lamina propriada yangısal hücre infiltrasyonu (yıldızlar) H&E, X40, 200µm Barr. B: Lamina propriada asit fast reaksiyon pozitif alanlar (yıldızlar), Küçük resim: Asit fast reaksiyonu yakınlaştırılmış görünüm, Ziehl-Neelsen, X40, 200µm Barr. C: Lamina propriada ve submukozada anti-MBL immunreaksiyonları (oklar) ABC-P, X40, 200µm Barr. D: Lamina propriada ve submukozada anti-OPN immunreaksiyonları (oklar). ABC-P, X40, 200µm Barr.	75
Şekil 4.31.	Çalışma grubu, mezenteriyel lenf düğümü, mikrogranulom. A: Epiteloid histiyosit ve yangısal hücre infiltrasyonu (yıldızlar), H&E, X200, 50µm Barr. B: Epiteloid histiyositlerde asit fast reaksiyon pozitif (oklar), Ziehl-Neelsen, X400, 20µm Barr. Küçük resim: Etkenlerin yakınlaştırılmış görünümü (oklar), Ziehl-Neelsen, X1000, 10µm Barr. C: Epiteloid histiyositleride anti-MBL immunreaksiyonları (oklar) ABC-P, X200, 50µm	76

- Barr. D: Epiteloid histiyositleride anti-OPN immunreaksiyonları (oklar). ABC-P, X100, 100µm Barr.
- Şekil 4.32.** Çalışma grubu, mezenteriyel lenf düğümü, trabekül periferinde makrofaj ve epiteloid histiyositler. A: H&E, X400, 20µm Barr. B: Asit fast reaksiyon pozitif alanlar (oklar), Ziehl-Neelsen, X400, 20µm Barr. C: anti-MBL immunopozitif reaksiyonlar (oklar). ABC-P, X400, 20µm Barr. D: anti-OPN immunopozitif reaksiyonlar (oklar). ABC-P, X400, 20µm **77**
- Şekil 4.33.** Çalışma grubu, mezenteriyel lenf düğümü. A: Asit fast reaksiyon pozitif alanlar (sarı oklar), Ziehl-Neelsen X400, 20µm Barr, B: Aynı bölgede anti-TB negatif immunreaksiyon, ABC-P, X400, 20µm Barr. **78**
- Şekil 4.34.** 150C/921 primerleri ile yapılan PZR testi sonrası IS900 genine ait jel görüntüsü. M: marker, NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol (MAP 316F suşu), 1: sağlıklı bağırsak dokusu, 2: Tüberkülozis pozitif akciğer dokusu, 3-7: MAP pozitif örnekler (Olgu No 19-23) **79**

TABLÖLAR

Tablo 3.1.	Çalışmanın materyali olarak kullanılan dokuların hayvanlarına ait bilgiler	28
Tablo 4.1.	Olgularda belirlenen lezyonların bağırsak segmentlerine göre yerleşimi ve şiddetinin semikantitatif analiz tablosu.	43
Tablo 4.2.	Çalışma dokularındaki mezenteriyel lenf düğümlerinin belirtilen lezyonlara göre semikantitatif skorlaması.	49
Tablo 4.3.	Bağırsak segmentlerinin semikantitatif skorlamalarının istatistiksel analizi	51
Tablo 4.4.	İleumdaki semikantitatif skorlamaların istatistiksel analizi	51
Tablo 4.5.	Mononükleer hücre infiltrasyonu ve epiteloid histiyosit semikantitatif skorlamalarının ileum ile mezenteriyel lenf düğümü arasındaki istatistiksel analizi	52

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
ABC-P	: Avidin Biyotin Kompleks-Peroksidaz
ark.	: Arkadaşları
bp	: Baz Çifti
DAB	: 3,3'-diaminobenzidine
dk	: Dakika
ELISA	: Enzyme Linked Immunoassay
Fe	: Demir
g	: Gram
g	: Gravite
HAI	: Hücre Aracılı İmmunite
HEYM	: Herrold'un Yumurta Sarısı Besiyeri
IFN-γ	: İnterferon Gamma
kDa	: Kilodalton
kg	: Kilogram
MAP	: <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>
MASP	: Mannose Associated Serine Protease
MBL	: Mannoz Bağlayıcı Lektin
ON	: Olgu numarası
OPN	: Osteopontin
PBS	: Phosphate-Buffered Saline
pH	: Potansiyel Hidrojen
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RGD	: Arginin-Glisin-Aspartat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat kullanılan Poliakrilamid Jel Elektroforez
Vb	: ve benzeri

ÖZET

Keçilerin Doğal Paratüberküloz Enfeksiyonlarında Dokularda Osteopontin Ve Mannozy Bağlayıcı Lektin Düzeylerinin Patolojik Yöntemlerle Araştırılması

Paratüberküloz özellikle ruminantlarda görülen, kronik seyirli, transmural enteritisle karakterize; tüm dünyada ekonomik kayıplara neden olan bir hastalıktır. Mannozy bağlayıcı lektin; patojen etkenlerin opsonizasyonunu sağlar ve lektin yolağıyla komplement sistemi aktive ederek makrofajlar tarafından fagositozunu sağlar. Osteopontin doku bütünlüğünün korunması, rejenerasyonu, kronik ve granülomatoz yangılarda kemotaktik etki dahil birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol oynayan azot bağı glikosile proteindir, yangısal reaksiyonda makrofaj infiltrasyonunu düzenler. Çalışmada kullanılan dokuların histopatolojik, Ziehl-Neelsen ve immunohistokimyasal yöntem bulguları değerlendirilerek, semikantitatif ve istatistiksel analiz değerlendirmeleri yapıldı. Elde edilen bulgular ışığında bu çalışmada; keçilerde paratüberküloz hastalığının histopatolojisi detaylı olarak sunulurken, Osteopontin ve Mannozy Bağlayıcı Lektin'in Paratüberküloz hastalığındaki ekspresyonları, hastalığın patogeneizindeki rolleri ve bu iki markırın birbiriyle olan ilişkileri gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Histopatoloji, Keçi, Mannozy bağlayıcı lektin, Osteopontin, Paratüberküloz

ABSTRACT

Investigation of Osteopontin and Mannose Binding Lectin Levels in Natural Paratuberculosis Infections of Goats with Pathological Methods

Paratuberculosis is characterized by transmural enteritis with a chronic course, especially seen in ruminants that causes economic losses all over the world. Mannose binding lectin; that provides opsonization of pathogenic agents and provides phagocytosis by macrophages by activating the complement system through the lectin pathway. Osteopontin is a nitrogen-bound glycosylated protein that plays a role in many physiological and pathological events, including preservation of tissue unity, regeneration, and chemotactic effect in chronic and granulomatous inflammations. It regulates macrophage infiltration in the inflammatory reaction. Histopathological, Ziehl-Neelsen and immunohistochemical method findings of the tissues used in the study were recorded and semi-quantitative and statistical analysis evaluations were made. In this study; the histopathology of Paratuberculosis disease in goats was presented in detail, and the expressions of Osteopontin and Mannose Binding Lectin in Paratuberculosis disease, their roles in the pathogenesis of the disease and the relationship between these two markers were shown with using these findings.

Keywords: Histopathology, Goat, Mannose binding lectin, Osteopontin, Paratuberculosis

1. GİRİŞ

Paratüberkülozis, “Johne’s disease”, ruminantlarda görülen kronik seyirli ve ilerleyici bir hastalıktır. Dünyanın hemen her bölgesinde görülen ve hayvan ölümleri, erken kesim, hayvan itlafları ve düşük süt verimine bağlı ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Ott ve ark., 1999). Hastalık deneysel olarak at ve domuzlarda oluşturulmuş ancak tipik lezyonlar bu hayvanlarda belirgin olarak gözlenmemiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ışığında araştırmacılar Paratüberkülozisin insanlarda “Crohn’s disease” hastalığıyla ilişkili olduğunu, hastalığın insanlara da bulaşabileceği düşünülerek zoonotik hastalıklar arasında kabul edilmesi gerektiği ileri sürülmektedir (Manning ve Collins, 2001).

Lezyonların yerleşim yeri bağırsaklardır. Özellikle ince bağırsakların son kısımları ile buna yakın ileosekal valvül ve sekumda şiddetli lezyonlar görülür. Bununla birlikte ince bağırsakların başlangıç ve orta kesimleri ile kolon ve rektumda da hastalığa ait değişen derecelerde lezyonlar görüldüğü bilinmektedir (Gelberg, 2017; Hazıroğlu ve Milli, 2000).

Etken “*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*” (MAP) olarak bilinir. Toprak asiditesine dayanıklı gram pozitif çomak şeklinde bir bakteridir. Hasta hayvanın dışkı, salya ve süt gibi sekret ve ekstreleriyle etrafa yayılır. Hastalığın şekillenmesi için en erken yaş 6 aydır ancak çoğunlukla 2 yaşın altındaki hayvanlarda pek görülmez. İnkubasyon süresi oldukça uzundur. Bazı kaynaklarda hastalığın dışkı sekret ve ekskretlerin haricinde yavrulara transplasental yolla da bulaşabildiği ancak doğan yavruların çoğunlukla hastalığa ait klinik bulguları göstermediği rapor edilmiştir. Hastalık immun sistemin durumu, etkenin virulansı ve miktarına göre bazen çok geç şekillenebilir ya da hiç şekillenmeyebilir (Gelberg, 2017; Lovel ve ark., 1944; Manning ve Collins 2001).

Hayvanın etkene maruz kaldığı yaşa ek olarak alınan MAP miktarının fazlalığı da enfeksiyonun seyrini etkiler. Genel olarak, yüksek bir MAP dozu alan hayvanların enfekte olma olasılığı daha yüksektir ve düşük bir doz alanlara göre klinik aşamaya daha hızlı ilerlemeleri beklenir. Yetişkin sığırlar aşırı derecede kontamine ortamlara

maruz kalırsa, MAP enfeksiyonundaki yaşa bağlı direnç alt üst olabilir (Sweeney, 2011).

Hastalığıdaki temel lezyon bağırsaklardaki kronik transmural enteritistir. Bağırsaklar duvarı boyunca şekillenen ödem ve kronik yangı nedeniyle çepeçevre kalınlaşmış ve progresif olaylarda kronik enfeksiyon nedeniyle lümenleri daralmıştır (Cocito ve ark., 1994). Seroza yangısal hücre infiltrasyonu ve ödem nedeniyle opaklaşmış ve buzlu cam görünümünü almıştır. Mukoza kalınlaşmış, kadifeye benzer ve enine kıvrımlaşmalar nedeniyle beynin gyruslarını andıran bir görünümündedir (Gelberg, 2017; Hazıroğlu ve Milli, 2001; Whitlock ve Buergelt, 1996). Mezenteriyel lenf düğümleri ileri derecede şişkin olup hastalığın en belirgin lezyonu bağırsakların anti-mezenterik kısımlarından mezenteriyum boyunca lenf düğümlerine kadar ilerleyen beyaz opak kalınlaşmalar şeklinde belirginleşmiş lenfangitisi belgeleyen lenf damarı kalınlaşmalarıdır. İnce bağırsaklarda görülen villus atrofi ve absorpsiyon bozuklukları nedeniyle kolonlara gelen bağırsak içeriğinin emilmesi kolonun kapasitesini aşar (Cocito ve ark, 1994; Sweeney, 2011). Bağırsak villuslarından protein emilimi sekteye uğradığından kandaki protein düzeyi ve buna bağlı olarak osmotik basınç bozulur ve bu durum kanın sıvı kısmının doku aralıkları ve vücut boşluklarına geçmesine neden olur. Bununla birlikte emilim bozukluğu nedeniyle ortaya çıkan negatif enerji ve azot açığı nedeniyle yağlar hidrolize edilerek vücutta enerji amaçlı kullanılır. Yağ dokuları atrofiye uğrayarak azalır. Yağların hidrolizi sırasında ortaya çıkan su bölgedeki mukopolisakkaritlerle birleşerek jelatinöz bir görünüm alır (Jelatinöz atrofi, seröz atrofi). Devamında proteinler de sindirilerek iskelet sistemindeki kas kütlelerinde azalma ve şiddetli bir kaşeksi oluşur (Chiodini ve ark., 1984; Clarke, 1997; Gelberg, 2017; Hazıroğlu ve Milli, 2001).

Hastalığa ait tipik bulgular çoğunlukla sığırlarda belgelenmiştir. Ancak koyun ve keçilerde bazı farklılıklar dışında benzer lezyonlar gözlenir. Klinik bulgular ile lezyonların şiddeti ya da tipi her zaman birbirine paralellik göstermez. Bu nedenle klinik bulguları tipik olan hayvanlarda bazen patolojik lezyonlar belirgin bir şekilde gözlenemediğinden teşhiste zorluklarla karşılaşılabilir. Sığırlarda bağırsak lezyonları granülomatöz enteritis olarak seyreder. Epiteloid histiyosit artışı en bilinen lezyondur. Ancak kazeifikasyon ya da mineralizasyon görülmez. Langhans tipi dev hücreleri ise

genellikle azdır (Hazıroğlu ve Milli, 2001; Ott ve ark., 1999; Sweeney, 2011). Buna karşın koyun ve keçilerde granümatöz yangıda zaman zaman kazeifikasyon ve mineralizasyon görülmekle beraber Langhans tipi dev hücresi de oldukça fazladır. Lenf damarları ve lenf düğümlerindeki lezyonlar bağırsaklardaki lezyonlara paralel seyreder ve çoğunlukla granümatöz lenfangitis ve lenfadenitis şeklindedir (Chiodini ve ark., 1984; Clarke, 1997; Sweeney ve ark., 2012). Hastalığın ayırıcı tanısında dikkat edilmesi gereken en önemli hastalık, lezyonları bu hastalığa çok benzeyen ve generalizasyon sırasında bağırsağa yerleşen bağırsak tüberkülozudur (Collins, 1996). Histopatolojik olarak Tüberkülozis lezyonlarının bağırsak boyunca diffuz olarak görülmemesi ve reaktif bağ doku proliferasyonunun fazla olması ve Paratüberküloziste bağırsak mukozasında ülserlerin Tüberküloziste olmaması ile bu hastalıklar birbirlerinden ayrılır. Teşhiste altın standart etken izolasyonudur (Collins, 1996; 2011). Bunun dışında histopatolojik bulgular, Ziehl-Neelsen boyama metodu ile asit-fast pozitif olan etkenlerin demonstrasyonu ve immunoperoksidaz ya da immunfloresan yöntemleri teşhiste önemli kriterlerdir. Bunlarla beraber etken Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile gösterilebilir (Chaturvedi ve ark., 2017). Patojenitesi Tüberküloziste olduğu gibi tam olarak açığa çıkarılamadığından etkin bir tedavi yöntemi henüz bulunamamıştır ancak semptomatik tedavi yapılabilir (Collins, 1996; Fecteu ve Whitlock, 2011). Hastalığın önlenmesi için kullanılabilir bilinen etkin bir aşı henüz yoktur ancak aşı ile ilgili çeşitli çalışmalar devam etmektedir (Windsor, 2013).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Paratüberkülozis

2.1.1. Etiyoloji

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* (MAP), ruminantlarda görülen Paratüberkülozis hastalığından sorumlu etkindir. Mycobacterium ailesinin bir üyesi olan bakteri 0,5 ila 1,5 µm boyutlarında, aside dirençli olması, hücre zarlarının mikolitik asit ve yüksek genomik C + G içeren (% 61-71) bir yapıya sahiptir. Watson-Reid agar plakalarında veya yaygın olarak kullanılan HEYM (Herrold'un yumurta sarısı besiyeri) plakalarında, pigmentsiz pürüzlü koloniler oluşturur. Besiyerlerinde yavaş gelişen ve zor üreyen bir bakteridir. Katı besiyerinde görünür koloni oluşumu, farklı takviyeler yapılmadığında 4 aya kadar sürebilir (Chiodini ve ark., 1984; Merkal ve ark., 1974). Son yıllarda yapılan bir çalışmaya göre 130'un üstünde tür ve alt tür içeren geniş bir aileden oluştuğu bildirilmiştir (Turenne ve ark., 2007). Beard ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada MAP gevişgetiren hayvanların yanı sıra, kuşlar, tavşanlar, tilkiler ve porsuklar dahil olmak üzere çok çeşitli konakçı türleri enfekte edebildiği bildirilmiştir (Beard ve ark., 2001).

Büyüme için metallere bağımlılık tüm bakteriler için ortak iken, patojenik mikobakterilerin demir gereksinimi, bu metalin alınması ve kullanılması için organik bir kaynağa ihtiyaç duyulması bakımından kendine özgüdür. Kompleks demir, sideroforlar tarafından şelatlanır ve hücre membranından geçerek ve endositik vakuoller halinde bulunur (Cocito ve ark., 1994).

İki tür siderofor bilinmektedir, mikobaktinler ve ekzokelinler: birincisi iç kenetleme ajanları ve ikincisi dış vektörlerdir. Ekzokelinler, hücre dışı sıvıda bulunan küçük protein molekülleridir. Demir eksikliği durumunda yüksek konsantrasyonlarda salınır. Yağda ve suda çözünür ekzokelinler tanımlanmıştır. Hayvanlarda, demir iyonunun ana depolama şekli ferritindir ve bu metal için taşıma molekülleri transferrin ve laktoferrindir. Mikobakteriyel ekzokelinler, Fe⁺³'ü bu hayvan şelatörlerinden çıkarır ve bakteri hücre duvarı boyunca taşır. Şelatlı metalin hücre içi mikobaktin ile

değişimi daha sonra gerçekleşebilir, böylece mikobakterilerde bulunan demir depolama formu oluşur. Mikobaktinler, Fe^{+3} 'ün koordineli olarak bağlı olduğu bir çekirdek ve farklı uzunluklarda alkil yan zincirleri içeren yüksek moleküler ağırlıklı kompleks lipidlerdir. Suda çözünmeyen bu yüksek hidrofobik yapılar hücre zarı tarafından sınırlandırılır. Mikobaktinler mikobakterilere ve *Nocardia* etkenlerine özgüdür. Bu nedenle taksonomik önem taşır. Bununla birlikte yalnızca mikobakteriler hem mikobaktinleri hem de ekzokelinleri içerir. Çoğu *M. paratuberculosis* suşunda ve bazı *M. avium* izolatlarında mikobaktin bulunmaması ilgi çekicidir. Bu suşlar, in vitro proliferasyon için eksojen bir mikobaktin takviyesi gerektirirken, doğal konakçılarda serbestçe çoğalırlar (Barclay ve ark., 1983, Barclay ve ark., 1985, Cocito ve ark., 1994, Merkai ve ark., 1974). Mikobaktin bağımlılığı daha sonradan ağaç güvercinlerinde de bulunduğundan *M. avium*'a özgü olma niteliğini yitirmiştir. Şüpheli bir hayvandan alınan örneklemeler tek bir test yardımıyla izole ve tanımlanamaz. Bunu yanında büyüme faktörleri, büyüme inhibitörleri, spesifik enzimler, lipid ve şeker bileşenleri, protein profilleri, DNA analizi ve konakçı aralığı patojenitesi gibi kriterlerin de incelenmesi gerekir. O nedenle bir etken *M. paratuberculosis* teşhisi koymak oldukça zor bir süreci gerektirir (Brennan, 1986; Minnikin ve Goodfellow, 1980; Thoen ve ark., 1971).

Hücre aracılı immünite (HAI) tepkisinin geliştirilmesi, hücre içi MAP'e karşı savunmada konakçı için gereklidir ve antikorlar tespit edilmeden önce enfeksiyonun erken bir aşamasında ortaya çıkar. Hastalık subklinikten kliniğe doğru ilerledikçe HAI tepkisi azalır ve yerine antikor oluşumu ile karakterize güçlü bir humoral bağışıklık şekillenir (Chiodini, 1996; Mikkelsen ve ark., 2011; Stabel, 2000).

Antikorlar, hayvanı hücre içi patojene karşı korumaz ve bağışıklık sisteminin enfeksiyon bastırmasının son aşamalarında bir alerji durumu meydana gelebilir (Waters ve ark., 1999). MAP ile enfekte hayvanların teşhisi genellikle süt veya serumdaki antikorların saptanmasına veya dışkıdan bakteri izolasyonuna dayanır, ancak bu teşhis yöntemleri genellikle hastalığın ileri bir aşamasında enfeksiyondan yıllar sonrasına kadar uygulanamaz (Nielsen ve Toft, 2006). Bunun tersine, HAI tabanlı teşhisler enfeksiyonun erken aşamasında, antikor oluşumu ve dışkıda bakteri görülmesinden önce uygulanabilir. Bu nedenle, çeşitli tanısal test stratejileri

kullanarak, MAP ile enfeksiyonu hastalığın farklı aşamalarında tespit etmek mümkündür (Mikkelsen ve ark., 2011).

2.1.2. Tarihçe

Mycobacterium türlerinin oluşturduğu bilinen hastalıklarla ilgili ilk bulgular, milattan önceye dayanmaktadır. Milattan önce 5000 yılına ait fosil kemiklerde Tüberkülozis ile ilgili kemik deformiteleri bulunmuştur. Bunun yanı sıra Mısır'da Tüberkülozisli iyi korunmuş mumyaların bulunduğu da bildirilmiştir (Murray, 2004). Mısır, Yunan, Roma gibi antik kentlerden çıkarılan buluntular *Mycobacterium*'un eski ve yaygın bir hastalık olduğunu göstermiştir (Behr ve ark., 2020).

Sanayi devriminde artan işçi gereksinimi nedeniyle şehirlerdeki kalabalığa bağlı olarak 1800'lü yılların sonuna doğru bakterinin neden olduğu hastalıkları yaygınlaştırmıştır. İngiltere kiliselerinin cenaze kayıtları New England'daki dört ölümden birinin nedeninin Tüberkülozis olduğunu ortaya koymuştur. Bulaşmanın ve ölümlerin artması, gelişmekte olan bilimin bu bakteri türü üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur (Murray, 1989).

Tüberkülozisle ilgili artan araştırmaların ve bilimsel gelişmelerin paralelinde 1807 yılında Edward Skellet ve 1829'da W.A. Cartwright, birbirilerinden farklı zamanlarda fakat aynı şekilde sığırlarda “zayıflama” ve “verem benzeri” bir hastalık tanımlamışlardır. Hurtrel d'Aroval'in 1826 yılında “ince ve kalın bağırsakların mukoz membranlarında kalınlaşma ile ilişkili kronik diare” tanımlaması ise bugünkü bildiklerimize göre Paratüberkülozisle birebir uyumludur. Paratüberkülozis hastalığına ismini veren ise 1895 yılında Johne ve Frothingham olmuştur. Bu iki bilim insanı, bir çiftçi tarafından Dresden'daki Veteriner Patoloji birimine getirilen, tüberkülin deri testi negatif çıkmış bir sığıra ait gastrointestinal sistem organlarının incelemesini yapmış, intestinal mukozada kalınlaşma ve büyümüş mezenteriyal lenf düğümü lezyonlarını görmüşlerdir. Detaylı incelemeler sonunda yangılı dokularda asit-fast bakteri olduğunu tespit etmişlerdir. Bağırsak Tüberkülozisinden şüphelenen araştırmacılar, izolatu kobaya inokule etmiş, bakterinin hastalık oluşturmadığını görmeleri üzerine hastalığın Avian Tüberkülozis basili olabileceğini düşünerek

“pseudotuberculosis enteritis” olarak isimlendirmişlerdir (Chiodini, 2005; Johne ve Frothingham, 1895).

Hastalık 1902 ile 1908 yılları arasında Danimarka, Almanya, Fransa, Norveç, Hollanda, Belçika, İsviçre ve Birleşik Devletler’de bildirilmiştir (Chiodini ve ark., 1984).

Twort 1910’da hastalığın etkenini izole etmeyi başarmış ve etkenin “*Mycobacterium enteritis chronicae pseudotuberculosis bovis johne*” olarak isimlendirilmesini önermiştir (Chiodini, 2005).

Bergey’in Mikrobiyoloji Nomenklatür El Kitabı’nın 1923 yılındaki ilk baskısında Bang ve Holth’un, Paratüberkülozis hastalığının etkeninin “*Mycobacterium paratuberculosis*” olarak isimlendirdiklerini belirtilmektedir (Chiodini, 2005).

Mycobacterium paratuberculosis 1984 yılında Crohn hastalığı olan insanlardan izole edilerek Paratüberkülozis ve Crohn hastalığı arasındaki ilk fiziksel kanıt bulunmuştur. Bunun gibi araştırmalar sayesinde 1990 yılına kadar bakteri ve oluşturduğu hastalıkla ilgili birçok gelişme kaydedilmiştir. Bu süre zarfında makul düzeyde gözlem ve deneysel çalışma yapılmış, çeşitli tanısal test kiti geliştirilmiş, deney hayvanlarında duyarlılık, bulaşma, aşı ve direnç testleri yapılmıştır (Chiodini, 2005).

Marie Thorel ve arkadaşları *Mycobacterium tuberculosis*’in matrix analizini yaparak, *M.avium* kompleksine dahil olduğunu bulmuşlardır. Bu bilim insanları bakterinin isimlendirmesinin *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* olarak değiştirilmesini önermişler ve Uluslararası Mycobacterial Taksonomi Grubu tarafından geniş ölçüde kabul edilmesini sağlamışlardır. Çoğu araştırmacı bu yıldan sonra isimlendirmeyi bu şekilde kullanmayı uygun bularak nomenklatüre geçmesini sağlamışlardır (Murray, 2004).

Günümüze kadar MAP ile ilgili teşhis, tedavi ve korunmayla ilgili çok sayıda klinik, mikrobiyolojik, patolojik ve immunohistokimyasal çalışmalar yapılmıştır. (Dagleish ve ark., 2010; Fectau ve Whitlock, 2011; Manning ve Collins, 2001; Şababoğlu ve Türütoğlu, 2017).

2.1.3. Epidemiyoloji ve Patogenezis

Koyun ve keçilerde paratübekülozis *M. avium* subspecies *paratuberculosis* türlerinin koyun tipi “S” ve Bizon tipi “C” suşları tarafından oluşturulan bağırsak ve lenfoid organların kronik enfeksiyonu olarak bilinir (Kumar ve ark., 2010; Windsor, 2015). “S” suşu genellikle koyun ve kıl keçilerini enfekte ederken “C” süt keçilerini enfekte etmektedir (Windsor, 2015). Sığırlar “S” suşuna karşı dirençli olmalarına rağmen Avustralya’da şiddetli enfeksiyona sahip koyunlarla temas eden buzağların da enfekte olduğu tespit edilmiştir (Moloney ve Whittington, 2008). “S” suşunda bağırsak ve lenf düğümlerinde granulomatoz lezyonların olduğu ve şiddetinin zamanla değişmediği bildirilirken C tipi ile enfekte hayvanlarda hafif enfeksiyonlarda hücresel yanıtın çok şiddetli olduğu ancak enfeksiyonun şiddetinin zamanla azalarak fibrozisle sonuçlandığı bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında konakçı yanıtının şekli ve yanıtında suşun önemli bir rolü olduğu düşünülmüştür.

Enfeksiyonun bulaşması 3 şekilde olabilmektedir. Birinci yol enfekte hayvanların dışkı, salya ve idrarlarının toprağı, barınakları ve merayı kontamine etmesi ve enfekte hayvanlarla sağlam hayvanların birbiriyle olan teması şeklinde olmaktadır. Bu konu ile ilgili Avustralya’da karantina ve ihtilaf yapılmasına rağmen, meraların temizlenmesi ve hastalığın eradikasyonu gibi çabaların yetersiz kaldığı bildirilmiştir. İkinci yol ise enfekte süt ve kolostrumun tüketilmesi ile olmaktadır. Bu yolla bulaşma ile hastalığın erken yaşlarda çıkması arasında bir korelasyona rastlanılmamıştır. Bununla beraber klinik bulguların ortaya çıkması ve belirlenmesinde gecikmeler olduğundan, ya da kuzu eti tüketimi fazla olan yerlerde lezyonlar tam şekillenmediğinden erken yaşlarda ortaya çıkmasında etkili olup olmadığı netleşmemiştir. Hastalığın bulaşmasında diğer bir yol prenatal dönemdir. Enfekte koyunların bazılarında yapılan nekropsilerde ya da aborte fötüs dokularında etkene rastlanmakla beraber çoğu zaman lezyon tespit edilememiştir. Avustralya’da yapılan

bir çalışmada intrauterin bulaşma sonucunda bütün kuzularda enfeksiyon tespit edilmiş, bunlardan büyük bir kısmının subklinik, çok azının ise klinik bulgu gösterdiği tespit edilmiştir. Kuzularda erken yaşlarda hastalığa ait klinik bulguların şekillenebileceği düşünülmüş ancak erken enfeksiyona dair çok az bilgi edinilmiştir. Bu nedenle enfeksiyonun devam etmesinin önlenmesinde özellikle doğurganlık oranı yüksek olan koyunlar başta olmak üzere dışkı ile yoğun miktarda etken atan koyunların ihtilafının hastalığın yayılmasında ve çevresel kontaminasyonun önlemek adına önemli bir tedbir olabileceği düşünülmüştür (Lambert ve ark., 2004; Whittington ve Windsor, 2009).

Uzun zamandır tartışılan ve tereddütlerle karşılaşılan diğer bir durum ise MAP'ın insanlara bulaşıp Crohn's hastalığına sebep olabileceği ihtimalidir. Bu nedenle bulaşmanın önlenmesi, hasta hayvanların ihtilaf edilmesi, et, süt ve süt ürünlerinin iyi sterilize edilmesi gerekmektedir (Windsor, 2015).

Koyunlarda multibasiller, paucibasiller ve asemptomatik form olmak üzere hastalığa ait üç form bildirilmiştir. (Gillan ve ark., 2010). Multibasiller form kronik granulomatoz enteritis ve lenfadenitis ile seyreden lamina propria ve submukozada çok sayıda sitoplazmalarında yoğun etken bulunduran epitelioid histiyosit birikimleri ile karakterizedir. Paucibasiller formda ise lamina propria ve submukozadaki lezyonların hücresel kompozisyonu daha çok lenfositik karakterde olup az sayıda etken içerir (Windsor, 2014).

Hayvan ağızdan MAP etkenlerine maruz kaldığında, organizmalar konakçıyı 2 ayrı giriş kapısı yoluyla enfekte edebilir. Buzağılarda yapılan bir deneysel çalışmada yüksek dozda MAP alımında maruziyetten kısa bir süre sonra etkenin retrofarengeal lenfoid dokuda görülmesinin MAP organizmalarının konakçıyı tonsiller yoluyla enfekte edebileceği şeklinde yorumlanmıştır (Payne ve Rankin, 1961).

Yapılan başka bir deneysel çalışmada ise MAP'ın tonsil kriptlerine doğrudan inokulasyonun da enfeksiyonla sonuçlanabildiği gösterilmiş, MAP'ın buradan, hematojen veya lenfojen yolla mezenterial lenf düğümlerine ve ileuma yayılabileceği düşünülmüştür. Bununla birlikte, daha az miktardaki MAP dozları veya doğal olarak

enfekte ineklerin doku homojenatlarını kullanan deneysel çalışmalardan elde edilen çoğu kanıt, ileumun ana giriş kapısı olduğunu işaret etmektedir (Buergelt ve ark., 1978; Gilmour ve ark., 1965; Sweeney ve ark., 2006).

Peyer plaklarının üzerinde bulunan özelleşmiş non-villöz epitel dokusu arasındaki “M” hücreleri MAP’ın bağırsak mukozasına geçişini sağlar. MAP etkenleri M hücreleri tarafından alınarak submukozaya herhangi bir değişim olmaksızın aktarılır. Burada MAP etkenleri, fagositoz yoluyla girdikleri makrofajlar tarafından yıkımlanır. Deneysel bir çalışmada, MAP etkenleri buzağıların ileumuna doğrudan inokule edilmiş ve 5 saat sonra submukozal makrofajlarda etkene rastlanmıştır (Momotani ve ark., 1988). Bu noktada, hayvanın MAP enfeksiyonu açısından konakçının kaderi henüz kesinleşmemiştir. Makrofajlar fagositoz edilen MAP etkenlerini öldürmede başarılı olursa enfeksiyon engellenebilir. Bununla birlikte, MAP etkenlerinin makrofajlar içinde hayatta kalma konusunda benzersiz bir yeteneği vardır ve Paratüberkülozisin kronik ilerleyici doğasının merkezinde yatan da bu özelliğidir. Böylelikle konak savunma mekanizmaları ile patojen çoğalması arasında uzun süreli bir çekişme başlar (Sweeney, 2011).

Çoğu hücre içi patojende olduğu gibi makrofajlar tarafından fagosit edilen MAP organizmalarının öldürülmesi, enfeksiyonuna karşı şekillenen konakçı savunmasının ilk aşaması için kritiktir. Fagositoz sonrasında Th1 tipi T yardımcı lenfositler tarafından üretilen interferon-gamma gibi sitokinler makrofajları aktive ederek, fagositize MAP organizmalarının öldürülmesini artırır (Zurbrick ve ark., 1988). Enfeksiyona maruz kalan bazı hayvanların hastalığı elimine etmesi bu yolla olmaktadır. Böylece hastalığın klinik bulguları ilerlemeden sona ermektedir. Bununla birlikte birçok hayvan hastalığı elimine etmekte başarısızdır ve mikroorganizmalar bu hayvanlarda canlı kalmaya devam eder. Hücre içi hayatta kalma mekanizması tam olarak anlaşılmamış olsa da MAP’ın makrofaj içindeki fagositik vakuoln olgunlaşmasını ve asitleşmesini önlediği ve böylece lizozomal enzimlerle oksijen türevi serbest radikallerin bakteriyosidal etkilerinden kurtulduğu düşünülmektedir (Hostetter ve ark., 2003). Genellikle enfeksiyonun erken döneminde, hastalığa yenilmesi muhtemel hassas hayvanlarda bile, konakçı savunma hücreleri etkeni içerebilmekte, MAP’nin bağırsak ve bağırsakla ilişkili lenfoid doku içinde yavaş bir

şekilde proliferasyonuna ve yayılmasına izin vermektedir. Bu erken, "kontrollü" enfeksiyon, 2 veya daha fazla yıl sürebilen uzun bir "tutulma evresi" ile sonuçlanır. Bu süre boyunca, hayvan hiçbir klinik belirti göstermez, üretim veya kilo alımı bakımından kayda değer bir kayıp yoktur. MAP'ın fekal yolla saçılması ve serum antikorlarının oluşumu genellikle saptanamaz. Enfeksiyonun bu aşamasında pozitif hayvanları tespit etmenin tek güvenilir yöntemi, kültür veya PZR ile MAP tespiti için ileum veya mezenterik lenf düğümünden numune almaktır. Etken enfeksiyonun erken aşamalarında kontrol altına alınabilse de, bu durum sonrasında konakçının aleyhine döner. Bağırsak submukozasında ve mezenteriyel lenf düğümlerinde MAP antijenlerinin varlığı yangısal yanıtı uyatarak konağın enfeksiyonu kontrol altına alma çabasını teşvik eder. Bölgeye makrofajlar ve lenfositler çekilir ve çok çekirdekli dev hücreler, epiteloid histiyositler, lenfositler ve makrofajlardan oluşan granülomlar meydana gelir. Enfeksiyonun erken evresinde, bu lezyonların şiddeti sınırlı ve lokalizedir. Aslında bu yanıt MAP'nin ilk enfeksiyon bölgelerine tutulmasına yardımcı olur (Gonzalez ve ark., 2005).

Aside dirençli organizmalar içeren makrofajlar bu erken fokal lezyonlarda seyrektiler. Bununla birlikte, enfeksiyon yavaş da olsa ilerledikçe, mikroorganizma dokuya yayılır ve lezyonlar daha şiddetli hale gelir ve sonunda hastalığın klinik tablosu ortaya çıkar. Granülomatöz yanıt başlangıçtan itibaren MAP etkenlerini içerir, ancak klinik belirtilerin ortaya çıkmasının nedeni granülomatöz yangının neden olduğu "kollateral hasar" olarak kabul edilir (Sweeney, 2011).

Granülomatöz yangısal yanıt, özellikle ince bağırsakta ve ilişkili lenf düğümlerinde mukozal yapıyı ve işlevi bozarken, MAP yüklü makrofajları bağırsak ve bağırsakla ilişkili lenfoid doku ile sınırlamaya hizmet eder. Bu süreçle, MAP ve konağı, dışarıdan hiçbir hastalık belirtisi olmaksızın uzun yıllar bir arada var olabilir, Ancak MAP kontrol altına alınmasına rağmen öldürülmez. Zamanla ve yeterince açıklığa kavuşturulamayan nedenlerle enfeksiyon bir üst seviyeye taşınır. Enfeksiyonu kontrol altına almakla sorumlu olan hücre aracılı bağışıklık azalmaya ve enfeksiyon daha hızlı ilerlemeye başlar. Enfeksiyonun bu "kontrol" kaybı, genellikle makrofaj aktivasyonu (gamma interferon) ile ilişkili sitokinlerin baskın olduğu Th1 tipi bir bağışıklık tepkisinden spesifik hücre aracılı bağışıklığın azalmasıyla birlikte antikor

üretiminin başlamasıyla ilişkili olan IL-4 ve IL-10 gibi sitokinlerin baskınlığı ile karakterize Th2-tipi bir bağışıklık tepkisine geçiş ile ilişkilidir (Stabel, 2000a; 2000b; Sweeney ve ark., 2000). Bağışıklık yanıtındaki değişimin nedeni veya tetikleyicisi bilinmemektedir, ancak ortaya çıktıkça enfeksiyon daha hızlı ilerler (Sweeney, 2011).

Enfeksiyonun bu bağışıklık “kontrol” kaybıyla, enfekte hayvanın dışkıında giderek artan miktarlarda MAP görülmeye başlar ve MAP etkenleri uterusu (transplasental yolla yavruya geçer), meme bezlerine, kas dokusuna ve diğer iç organlara yayılır (Sweeney ve ark., 1992; Streeter ve ark., 1995).

Bu aşamada, hayvan hala herhangi bir klinik hastalık belirtisi göstermiyor olabilir ve çoğu durumda ELISA ile saptanabilen antikorların gelişimi, dışkıdan etken atımı başlayana kadar gerçekleşmez (Sweeney ve ark., 2006). Ancak klinik belirtiler ve antikor gelişimi tespit edilmediği durumlarda bile süt verimi ve infertilite yönünden olumsuz etkilerin görülebileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Dışkıyla etkenin atıldığı ve antikorların geliştiği enfeksiyonun subklinik evresinde süt ve üreme kondüsyonlarında verim kaybı olduğu açıkça belli olmasına karşın süt üreticilerinin bunu farketmesi oldukça zordur (Gonda ve ark., 2007; Nielsen ve ark., 2009).

MAP'ın dışkıyla atılması ve serum antikorlarının tespit edilebilir olmasından sonra Paratuberculosis'in belirgin klinik belirtileri ortaya çıkar. Enfeksiyonun başlangıcından MAP'ın ilk tespit edilebilir dışkı ile etken atımına kadar geçen süre oldukça değişken olduğu gibi (genellikle 2 yıldan fazla) asemptomatik olarak dışkı ile etken atımı aşamasının süresi de oldukça değişkendir. Bazı hayvanlar, ilk dışkı ile etken atılımından sonraki 6 ay içinde hızla klinik aşamaya geçerken, bazı hayvanlarda asemptomatik dışkı atılımı, klinik hastalığa ilerlemeden birkaç yıl devam eder (Sweeney, 2011)

MAP enfeksiyonu ilerledikçe bağırsaklardaki ve mezenteriyel lenf düğümlerindeki lezyonlar daha şiddetli hale gelir. Fokal veya multifokal lezyonlardan ziyade granülomatöz tarzındaki infiltrasyonlar, jejunum, ileum, sekum ve daha az olarak da kolonu etkileyerek diffüz hale gelir. İnce bağırsağın, özellikle ileumun serozası, masif hücresel infiltrasyon nedeniyle kalınlaşır ve bağırsak villusları kütleşir, kısalır

ve kalınlaşarak absorptif etkinliklerini azaltır. Granüloamatöz lenfadenit, lenfangioektazi ve bağırsak lümenine fistülleşmesi nedeni ile laktallerin yırtılmasına neden olur. Sığırlarda, MAP organizmalarıyla yüklü makrofajlar genellikle lezyonlar içinde bol miktarda bulunur (Zurbrick ve ark., 1988). İleum merkezli granüloamatöz yangı, aynı zamanda diğer ince ve kalın bağırsak bölümlerini de kapsayarak, malabsorpsiyon, diyare ve protein kayıplı enteropati sebebiyle hipoproteinemiye neden olur. Sığırlarda ayırt edici klinik belirti sulu “boru akıntısı” tarzındaki ishaldir. Dışkıda gözle görülür kan veya mukus yoktur ve tenesmus gözlenmez. Sulu dışkıya rağmen, susuz kalınmaz, çünkü artan dışkı miktarına göre kaybedilen suyun telafisi için artan su tüketimi oluşabilir. Hayati belirtiler normaldir ve hayvanın iştahı hastalığın son aşamalarına kadar iyi kalır (Sweeney, 2011).

Bazı durumlarda, hastalığın erken klinik aşamalarında dışkı birkaç hafta veya ay boyunca normal kıvamına dönebilir ve ardından ishal tekrar başlayabilir. Paratuberküloz hastalığının klinik belirtileri doğum stresi ve erken laktasyonun ardından şiddetlenebilir, ancak deneysel olarak kortikosteroid uygulamasıyla klinik belirtileri hızlandırmaya yönelik girişimler genellikle başarılı olamamıştır. Kilo kaybı genellikle ishale eşlik eder ve plazma protein konsantrasyonu düştükçe, özellikle göğüs bölgesi veya submandibuler alan (“şişe çene”) gibi bölgelerde deri altı ödem gelişebilir. Süt üretimi % 20 veya daha fazla azalır ve son aşamalarda neredeyse sıfır olabilir. Hastalığın bu ileri evresinde, MAP organizmalarının bağırsak dışı bölgelere metastazı sıklıkla meydana gelir ve bu vakaların % 40 veya daha fazlasında intrauterin fetal enfeksiyon meydana gelir. Klinik belirti gösteren hayvanlar tarafından MAP'nin büyük miktarlarda dışkı ile saçılması önemli çevresel kontaminasyona neden olur. Tipik klinik belirtiler fark edildikten sonra çoğu hayvan itlaf edilir, ancak sürüde kalmasına izin verilirse hayvan kaşeksi ve dehidrasyon nedeniyle agoniye girer ve ölür (Sweeney, 2011).

Koyunlarda MAP enfeksiyonunun patogenezi ve ilerlemesi iyi çalışılmıştır. Sığırlarda olduğu gibi, enfeksiyonun yaşamın erken dönemlerinde ortaya çıktığı ve kuzuların oldukça duyarlı olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, sığırlarda olduğu gibi, yaşa bağlı direnç ile yoğun MAP maruziyetinde bile hastalığın üstesinden gelinebildiği görülmektedir. Rutin üretim koşulları altında yetiştirilen doğal MAP

enfeksiyonuna maruz kalan koyunlarda ince bağırsak ve mezenterik lenf düğümü biyopsilerini içeren yeni bir çalışma, sürekli veya tekrarlanan etkene maruz durumunda 9 ay ile 36 ay arasında sabit bir oranda yeni enfeksiyonlar meydana geldiğini göstermiştir. Koyunlarda, lenfositik infiltrasyon ve az sayıda aside dirençli bakteri ile karakterize edilen paucibasiller bir enfeksiyon formu tarif edilmektedir. Bu enfeksiyon şekli, MAP enfeksiyonunun hücre aracılı bağışıklık kontrolünü destekleyen Th1 tipi bir bağışıklık tepkisi ile ilişkilendirilmiştir. Paucibasiller enteritisli koyunlar, multibasiller enterite (çok sayıda aside dirençli organizmalar, makrofajlar ve granülomatöz reaksiyon veya lepromatöz form ile karakterize) ilerleyebilir veya bazı durumlarda iyileşebilir (Dennis ve ark., 2011; Perez ve ark., 1999).

Etkenin tespitinden sonraki 6-12 ay içerisinde zaman zaman şiddetli zaman zaman ise hafif ya da paucibasiller enfeksiyonlar gözlenir. Bazı koyunlar, özellikle *M. avium* subspecies *paratuberculosis* enfeksiyonunun erken evrelerinde enfeksiyonu geçici veya hatta kalıcı olarak temizleyebilmesine rağmen, klinik belirtiler genellikle şiddetli multibasiller enteritin gelişmesini takip eden aylarda belirgin hale gelir (Dennis ve ark., 2011). Mortalite %5-15 arasında seyretmekte olup morbidite çevre şartlarına göre değişkenlik göstermektedir (Begg ve Whittington, 2010).

Paucibasiller enfeksiyonda baskın olan hücre tipi lenfositler olup, t-helper 1 aracılı güçlü hücresel immun yanıtı sorumludur (Clarke, 1997). Multibasiller enfeksiyonda ise baskın olan hücre tipi makrofaj ağırlıklı olup t-helper 2 aracılı humoral yanıtı sorumludur ve bu lezyonlarda hücresel yanıtın zayıf olduğunu gösterir. Asemptomatik tipte ise immun yanıt paucibasiller ile enfeksiyon yönünden negatif olan hayvanların arasındadır (Dennis ve ark., 2011).

2.1.4. Klinik Bulgular

Enfekte hayvanlar klinik semptomlarına, dışkıdaki bakteri miktarına ve hayvanların verdikleri immunolojik cevaba göre 4 gruba ayrılırlar (Whitlock ve Buerge, 1996):

1. Sakin form
2. Subklinik form
3. Klinik form
4. İleri klinik form

Sakin formda klinik belirti, kondisyon ya da kilo kaybı gibi belirtiler bulunmamaktadır. Dışkıda bakteri veya kan dolaşımında bakteriye karşı antikor tespit edilememektedir. Hastalık ancak interferon gamma (IFN- γ) yanıt testi ile tespit edilebilir (Chiodini ve ark., 1984; Whitlock ve Buergelt, 1996).

Subklinik hastalık formunda hastalığa ait klinik bulgular görülmemektedir. Ancak hayvanın dışkısında az miktarda bakteri bulunabilmekte, kan dolaşımında hücrel ve humoral immün yanıtla ait bulgular tespit edilebilmektedir (Whitlock ve Buergelt, 1996).

Hastalığın klinik formunda en belirgin bulgu; hayvanlarına normal yem alımlarına karşın kilo kaybetmeleridir (Stehman, 1996). Sığırlarda görülen belirtilere karşın keçilerde ishal nadiren görülmektedir (Manning ve Collins, 2001). Bu aşamada bakteriler tipik olarak dışkıda görülür. Hayvanlarda genellikle MAP'a karşı oluşmuş antikorlar mevcuttur. Eğer bu aşamadaki hayvanlar itlaf edilmezlerse hastalık 4. aşamaya geçer (Whitlock ve Buergelt, 1996).

Hastalığın ileri klinik formunda hayvanların derilerinde pullanmalar, kıllarında cansız görünüm ve ilerleyen zayıflık, dehidrasyon, submandibular ödem, anemi ve depresyon görülür. Enfeksiyonun bu aşamasında yumuşak dışkı veya ishal görülebilir (Chiodini ve ark., 1984; Whitlock ve Buergelt, 1996).

2.1.5. Makroskopik Bulgular

Paratüberkülozis hastalığındaki makroskopik lezyon, ileum, sekum ve proksimal kolonun kronik, segmental kalınlaşmasıdır. İleosekal valvül bölgesi genellikle etkilenir. Etkilenen segmentler, genellikle birden fazla ülserasyon odağıyla birlikte değişken şekilde kalınlaşmış, pürüzlü, buruşuk bir mukozaya sahiptir ve dilate ya da kalınlaşmış serozal lenf damarları yaygın şekilde gözlenir. Kalınlaşması belirgin olan segmentlerdeki kıvrımlar çekmeyle düzelmez. Görülen kalınlaşma bağırsağın mukoza ve submukozasında kronik yangısal hücrelerin birikmesi ve ödemden ileri gelmektedir. Keçilerde bahsedilen bu kalınlaşmaların daha az şiddetli halleriyle keçilerde nadiren ve şiddetli hastalık durumlarında karşılaşılır, çoğunlukla nekropside rastlantısal olarak görülür ve çoğu zaman gözden kaçır. Mezenterik lenf düğümleri şişkin, solgun ve ödematözdür. Küçük ruminantlarda bağırsaklar bazen belirgin derecede kalınlaşır, lenfatikler ise kordon benzeri kalınlaşmalar gösterir. Keçilerde nodüler tarzda bağırsak lezyonları ve lenf düğümlerinde kazeifikasyon ve mineralizasyon odakları görülebilir. Etkenin pigmentli suşu ile enfekte olan koyunlarda mukoza ve lenf düğümleri turuncu olabilir. (Brown ve ark., 2006; Gelberg, 2017; Olsen ve ark., 2002)

Lezyonlar en belirgin olarak ileumun distalinden ileosekal valvüle kadar olan bölgededir. Çok az vakada kalın bağırsak lezyonları bildirilmiş ve duodenumda lezyon görülmediği kaydedilmiştir. Bazı deneysel çalışmalarda ilginç olarak duodenumdan anüse kadar şiddetli lezyonların görüldüğü de kaydedilmiştir. İntestinal mukoza düzensiz yüzeyli ve kalınlaşmış olup subserozal lenfatikler belirginleşmiş ve dilate durumdadır. İskelet kasları ve yağ dokusu atrofisi de belirgindir. Bazı vakalarda alopesi, endokardiyal ya da aortik kalsifikasyon belirlenmiştir. Görülen klinik vakaların bağırsak lezyonlarının histopatolojik şiddetiyle uyumlu olmadığını belirtmiştir (Chiodini ve ark., 1984).

2.1.6. Mikroskopik Bulgular

Hafif şiddetteki lezyonlarda villoz lamina propria ve lenf düğümlerinin parakortikal bölümlerinde tek tük Langhans tipi dev hücreleri görülür. Orta şiddetteki

lezyonlarda lamina propria ve submukozada, lenf düğümlerinin subkapsular sinusları ve parakortikal alanları ve karaciğerde küçük gruplar halinde makrofajlar ve Langhans tipi dev hücreleri görülür. Şiddetli lezyonlar çok sayıda makrofaj ve Langhans tipi dev hücrelerinin mukoza, submukoza, kas katmanı ve serozada yayılmasıyla oluşur. Villuslar kütleleşmiş, kript epitelleri nötrofiller ve mukoid materyal nedeniyle genişlemiştir. Lenfatikler ve lenf folikülleri genişlemiş ve yangılıdır. Bununla birlikte genişleyen villus laktealleri zaman zaman bağırsak lümenine doğru fistülleşmiştir. Peyer plakları yangısal hücre infiltrasyonlarıyla çevrelenir ancak her zaman infiltrasyon olmaz. Mezenterik sinir ganglionları bazen eozinofil lökositlerle çevrili olabilir; bu durum ishale karşı şekillenen aşırı duyarlılık reaksiyonu nedeniyle olabilir. Orta ve şiddetli lezyonlarda pleomorfik ve poligonal şekilli, sitoplazmalarında köpük şekilli vakuoller bulunduran ve “histiyositik” diye tabir edilen, epitel hücrelerinin arasında bulunan iç şekilli, uzun ve sarmal yapıdaki hücrelerin bulunduğu belirtilmektedir. Ziehl-Neelsen boyamaları hafif lezyonlarda az sayıda intrasellüler organizma içerir ancak bu sayılar lezyonlar şiddetlendikçe artar. Kazeöz nekroz ve ülserasyon genellikle görülmez. Mikroskopik granülomlara bazen karaciğerde ve hepatik lenf düğümlerinde rastlanabilir. Timusdaki lenf nodlarında deplesyon belirgindir. Kalp ve aortadaki arteriosklerozis lezyonları nadirdir (Brown ve ark., 2006; Clarke, 1997; Gelberg, 2017; Hazıroğlu ve Milli, 2001).

Hastalığın histopatolojik lezyonları keçilerde görülen *Mycobacterium leprae* enfeksiyonu ile benzerdir. Tüberküloid formunda az sayıda asit fast bakteriyle beraber çok sayıda lenfosit, fokal makrofaj agregatlarının etrafını sarmıştır. Bu form güçlü hücresel immün yanıtla ilişkilidir. Lepromatöz form ise güçlü humoral immün yanıtla ilişkilidir ve lezyonlar çok sayıda asit fast bakteriyle yüklü diffuz makrofaj infiltrasyonları içerir. Şiddetli formların arasında intermedier form ve “borderline form” bulunur. Tüberküloid lezyonları olan subklinik hayvanların bireysel olarak gösterdikleri klinik formlar ya az sayıda etken içeren borderline tüberküloid form olarak ya da çok sayıda etken içeren borderline lepromatöz form şeklinde olabilir (Sigurdardottir ve ark., 1999). Bazıları mineralize olmuş kazeöz nekroz odakları sıklıkla mukoza, submukoza, seroza, lenfatikler ve kısmen de mezenterik lenf düğümlerinde görülür (Chiodini ve ark., 1984; Clarke, 1997).

2.1.7. Tanı

Paratüberkülozisin klinik bulguları sığırlarda çok belirgindir ancak koyun, keçi ve develerde klinik belirtileri ayırıcı olarak hastalığın tanınmasında yeterli değildir. Ayrıca etkenin izolasyonu ve tanı testlerinin doğruluğu bakterinin yapısı gereği zorlu olmaktadır. MAP'nin ortamdaki dayanıklılığı ve etkili aşılarda olmaması, hastalığın çiftlik içi kontrolünü karmaşıklaştırmıştır. Zaman zaman klinik Paratüberkülozis olan hayvanların tedavisi denenir ve değişik tedavi başarıları bildirilmiştir. Yakın zamana kadar, MAP'in zoonotik bir etken olmadığı düşünülerek Veteriner Hekimler tarafından yalnızca bir hayvan patojeni olarak görülmesi, bu şekilde tedavi uygulanması ve hastalığın kontrolünün isteğe bağlı olması durumu mevcuttu. Ancak artan sayıda kanıt MAP ile Crohn hastalığı arasında bir bağlantı olduğunu öne sürmekte ve bazı ülkeler Paratüberkülozis hastalığının kontrolüne bir gıda güvenliği sorunu olarak yaklaşmaya başlamaktadır (Sweeney ve ark., 2012).

MAP enfeksiyonunun tanısında çeşitli yöntemler mevcuttur. Bunlar (Collins, 2011):

1. Nekropside makroskopik bulgular eşliğinde histopatolojik değerlendirme ve Ziehl-Neelsen ile etkenin gösterilmesi
2. Dışkı örneğinden bakteriyel kültür yapılması
3. Dışkı örneğinde etkenin DNA'sının gösterilmesi
4. Süt ve serumda antikor varlığının tespiti
5. Hücre aracılı immun yanıtın tespiti

Postmortem tanıda kullanılan nekropsi yönteminde hastalığa ait bulguların görülmesi ve sonrasında uygun şekilde hazırlanan dokuların mikroskop ile histopatolojik incelemesinde görülen mikroskopik bulgular, hastalığın tanısına yardım eder ancak hastalığın kesin tanısı bu yöntemlerle yapılamaz. Ziehl-Neelsen boyama

yöntemiyle etken gösterilebilir ancak bu sadece etkenin *Mycobacterium* spp. olduğunu açığa çıkarır. Etkenin tür ve suş tayini için bu yöntemler yeterli değildir. Hastalıkla ilgili birçok kaynak, makroskobik ve mikroskobik bulguların hastalığı işaret edeceğini, hastalığın kesin tanısı için bakteriyolojik kültür yapılması gerektiğini belirtmektedir (Brown ve ark., 2006; Collins, 2011; Gelberg, 2017; Hazıroğlu ve Milli, 2001).

Dışkı örneğinde bakterinin varlığının tespiti örnekte canlı MAP'nin varlığını doğrulaması ve ayrıca moleküler epidemiyolojik amaçlar için suş tiplemesine izin verme avantajına sahiptir. Kültürün nekropsiye göre yaklaşık % 60 daha duyarlı olduğu tahmin edilmekte, teşhisin spesifitesinin ise %99 olduğu düşünülmektedir (Sweeney ve ark., 2012). PZR ve antikor saptama yöntemlerine göre kültürün bir dezavantajı, sıvı kültür sistemleri için 4-8 hafta ve katı ortam için 8-16 hafta olabilen uzun inkübasyon süresidir (Collins, 2011; Englund ve ark., 2002).

MAP DNA'sının PZR'la tespiti, testlerin yanıt süresi açısından kültüre kıyaslandığında çok daha avantajlıdır. Tanısal duyarlılık ve spesifite kullanılan yöntemle göre değişmekle birlikte, ticari PZR kitleri ile kültür yöntemine benzer sonuçlar alınabilmektedir. PZR dışkıyla etken atılım miktarının tespitinde kültür yöntemiyle uyumlu sonuçlar verebilmektedir. Ancak MAP'ın PZR'la saptanması canlı etken varlığını göstermemekte ve suş farklılıklarını da tespit edememektedir (Englund ve ark., 2002).

Serum ve sütteki antikorların tespiti, organizmaları tespit etmek için kullanılan yöntemlere kıyasla büyük bir maliyet tasarrufu ile veri miktarı ve test süresinde büyük bir avantaja sahiptir. Genel olarak, bu testlerin duyarlılığı, MAP'ye karşı oluşan immün reaksiyon ile sınırlıdır, burada saptanabilir antikorlar genellikle enfeksiyonun geç dönemlerine kadar ve etkenin dışkıyla atılımı başlayıncaya kadar üretilmez. Serum ELISA'nın duyarlılığı, nekropsiye göre % 30 olarak tahmin edilmektedir (Collins, 2011).

Bu test lenfositlerden antijen kaynaklı gamma interferon salınımının in vitro tespitini ve bu gamma interferon analizini içerir. Hücre aracılı immün yanıtın değerlendirilmesi hastalığı MAP'ın erken enfeksiyon devresinden itibaren tüm

enfeksiyon dönemlerinde, MAP'e karşı antikor oluşumu veya fekal atılım başlamadan önce tespit edebilmesi nedeniyle avantajlıdır. Ancak maliyetinin çok yüksek olması ve değişken test sonuçları nedeniyle bu yöntem önerilmemektedir (Fernandez ve ark., 2017; Sweeney ve ark., 2012).

Bir hayvan Paratüberkülozis ile uyumlu klinik semptomlara sahipse bahsedilen tüm testler benzer sonuç göstermektedir. Ancak hayvanın veya sürünün klinik durumu ve tedavi ya da hastalık kontrolü sonuçlara bağlıysa kültürden daha hızlı yöntemlerden biri kullanılmalıdır. Sürüde etken ya da hastalık daha önce tespit edilmemişse bakterinin gösterilmesi teşhisi doğrulamak için tercih edilmelidir (Collins ve Manning, 2020; Timms ve ark., 2011).

Koyun, keçi ve develerde tanısal testlerin duyarlılığı ve spesifitesi sığırlarla karşılaştırılabilir durumdadır. Bu testler, hastalığın klinik belirtilerini gösteren bir hayvanda tanının doğrulanması için veya sürüden enfekte hayvanların ayrılması ve hastalık eradikasyonu için kullanılabilir. MAP koyun suşlarının in vitro kültürde yetiştirilmesi zordur, etkenin kültürde üremesi bazen aylar sürebilir, hatta bazen etken besiyerinde üreme göstermeyebilir. Bu nedenle kültür denemelerinden elde edilecek negatif sonuçlar tartışmalıdır (Collins ve Manning, 2020; Timms ve ark., 2011).

2.1.8. Tedavi

Paratüberkülozis hastalığının bilinen kesin bir tedavisi yoktur ancak bazı kemoterapötiklerle hastalığın klinik bulguları azaltılabilir (Fecteau ve Whitlock, 2011; St Jean, 1996).

Et veya süt verimi gibi ekonomik amaçlarla yetiştirilen ruminantlarda hastalığın klinik bulgularının azaltılması için yapılacak semptomatik tedavi girişimleri, ekonomik değeri için beslenen hayvanların yetiştiriciye olan masrafının artmasına sebebiyet verir. Bunun yanı sıra, tedavide kullanılacak olan ilaçlardan olan antibiyotiklerin et, süt, semen vb. ürünlere geçmesi nedeniyle, zaten düşük verimde alınan ürünlerin hiç kullanılamamasına neden olur. Ayrıca bazı ülkelerde (örn; ABD) gıda amaçlı üretimi yapılan hayvanlarda, bu ilaçların kullanımı yasaklanmıştır. Bu

nedenle yetiştirici ve Veteriner Hekim tarafından işletme hayvanlarında tedavi amacıyla bu tip girişimler sıklıkla tercih edilen uygulamalar değildir (Fecteau ve Whitlock, 2011).

Hobi veya spor gibi (örn; rodeo vb.) gayriekonomik olarak ya da genetik değeri için beslenen ruminantlarda semptomatik tedavi girişimleri sıklıkla uygulanmaktadır. Bu amaçla birden fazla kombinasyon önerilmektedir (Fecteau ve Whitlock, 2011).

Bakterinin intrasellüler üreme özelliği nedeniyle kullanılan ilaçların bu minvalde seçilmesi önemlidir. Doğal ve deneysel Paratüberkülozis enfeksiyonlarında izoniazid, rifampin, aminoglikozidler ve dapsone gibi antimikrobiyal ilaçlar denenmiştir. Aminoglikozidler MAP dahil olmak üzere bazı *Mycobacterium* türlerine etki ettiği bildirilmiştir. Bu amaçla gentamisin, kanamisin ve streptomisin gibi aminoglikozidler önerilmektedir. Yakın zamanda yapılan in vitro çalışmalarda siklosporinlerin etkisi gösterilmiştir (Collins ve Manning, 2020; Fecteau ve Whitlock, 2011).

In vitro araştırmalar anti-tuberkuloz (ethambutol, izoniazid vb.) ve lepraya (dapsone, klofazimin vb.) karşı kullanılan ilaçlarının etkinliğinin düşük olduğu hatta MAP'ın bunlara dirençli olduğunu, buna karşın azitromisin ve klaritromisin gibi makrolid gruptaki antibiyotiklere karşı etkenin duyarlı olduğunu bildirilmiştir (Collins ve Manning, 2020).

MAP ve Crohn's hastalığı arasındaki ilişki nedeniyle Crohn's hastalığı üzerine kullanılan beşeri ilaçlar MAP üzerinde de denenebilir ancak gıda amaçlı yapılan yetiştiricilikte, ilaçların ürünlerde kalıntı yapabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (St Jean, 1996).

2.1.9. Koruma ve Kontrol

Paratüberkülozis tedavisi olmayan bir hastalıktır. Sürüde yapılan ELISA taraması sonucu etken pozitif çıkan hayvanlar sürüden ayrılmalı, pozitif hayvanlar kesime gönderilmelidir (Collins ve Manning, 2020).

Sürülerdeki çoğu hayvanın Paratüberkülozis etkeniyle erken yaşta enfekte olduğu varsayılmaktadır. Bu nedenle kontrol programları yavru ile yetişkin hayvan arasındaki direkt ve indirekt bulaşma yollarına yönelik yapılmalıdır. Yavru ve yetişkin padokları ayrı tutulmalıdır. Doğum esnasında yavrunun maternal dışkıyla teması önlenmelidir. Kolostrum pastörize edilmelidir. Süt direkt emdirilmemeli, bunun yerine biberonlar kullanılmalıdır. Süt tankı kullanılmamalı, birden fazla hayvanın sütleri karıştırılmamalı, yenidoğan beslenmesinde hastalıktan ari olduğu kesin bilinen hayvandan alınan süt kullanılmalıdır. Bunun yanında bazı çalışmalar enfekte sütün etkenden arındırılması için çeşitli yöntemlerin kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Yavrular ve yetişkinler arasında indirekt bulaşma ihtimali engellenmelidir. Yavrular 1 yaşına gelmeden sürüye karıştırılmamalıdır (Chiodini ve ark., 1984; Collins ve Manning, 2020; Donaghy ve ark., 2009; Marquetoux ve ark., 2018).

2.1.10. Aşılama

Paratüberkülozis için dünyada yaygın olarak kullanılan bir aşı yoktur. Önceden kullanılmakta olan canlı aşılar günümüzde tercih edilmemektedir. Son yıllarda Paratüberkülozis için aşı geliştirme çalışmaları yapılmaktadır; bazı Avrupa ülkeleri ve Avustralya'da keçi Paratüberkülozis'ine karşı bir aşı mevcuttur. Aşı inaktif *Mycobacterium avium* paratuberculosis 316F suşunu içermektedir; dışkıdaki etken sayısını ve hayvan sayısı bazında klinik Paratüberkülozis'in görülmesini azalttığı bildirilmiştir (Collins ve Manning, 2020). Aşının sürüdeki enfekte keçi oranına etkisi bilinmemektedir. Bunun yanında hastalığa yakalanmayı önleyemediği, tam koruma sağlamadığı ve dışkıda, aşıya rağmen etken bulunması nedeniyle etkinliği tartışmalıdır (Windsor, 2013). Bakteri hücre zarı, rekombinant antijen, canlı attenüe mutant gibi materyaller kullanılarak bazı aşı denemeleri yapılmaktadır ancak henüz bunlardan hiçbirisi ticari kullanım aşamasında değildir (Lybeck ve ark., 2020).

2.2. Mannoza Bağlayıcı Lektin (Mannose Binding Lectin-MBL)

Enfeksiyonlara karşı organizma mikrosirküler ya da vasküler yanıt, hücresel yanıt ve humoral yanıt olmak üzere 3 farklı yanıt verir. Bu yanıtta doğal bağışıklık ve kazanılmış bağışıklığın önemi büyüktür. Organizmaya giren yabancı etkenlere karşı

geliştirilen bazı önlemler vardır. Bunlar, epitelial bariyer, nötrofilik yanıt, mononükleer fagositik yanıt, doğal öldürücü (natural killer) hücreler ve yabancı etkeni tanınır hale getiren bir dizi proteinli maddeleri gibi komponentleri içerir. Hücrel savunmadaki basamaklar tanınma, yutulma ve mikrobik öldürme şeklinde seyreder. O nedenle vücuda giren yabancı etkenin tanınması en önemli aşamadır. Bu aşamada etken çeşitli protein ve karbonhidratlı bileşiklerden oluşan maddelerle kaplanarak vücut için tanınır hale getirilir. Bu olaya “opsonizasyon” adı verilir (Çolak, 2015). Opsonize edilmiş etkenler bir dizi proteinli maddelerden oluşan komplement sistem adı verilen bir sistemin uyarılmasına yol açar ve bu da vasküler, hücrel ve humoral yanıtları yeri ve zamanına göre başlatır. Bu kompleman sistemin uyarılması klasik yol, alternatif yol ve lektin yolu olmak üzere 3 şekilde olur. Lektin yolu Mannoza Bağlayıcı Lektinin (MBL; Mannan Bağlayıcı Lektin, Mannoza Bağlayıcı Protein) mikroorganizmaların hücre zarında bulunan şekerli komplekslere bağlanmasıyla başlar (Van Kooyk, 2008). MBL yapısal olarak kollajen ve kolektin adındaki bir lektinden oluşur. Antikor yanıtından bağımsız olarak, maya, mantar, bakteri ve virus gibi birçok patojenin yüzeyindeki N-asetil-D-glukozamin, mannoz, N-asetil mannozamin, L-fruktoz ve glukoza spesifik olarak bağlanarak onların makrofajlar tarafından fagositozunu sağladığından dolayı bir opsonin olarak görev yapmaktadır (Dambuza ve Brown, 2015; Gupta ve ark., 2008). MBL bağlayan bu şekerler genellikle memeli hücre yüzeylerinde bulunmamaktadır. MBL akut faz reaksiyonunu oluşturan proteinli yapılardan biridir. Bu nedenle MBL, patojenlerin fagositozunu sağlamanın yanında çoğu zaman komplemanı klasik yoldan da aktive ederek bu mikroorganizmaların lizisini de sağlamaktadır (Gupta ve ark., 2008; Worthley ve ark., 2006).

2.2.1. MBL'nin Yangıdaki Rolü

Lektin yolunun aktive edilmesini MBL ile bağlantısı olan bir dizi serin proteazlar sağlar (Mannose Associated Serine Protease, MASP) (Yuan ve ark., 2015). Bu serin proteazlar MASP-1, MASP-2 ve MASP-3'tür. Bunlardan MASP-2 MBL ile birleşir ve komplement aktivasyonunda kilit öneme sahiptir. Gerçekleşen bu birleşme C4 ve C2'yi parçalayıp C3 konvertazı oluşturur. Bu yol klasik yol ile eşzamanlı olarak ilerleyerek membran atak kompleksinin oluşumunu sağlar. C3 konvertaz aynı

zamanda, C3'ü parçalayarak anafilotoksin C3a ve opsonik C3b'yi oluşturur. Böylece etkeni bir taraftan opsonize ederek fagositik hücreler tarafından fagositozu sağlanırken diğer yandan etkenin lizisi gerçekleşir. MASP2 gen mutasyonları ya da salınımının bozulmasında MBL-MASP-2 birleşimi gerçekleşmediğinden enfeksiyonlara yatkınlık artar (Jack ve ark., 2001). MBL yetersizliği ile ilgili olarak yapılan bazı çalışmalarda kistik fibrozisli hastalarda *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonun kronik hale geldiği ve diğer enfeksiyöz etkenlerin enfeksiyon riskini ve mortalitesini artırdığı bildirilmiştir (Erken, 2013, Güneşçar ve ark., 2011). Bu çalışmaların aksine bazı çalışmalarda ise *Mycobacterium tuberculosis* ve *Mycobacterium leprae* enfeksiyonu bulunan hastalarda yüksek serum MBL düzeylerinin enfeksiyon sıklığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Guardia ve Lozano, 2003). Bazı araştırmacılar serum MBL düzeyi yüksekliğinin mikobakterilerin opsonizasyonu sonucu aktive edilen kompleman aracılı fagositozu artırarak etkenin hücre içinde saklanması ve enfeksiyonun devam etmesini sağladığını MBL düzeyi düşüklüğünün mikobakteri enfeksiyonlarından koruyucu olabileceğini belirtmişlerdir.

2.3. Osteopontin (OPN)

Osteopontin (OPN), yangısal süreçler sırasında doku bütünlüğünün korunması veya rejenerasyonu da dahil olmak üzere bir dizi fizyolojik ve patolojik olayda rol oynayan bir fosforile asidik glikoproteindir (Franzen & Heinegard 1985; Oldberg ve ark., 1986; Young ve ark., 1990). Sitoplazma ve çekirdekte bulunduğu bildirilmiştir (Kahles ve ark., 2014). Hücre tipine bağlı olarak serinler ve treoninler üzerinde yüksek oranda fosforile edilebilen, aspartik asit bakımından zengin, N-bağlı glikosile edilmiş bir protein yapısındadır (Scatena ve ark., 2007). OPN, kemik, dentin, sement, hipertrofik kıkırdak, böbrek, beyin, vasküler dokular, iç kulağın gangliyonları, safra ve pankreas duktusları, böbreğin distal tubulleri, bağırsaklar ve ayrıca aktive makrofajlar ve lenfositler dahil olmak üzere çeşitli dokulardaki birçok farklı hücre tarafından eksprese edilir (Patarca ve ark., 1989; Giachelli ve ark., 1995; Butler ve ark., 1996; Weber ve Cantor, 1996; Denhardt ve Noda, 1998; Rittling ve Denhardt, 1999). OPN kemikte, osteoblastik hücreler tarafından çeşitli farklılaşma aşamalarında, farklılaşmış osteoblastlar ve osteositler ve ayrıca osteoklastlar tarafından üretilir (Zohar ve ark., 1997a, McKee ve Nanci, 1995; Sodek ve ark., 1995, Dodds ve ark.,

1995). Salgılanan protein, mineralize bağ dokularının matriksine katılmasına rağmen, birçok durumda kan, süt (laktopontin), idrar (üropontin) ve seminal sıvı dahil olmak üzere biyolojik sıvılarda bulunur (Senger ve ark., 1989b, Hoyer ve ark., 1995, Cancel ve ark., 1999). OPN ayrıca embriyonik stromada ve yara iyileşme bölgelerinde fibroblastik hücreler tarafından eksprese edilir (Giachelli ve ark., 1995). Kronik yangısal ve otoimmün hastalıklarda yüksek oranda eksprese edilen çok işlevli bir moleküldür ve özellikle yangısal hücrelerin içinde ve çevresinde lokalize haldedir. Monosit-makrofajların toplanmasına yardımcı olduğu, makrofajlarda, dendritik hücrelerde ve T hücrelerinde sitokin üretimini düzenlediği düşünülmektedir. Yangısal hücrelerin OPN görevlendirme işlevlerine, bağlanma alanları, özellikle de birkaç integrin heterodimeri ile etkileşime giren arginin-glisin-aspartat (RGD) dizisi aracılığıyla aracılık edildiği düşünülmektedir (Sodek ve ark., 2000).

OPN insanlarda posttranslasyonel olaylar tarafından kapsamlı bir şekilde modifiye edilen 34 kDa'lık yeni bir protein olarak tek kopyalı bir gen tarafından eksprese edilir. Memeli ve kuş OPN proteinleri insanlarınkine benzer sayıda amino aside sahiptir ancak salgılanan proteinin boyutu, translasyon sonrası modifikasyonlardaki farklılıklar ve SDS-PAGE üzerindeki anormal davranış nedeniyle 44 kDa ila 75 kDa arasında değişmektedir. Protein, aspartik ve glutamik asit ve serin bakımından zengindir ve proteinin hidroksiapatite ve kalsiyum iyonlarına bağlanabildiği bir poliaspartik asit motifi ve hücre bağlanmasına aracılık edebilen bir RGD sekansı içerir.

OPN'nin ekspresyonu, gen transkripsiyonu, mRNA işleme, stabilite ve translasyon oranını ve ayrıca translasyon sonrası modifikasyonları etkileyebilen çok sayıda hormon, sitokin ve büyüme faktöründen etkilenir. OPN'nin düzenlenmesi veya OPN ekspresyonunun regülasyonu tüm dokularda benzer şekilde olsa da, aynı dokuda bile bazı önemli farklılıklar gözlemlenmiştir (Scatena ve ark., 2007).

Embriyonik gelişim sırasında, gastrulasyon evresinde notokordda, embriyonik/maternal arayüzde ve daha sonra kıkırdak yoğunlaşması ve kemik oluşumu bölgelerinde ve bir dizi epitel dokuda eksprese edilir. Bununla birlikte, embriyonik faz sırasında OPN ekspresyonunun olmasına rağmen, OPN -/- fareleri

normal şekilde gelişir ve fertildirler. Yetişkinlerde OPN proteini genellikle kemikler, böbrekler ve epitelyal örtüyle sınırlıdır. Klinik olarak OPN plazma seviyeleri, Crohn hastalığı, çeşitli kanser türleri, otoimmün hastalıklar ve obezite dahil olmak üzere kronik yangı ile karakterize edilen birçok hastalıkta yükselmiştir. Ayrıca kardiyovasküler hastalıkların varlığı ve yaygınlığı ile de önemli ölçüde ilişkilidir. Serum OPN proteini konsantrasyonunun, kanser hastalarında (Senger ve ark, 1989a; Singhal ve ark., 1997) ve sistemik lupus eritematozus gibi otoimmün hastalıkları olan hastalarda önemli derecede artış gösterdiği bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, serumdaki OPN ve kemik sialoproteininin Faktör H'ye sıkıca bağlandığını ve normal ve kanserli hücrelerin komplement aracılı saldırıdan korunmasına yardımcı olabileceğini göstermiştir (Fedarko ve ark., 2000).

2.3.1. OPN'nin Yangıdaki Rolü

OPN, dolaşımdaki monositlerde ekspre edilmez, ancak makrofajlar tarafından eksprese edilen en bol proteinlerden biridir ve güçlü bir makrofaj-kemotaktik uyarıcıdır. Gerçekte, OPN, yangısal reaksiyon sırasında makrofaj infiltrasyonunu düzenler gibi görünmektedir. Farelerde OPN'nin fonksiyonel inhibisyonu ve OPN'nin genetik ablasyonu, çeşitli yangı modellerinde makrofaj migrasyonunu büyük ölçüde bozar. OPN'nin aktive edilmiş lenfositler ve makrofajlar tarafından sentezi (Patarca ve ark., 1989) hastalıklı ve travmatize dokularda OPN varlığını açıklayabilir, OPN, aktive edilmiş T lenfositler tarafından sentezlenen en bol moleküllerden biridir (Weber ve Cantor, 1996). Farelerde yapılan yara iyileştirme çalışmaları, OPN'nin, infiltre lökositlerde ve diğer hücre tiplerinde çok yüksek seviyelerde akut yangısal faz sırasında eksprese edildiğini de göstermektedir. Granülomatöz yangı üzerine yapılan çalışmalar, T-hücreleri için bir kemotaktif olarak hareket etmenin yanı sıra, OPN'nin T hücrelerinin yapışmasını teşvik edebileceğini ve muhtemelen CD3 aracılı bir çoğalma tepkisini büyütebileceğini göstermiştir (O'Regan ve ark., 1999).

Kronik yangı, makrofajların hastalık ve yara bölgesindeki kalıcılığıyla karakterizedir. OPN -/- farelerinde, granülomatöz yangı ile karakterize hastalıklar, aterosklerozis, gecikmiş tip hipersensitivite dahil kronik yangı ile seyreden durumlarda makrofaj birikiminde eksiklikler olduğu kaydedilmiştir. Bu veriler

OPNnin kronik yangılarda veya kronik yangı bölgesinde makrofajların tutulmasına neden olabileceğini göstermektedir. In vitro çalışmalar OPNnin $\alpha_v\beta_3$ ve CD44 reseptörleri aracılığıyla makrofajlardan IL-12 sekresyonunu indüklediğini, IL-10 sekresyonunu inhibe ettiğini, tip-1 bağışıklığın gelişimine, dolayısıyla kronik yangıların oluşumuna katkıda bulunduğu bildirmiştir. In vivo ve in vitro yöntemlerle yapılan denemelerde OPN'nin makrofajların yabancı cisim dev hücrelerine formasyonunu engellediğini belirten çalışmalar da mevcuttur. Ancak OPNnin bu süreçlerdeki formu, etki ettiği reseptörleri ve sinyal yollarının biçimleri henüz bilinmemektedir(O'Regan ve Berman, 2000; Scatena ve ark., 2007).

Yapılan bu çalışmaya; “daha önce bazı hastalıklarda etkileri hakkında ön bilgilere sahip olunan OPN ve MBL markırlarının, bu hastalıklara benzer başka bir hastalıktaki etkilerinin araştırılması” hipotezinden yola çıkılmıştır. Bu çalışma ile keçilerde granulomatoz yangıyla seyreden Paratüberkülozis hastalığında bağırsak mukozasındaki OPN ve MBL ekspresyonları araştırılarak hastalığın patogenezindeki rolleri ve birbirleriyle olan ilişkilerinin ortaya çıkarılması amaçlandı.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

Çalışmanın materyali 2006 ile 2019 yılları arasında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na getirilen ve Paratüberkülozis tanısı konulmuş 23 adet keçiye ait doku bloklarından oluştu. Ayrıca 2019 ile 2020 yılları arasında Patoloji Anabilim Dalı'na getirilen, bağırsaklarında ve mezenteriyel lenf düğümlerinde histopatolojik olarak lezyon bulunmayan 5 keçiye ait ince bağırsak ve mezenteriyel lenf düğümü örneklerinden oluşan parafin bloklar çalışmanın kontrol grubu olarak seçildi.

Çalışmanın materyalini oluşturan keçilere ait ırk, yaş ve cinsiyet bilgileri Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 Çalışmanın materyali olarak kullanılan dokuların hayvanlarına ait bilgiler

Vaka Numarası	Protokol Numarası	İrk	Cinsiyet	Yaş
1	112/06	Kıl	Dişi	3 Yaşlı
2	198/10	Kıl	Dişi	2 Yaşlı
3	360/11	Kıl	Dişi	4 Yaşlı
4	62/12	Saanen	Dişi	3,5 Yaşlı
5	221/12	Saanen	Dişi	4 Yaşlı
6	222/12	Saanen	Dişi	3 Yaşlı
7	447/12	Kıl	Erkek	10 Aylık
8	257/13	Kıl	Erkek	3 Yaşlı
9	258/13	Kıl	Erkek	8 Yaşlı
10	169/14	Saanen	Dişi	2 Yaşlı

Tablo 3.1. (Devam) Çalışmanın materyali olarak kullanılan dokuların hayvanlarına ait bilgiler

11	235/14	Kıl	Erkek	4 Yaşlı
12	296/14	Saanen	Erkek	3 Yaşlı
13	322/14	Saanen	Erkek	2 Yaşlı
14	205/15	Saanen	Dişi	5 Yaşlı
15	271/15	Saanen	Dişi	3 Yaşlı
16	378/15	Saanen	Dişi	3 Yaşlı
17	379/15	Saanen	Dişi	3 Yaşlı
18	184/18	Halep	Dişi	4 Yaşlı
19	395/18	Kıl	Dişi	4-5 Yaşlı
20	126/19	Kıl	Dişi	3-4 Yaşlı
21	168/19	Kıl	Dişi	4-5 Yaşlı
22	278/19	Halep	Dişi	1 Yaşlı
23	723/19	Halep	Dişi	3 Yaşlı
K1	786/19	Kıl	Dişi	3 Yaşlı
K2	21/20	Saanen	Dişi	3 Yaşlı
K3	54/20	Kıl	Dişi	1 Yaşlı
K4	100/20	Kıl	Dişi	2 Yaşlı
K5	158/20	Kıl	Erkek	2 Yaşlı

Çalışmada kullanılan paratuberkulozlu hayvanların 17'si dişi (%74) 6'sı erkekti (%26) ve yaşları 10 aylıktan 8 yaşa kadar değişmekteydi. Hayvanların 10'u kıl

(%43,3), 10'u Saanen (%43,3), 3'ü Halep (%13,3) ırkı keçilerdi. Kontrol grubundaki keçilerin 4'ü dişi 1'i erkekti ve hayvanların ikisi 3, diğer ikisi 2, bir tanesi ise 1 yaşlıydı. Kontrol grubu 4 adet kıl, 1 adet Saanen ırkı keçilerden oluşturuldu.

Tüm doku blokları Leica 2155 rotary mikrotomunda 4-5 µm kalınlığında kesilerek normal ve Poly-L-lysinli lamlara alındı. Normal lamlara alınan kesitler hematoxilen & Eozin ve Ziehl-Neelsen yöntemiyle boyandı. Poly-L-lysinli lamlara alınan kesitlere ise streptavidin biyotin peroksidaz yöntemi uygulandı. Tüm boyamalara ilişkin kesitler Olympus BX51 araştırma mikroskopunda incelenerek DP71 görüntüleme sistemi ile mikrofotografı çekildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Histopatolojik Yöntemler

3.2.1.1.Hematoxilen & Eozin

Hematoxilen & Eozin yöntemi uygulanırken standart Harris Hematoxilen prosedürü kullanıldı (Presnell ve Schreiber, 1997). Bu amaçla normal rodajlı lamlara alınan doku kesitleri, 30'ar dakikalık 3 adet ksilol serisiyle deparafinize ve sonrasında %100, %96, %80, %70lik alkol serilerinden geçirilerek rehidre edildi. Suyunu geri kazanan doku kesitleri 5 dakika Harris Hematoxilen'de boyanıp amonyaklı sudan geçirildi ve 1,5 dakika Eozinle boyandıktan sonra distile suda yıkandı. Sonrasında %70, %80, %96 ve %100'lük alkol serilerinden geçirilerek dehidre edilen doku kesitleri ksilolde parlatıldı, kurutulduktan sonra entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.

3.2.1.2.Ziehl-Neelsen

Ziehl-Neelsen metodunda Presnell ve Schreiber'in uyguladığı prosedür kullanıldı (Presnell ve Schreiber, 1997). Normal rodajlı lamlara alınan kesitler deparafinize ve rehidre edildikten sonra karbol fuksin damlatılarak 60°C'lik etüvde 1 saat boyunca inkübe edildi. Etüvden çıkarılıp soğuması beklenen doku kesitleri akan

suda yıkanıp asit alkolde dekolorize edildi. Daha sonra Metilen Blue ile karşıt boyaması yapılan doku kesitleri entellan kullanılarak lamelle kapatıldı.

3.2.2. İmmunohistokimyasal Yöntem

İmmunohistokimyasal inceleme için Poly-L-lysinli lamlara alınan kesitlere standart ticari streptavidin peroksidaz hazır kiti (ABCAM, UK), üreticinin tarif ettiği prosedüre göre uygulandı. Kesitlerdeki anti-osteopontin ve anti-mannose binding lectin ekspresyonlarının gösterilmesi için Anti-osteopontin antibody (ABCAM ab8448, UK) ve Anti-mannose binding lectin antibody (ABCAM ab203303, UK) ile etkenin Mycobacterium tuberculosis'ten ayrılması için kullanılan Anti-Mycobacterium tuberculosis Ag85B antibody (ABCAM ab43019, UK) antikorlarının her biri, Universal Antibody Diluent (ABCAM Ab79995, UK) ile 1/100 dilusyonunda kullanıldı. Bunun için deparafinize ve rehidre edilen kesitler endojen peroksidaz aktivitesinin önlenmesi amacıyla önce %3'lük hidrojen peroksit ile 15 dakika muamele edildi. PBS ile 2 defa yıkandıktan sonra sitrat buffer solüsyonu (pH: 6) kullanılarak mikrodalga fırında 5'er dakikalık periyotlarda 2 defa kaynatıldı. Soğuduktan sonra dört defa PBS'le yıkanan kesitler nonspesifik boyanmaların önlenmesi amacıyla 10 dakika antikor blocking solüsyonuna tabii tutuldu. Kesitlere yıkama uygulanmadan, dilue edilen primer antikorlar damlatılarak oda sıcaklığında nemli kamaralarda 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün 4 defa PBS'le yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder serum uygulanarak 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Kesitler 4 defa PBS'le yıkanıp streptavidin peroksidaz ile 10 dakika oda sıcaklığında muamele edildi ve sonrasında tekrar 4 defa PBS'le yıkandı. Hazırlanmış olan DAB (3,3'-diaminobenzidine) kromojenle en fazla 5 dakika kontrollü boyandıktan sonra yıkanan kesitlere Harris Hematoksilen kullanılarak karşıt boyama yapıldı, sonrasında entellan kullanılarak lam ile kapatıldı.

3.2.3. Moleküler Yöntem

Dokularda etkenin varlığını belirlemek için daha önceden mikrobiyolojik tanı konulmadığından eldeki bloklar eritilip dokular açığa çıkarıldıktan sonra in situ PZR yöntemi ile etkene ait genomik yapıların ortaya çıkarılması amaçlandı. Parafin

bloklardan elde edilen dokularda etken DNA'sının izolasyonunda Whittington ve arkadaşlarının (1999) uyguladığı protokol tercih edildi (Whittington ve ark., 1999). Buna göre; önce mikrotomun etrafındaki gereksiz veya işlem sırasında kullanılmayacak olan tüm materyal işlem sahasından uzaklaştırıldı. Laboratuvar tezgahı, mikrotom ve mikrotomun demonte edilebilir tüm parçaları ksilen ve % 99,6'lık etanol ile tek kullanımlık kağıt havlu yardımıyla detaylı olarak temizlenerek parafin kalıntılarından arındırıldı. Her bir doku bloğu kesit alınmadan önce %99,6'lık etanol ile silinerek blok kısıpına yerleştirildi. Her bir blokta operatörün eldiveni ve mikrotom bıçağı değiştirildi. Blok trimlendi, trim artığı uzaklaştırıldı. Her bir trimlenen bloktan 5µm'lik 2 adet kesit tek kullanımlık uygulama çubuğu yardımıyla 1,5 ml'lik etüvlenmiş steril ependorflara alındı. Her kesilen parafin blok sonrasında mikrotom bıçağı çıkarılarak mikrotom yüzeyleri % 99,6'lık etanolle temizlendi.

Ependorf tüpleri 16000 x g'de 1 dakika santrifüj (Sartorius, US) edildi. İşlem sonunda tüplerin dibindeki pelet üzerine % 0,5 (v/v) tween 20 (Amresco, Belgium) ihtiva eden 200 µl steril distile su ilave edildi. Örnekler ısıtıcı blokta (Biosan, UK) 100 °C'de 10 dakika tutuldu, ardından sıvı nitrojende hızlıca donduruldu. Kaynatma dondurma aşaması bir kez daha tekrarlandıktan sonra örnekler 100 °C'de 10 dakika tutuldu. Süre sonunda ependorf tüpleri 3000 x g'de 20 dakika santrifüj edildi. Süre sonunda üstteki süpernatant steril bir ependorf tüpüne aktarıldı ve izole edilen DNA'lar PZR testinde kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı (Whittington ve ark. 1999).

3.2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Parafine gömülü dokulardan izole edilen DNA örnekleri MAP'a spesifik IS900 geninin tespitine yönelik 229 bp'lik 150C (5'-CCGCTAATTGAGAGATGCGATTGG-3', forward primer) ve 921 (5'-AATCAACTCCAGCAGCGCGGCCTCG-3', reverse primer) primer çifti kullanılarak daha önce bildirilen test protokolüne (Whittington et al., 1999) göre konvensiyonel PZR testi uygulanarak amplifiye edildi (Technique, UK). Negatif kontrol olarak; DNA'sız PZR karışımı, sağlıklı bir koyuna ait parafine gömülü bağırsak dokusundan izole edilen DNA örneği ve histopatolojik olarak tüberküloz pozitif bir

keçiye ait parafine gömülü akciğer dokusundan izole edilen DNA örneği, pozitif kontrol olarak ise MAP 316F suşundan izole edilen DNA örneği kullanıldı. Amplifikasyondan sonra PZR ürünleri Safeview™ classic (ABM, Canada) ile boyanmış %1,5'luk agaroz jelde yürütüldü ve UV transilluminatorde (Ilber Lourmat, France) görüntülendi.

3.2.4. Semikantitatif Analiz

Alınan doku kesitleri aşağıdaki kriterlere göre skorlanarak semikantitatif olarak incelendi. Buna göre ince bağırsak bölümlerinde villus atrofi, nekroz, Peyer plaklarındaki hiperplazi, lamina propria mononükleer hücre infiltrasyonları, bağ doku proliferasyonu, Langhans Tipi Dev Hücresi, mineralizasyon, lenfangitis; Mezenteriyel lenf düğümlerinde ise sinüzoidlerde genişleme ve yangı hücresi, lenf folliküllerinde hiperplazi, nekroz, epiteloid histiyosit varlığı ve Langhans Tipi Dev Hücresi varlığı gibi lezyonlar; “0” yok, “+” hafif, “++” orta ve “+++” şiddetli olarak skorlandı.

Bağırsaklardaki lezyon skorları toplamı soldan sağa bireysel hastalık şiddetini belirlerken yukarıdan aşağıya lezyonun şiddetine göre lokalizasyonu belirledi. Toplam skorlar aritmetik ortalamalar gözönünde bulundurularak 30 ve üstü “şiddetli”, 20-30 arası “orta”, 0-20 arası “hafif” olarak belirlendi.

Mezenteriyel lenf düğümündeki skor değerleri soldan sağa toplanarak lenf düğümleri en çok etkilenen hayvanlar belirlendi. Bu skorlamaya göre 15 ve üzeri “şiddetli”, 7-15 arası “orta”, 0-7 arası ise “hafif” olarak değerlendirildi.

3.2.5. İstatistiksel Analiz

Histopatolojik veriler ticari SPSS (Statistical Package for the Social Sciences 15.00) paket programı kullanılarak Sample T testi ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Mikroskopik Bulgular

4.1.1. Hematoksilen & Eozin

Mikroskopik bakıda, tüm ince bağırsak bölümlerinin değişen derecede etkilendiği ancak ileumdaki lezyonların daha şiddetli ve hastalığın karakteristik lezyonlarını daha belirgin şekilde sergilediği gözlemlendi. Bağırsaklarda görülen tipik lezyonlar villus epitellerinde kısmen dökülme, villuslarda atrofi ve füzyon, lamina propria'da çoğunluğu mononükleer seri hücrelerden oluşan yangısal agregatlar şeklindeydi. Bu yangısal hücrelerle birlikte oluşan ödem dolayısıyla lamina propria'nın başta ileum olmak üzere jejunum ve duodenumda değişen derecelerde genişlediği görüldü. Hastalıkta sürece kript epitellerindeki değişimlerin de katıldığı, bir taraftan villus epitelleri, diğer taraftan kript epitellerinin rejenerasyon çabalarının devam ettiği gözlemlendi. Mukoza altında kalan submukozal doku ile birlikte tunika muskularis'in değişen derecelerde yangıdan etkilendiği belirlendi. Bağırsak mukozasındaki lenfoid dokular yangıdaki şiddete göre değişen derecelerde etkilenmişti. Serozadaki yangısal infiltrasyon, ödem ve hastalığa özgü lenfangitis tablosu bütün olgularda değişen derecelerde mevcuttu.

Hastalığın diğer belirgin bulgusu olan yangının şiddeti, gerçekleştiği bağırsak dokusuyla ilişkili olarak, Peyer plakları ve mezenteriyel lenf düğümlerinde görülen yangısal değişikliklerin şiddeti ile bağırsaklardaki yangının şiddetine paralellik göstermekteydi. Peyer plaklarındaki lenf foliküllerinin hiperplazik olup, folikülün periferinden submukozaya doğru yayılan lenfositik ve histiyositik hücreler mevcuttu. Daha belirgin lezyonlar ve hastalığa özgü granülomlar, dev hücre formasyonları ve sinuzoidlerdeki genişlemeler mezenteriyel lenf düğümlerinde görüldü. Lenf folikülleri Peyer plaklarında olduğu gibi lenf folikülleri de hastalığın şiddetine göre hiperplazikti. Zaman zaman bazı foliküllerin perifoliküler bölgesinden intersitisyel doku ve parakortikal sinuslara doğru lenfositik ve histiyositik hücre infiltrasyonlarının gözlemlendi.

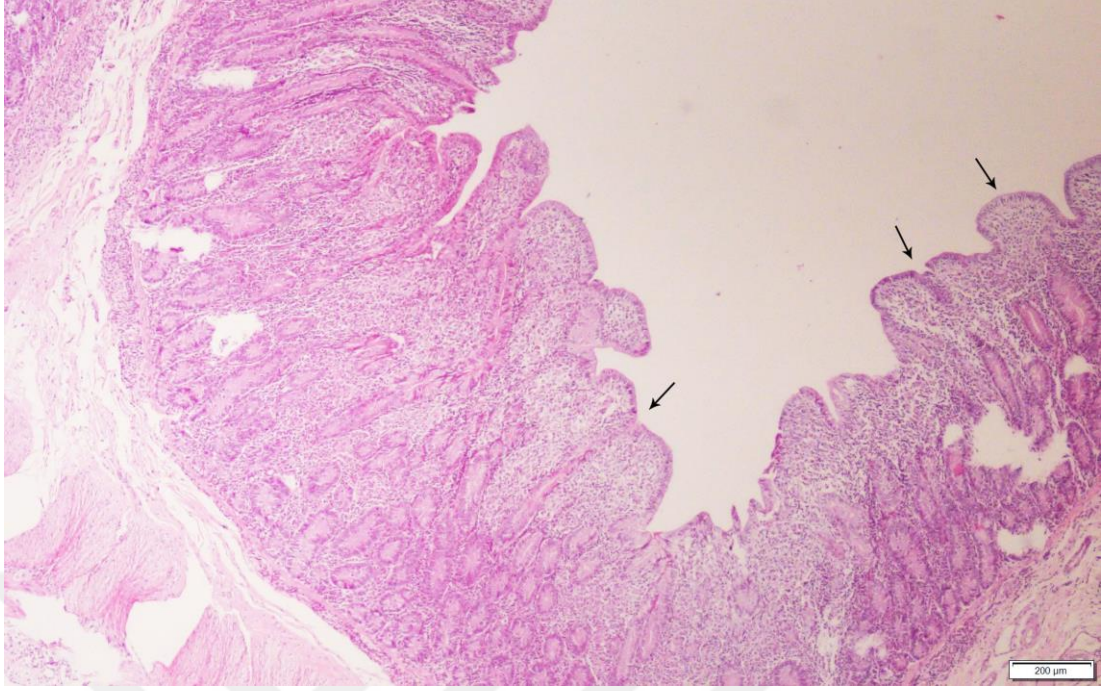
Hastalığın mikroskopik bulgularının daha detaylı sergilenmesi ve lezyonların şiddetiyle yangısal reaksiyonun etkilerinin detaylı olarak belirlenmesi amacıyla bağırsaklar bölümlerine göre ayrı ayrı değerlendirildi. Mezenteriyel lenf düğümü lezyonlarının ise ayrı değerlendirilerek, elde edilen bulguların karşılaştırılması yapıldı.

Buna göre bağırsaklar duodenum, jejunum ve ileum olarak üç bölümde incelendi.

4.1.1.1. Bağırsaklar

4.1.1.1.1. Duodenum

Duodenumun, enfeksiyonun şiddetine göre değişmekle beraber genelde ince bağırsakların distal bölgelerine göre daha az etkilendiği gözlemlendi. Duodenumun lümenine bakan bölümündeki villi intestinalislerin morfolojik görünümü ve uzunlukları normale yakındı. Enfeksiyonun şiddetli olduğu bölgelerde villi intestinalislerin enfeksiyonun şiddetiyle doğru orantılı olarak değişen derecelerde atrofisi belirgindi, zaman zaman villusların füzyonu gözlemlendi. Villi intestinalislerin dış yüzünü kaplayan enterositlerin genellikle bütünlüğü korunuyordu. Enterositlerin aralarında lokalize olmuş Goblet hücrelerinin belirginleştiği ve içlerinin mukusla dolu olduğu, mukusun enterositlerin üzerini yoğun bir şekilde örttüğü belirlendi. Enfeksiyonun şiddetli seyrettiği olgularda ise özellikle atrofiye ve füzyone villuslarda enterositlerin segmental olarak deskuame olduğu belirlendi. Epitel katmanının hemen altındaki L. propriada lakteallerin genişlediği ve zaman zaman dilate olduğu fark edildi. L. propriadaki yangısal hücre dağılımı olgulara göre değişiklik göstermekteydi. Hafif ve orta dereceli enfeksiyonlarda lenfosit, plazmasit ve makrofaj infiltrasyonları ile birlikte yer yer eozinofil lökositlerin gözlemlendiği yangısal tablo (Paucibasillar form) hâkimdi (Şekil 4.1.). Bazı bölgelerde ise çok yaygın olmamakla birlikte epiteloid histiyosit ve tek tük Langhans tipi dev hücrelerine rastlandı (Multibasillar form).



Şekil 4.1. Duodenum; villuslarda atrofi ve füzyon (oklar). H&E, X40, 200µm Barr.

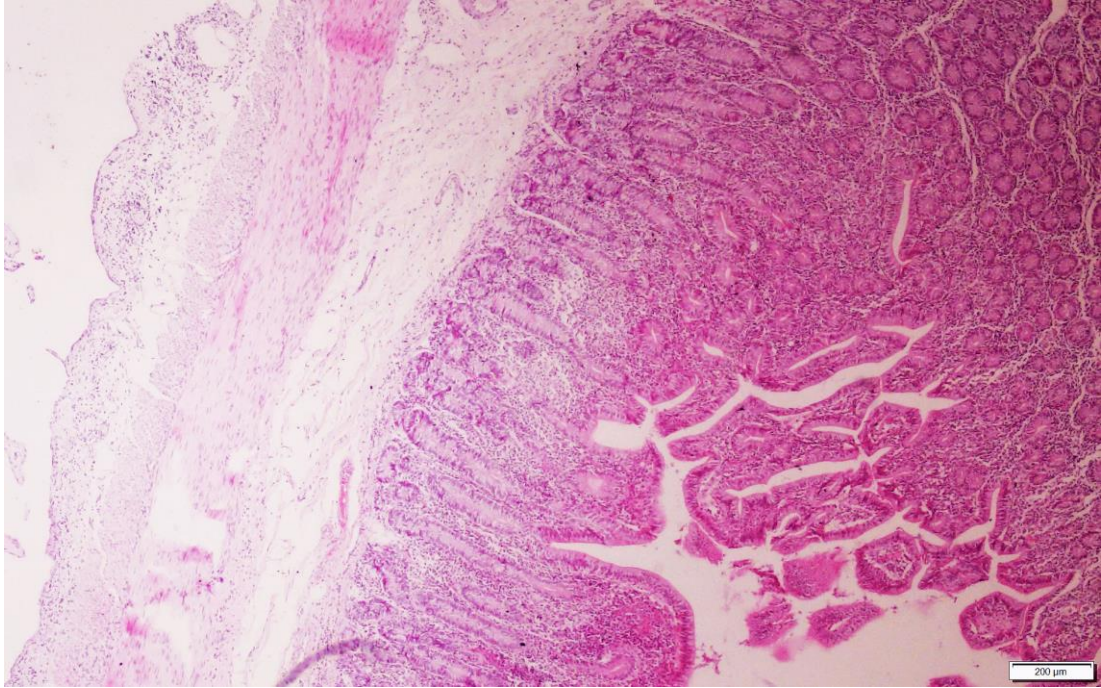
Submukozadaki Brünner bezleri çoğunlukla normal görülmekle beraber, intertubuler bölgede hafif lenfosit-makrofaj ağırlıklı hücre infiltrasyonları mevcuttu. Tunika seroza genellikle normal görünümde olup orta şiddetteki vakalarda hafif intersitisyel ödem ve lenfangitis tablosu hakimdi. Lenf damarlarının duvarında ve çevresinde lenfosit ve tek tük plazma hücrelerinde oluşan yangısal hücre infiltrasyonları görüldü.

4.1.1.1.2. Jejunum

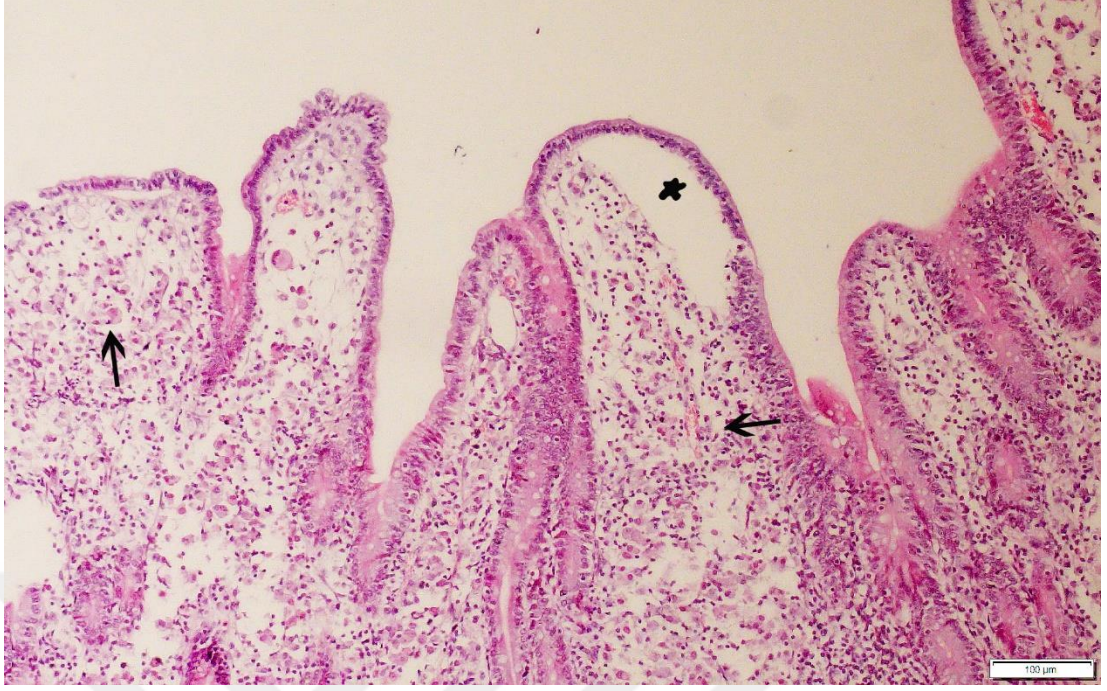
Jejunumdaki lezyonların duodenuma nazaran daha şiddetli olduğu dikkati çekti.

Duodenumda çok az ya da hiç görülmeyen villus atrofi ve füzyonu jejunumda daha belirgindi. Villusların yüzeyini örten enterositlerdeki ve kript epitellerindeki deskuamasyon daha şiddetli ve yaygındı. Lamina propriadaki lakteallerin geni ledi i, lümeni ile çevresinde mononükleer hücre infiltrasyonlarının  ekillendi i dikkati çekti ( ekil 4.3.).

Lamina proprianın genelinde görülen yangısal reaksiyonun bazı olgularda lenfosit, histiyosit ve plazma hücrelerinden baskın olduğu, arada tek tük nötrofil ve eozinofil lökositik karakterde olduğu görüldü. Bazı alanlarda çekirdeği kenara itilmiş, pembe-homojen geniş sitoplazmalı, içerisinde kırıntılar oluşturan Langhans tipi dev hücreleri görüldü. Hücre infiltrasyonunun ve ödemin artması nedeniyle L. propria jejunumda duodenuma göre daha çok genişlemişti. Bazı vakalarda da L. propriada bulunan yangısal hücre infiltrasyonları epiteloid histiyosit yığınakları halinde olup, arada tek tük plazma hücreleri, lenfositler ve eozinofil lökosit birikimleri şeklindeydi. Langhans tipi dev hücrelerinin ise sayısı ve büyüklüklerinin arttığı belirlendi. Villus atrofisi ve füzyonun şiddetli olduğu vakalarda L. propriada fibroblast ve fibrosit proliferasyonuna bağlı fibröz doku artışının şekillendiği fark edildi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Jejunum, Lamina propriadan serozaya kadar uzanan geniş yangı, H&E, X40, 200µm Barr.

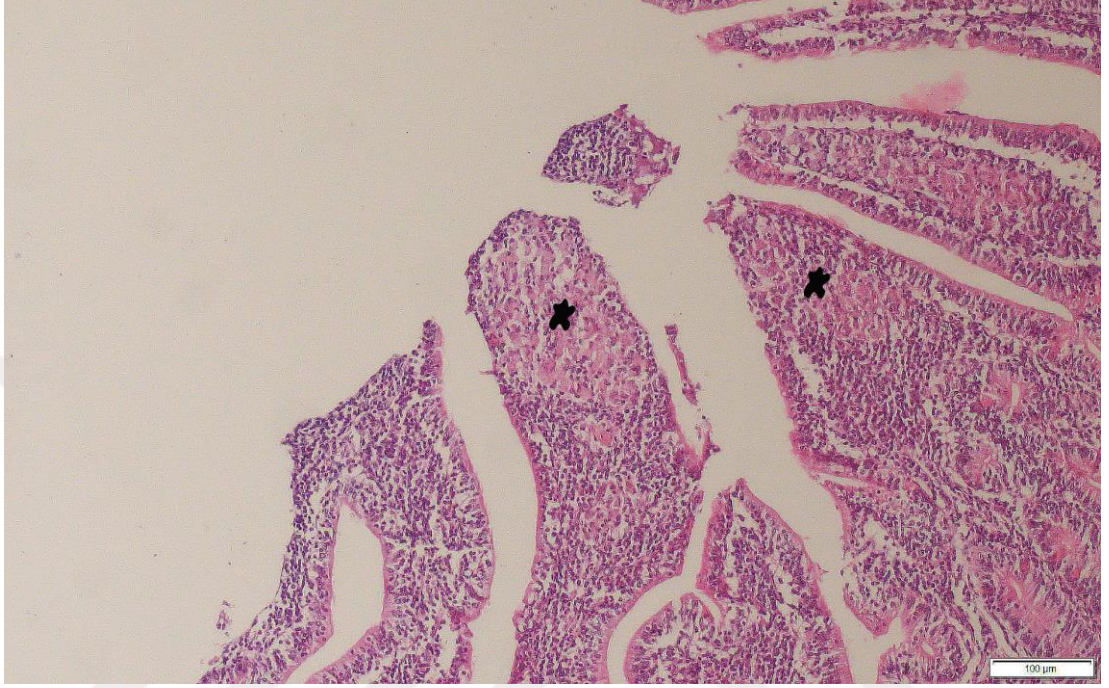


Şekil 4.3. Jejunum, lakteallerde dilatasyon (yıldız) ve lamina propriada orta şiddette diffuz mononukleer hücre infiltrasyonları (oklar), H&E, X100, 100µm Barr.

4.1.1.1.3. İleum

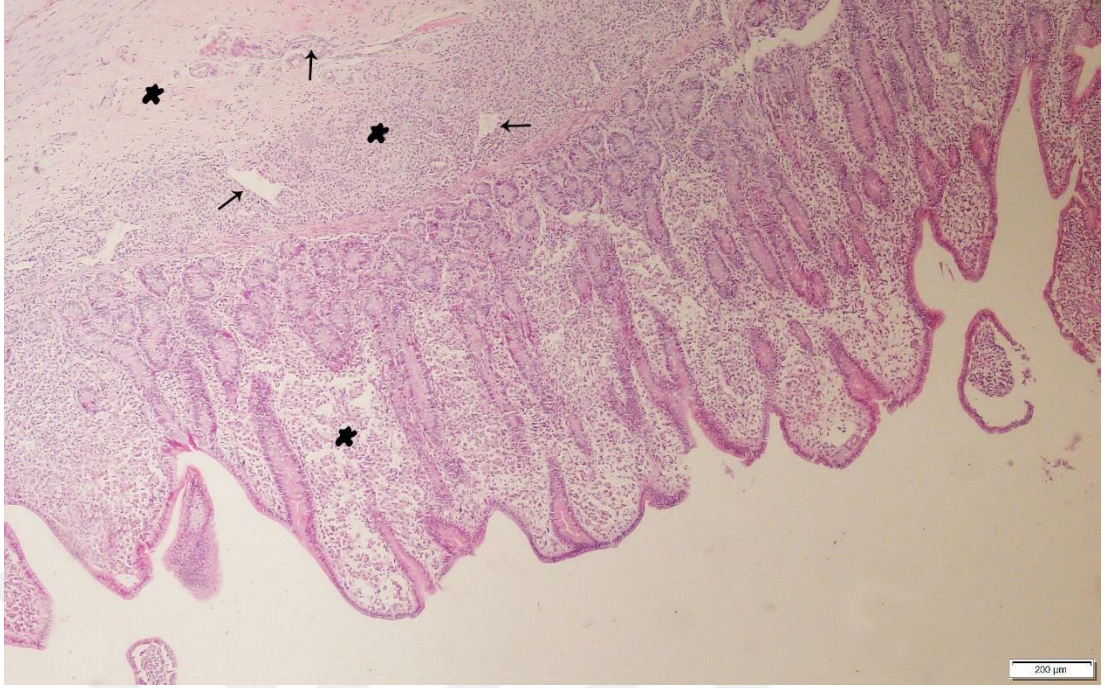
Enfeksiyonun şiddetinin en yüksek olduğu bölge, ince bağırsakların son kısmını oluşturan ileumdu. Villuslarda atrofi ve füzyon, hemen hemen her olguda mevcuttu. Villus yüzeyini kaplayan enterositler ve goblet hücreleri tamamen ya da segmental olarak deskuame olmuştu. Epitel katmanı altındaki lakteallerde yer yer genişlemelerle beraber bazı olgularda hastalığın lakteallerdeki etkisinin şiddeti lenfangitis ve perilenfangitise kadar değişmekteydi (Şekil 4.6.). Kript epitellerindeki deskuamasyonun bağırsağın önceki bölümlerine göre arttığı dikkati çekti. Bazı kriptlerin kistik dilatasyona uğradığı, lümeninde mukusla birlikte dökülmüş epitel hücrelerinin bulunduğu gözlemlendi. Lamina propriadaki yangısal hücre infiltrasyonları jejunumda olduğu gibi iki farklı tabloda kendini gösteriyordu. Bunlardan bazı olgularda gözlenen ve nonspesifik subakut enteritis tablosuna benzeyenlerde yangısal yanıtta makrofaj, lenfosit ve plazma hücreleri baskın olup nötrofil ve eozinofil lökositlerin ise tek tük gözlemlendiği; subakuttan kroniğe değişen derecede yangısal hücre infiltrasyonu görülmekteydi (Paucibasiller form). Olguların çoğunda ise bu tablodan farklı olarak epiteloid histiyositlerin baskın hücre tipi olduğu, yer yer yığınaklar

halinde lamina propriada dağılım gösterdiği bir tablo belirlendi (Multibasiller form) (Şekil 4.4.). Bu hücrelerin arasında plazma hücreleri, lenfositler ve tek tük eozinofil lökosit infiltrasyonları gözlemlendi.



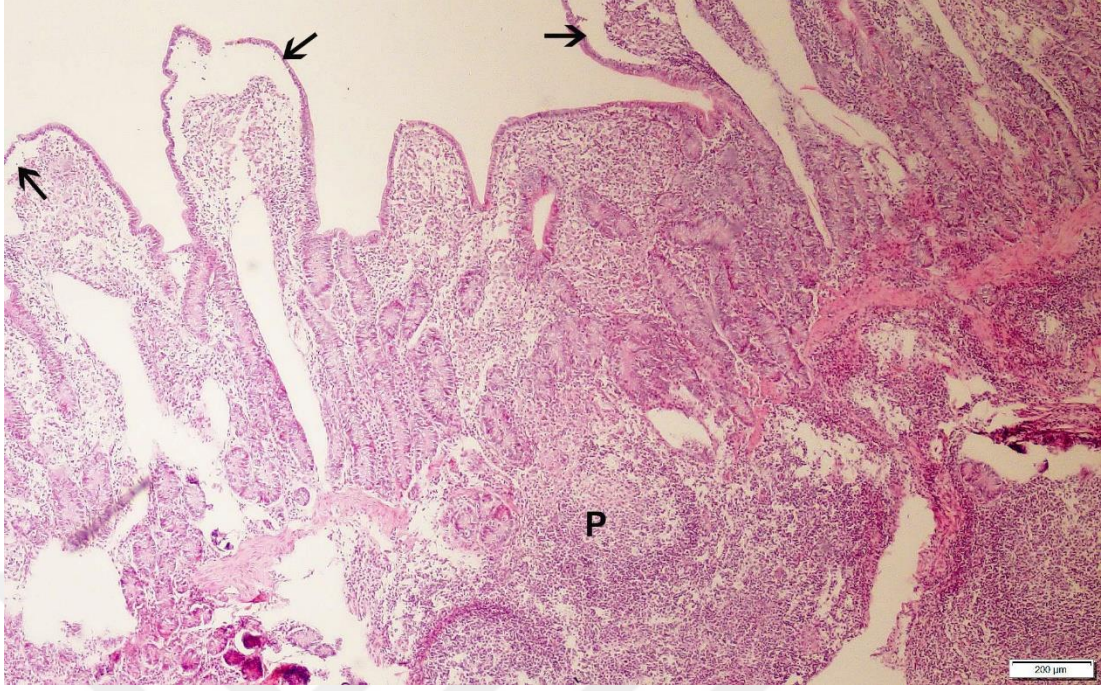
Şekil 4.4. İleum, villusların apikal bölgelerinde, lamina propriada şiddetli epitelioid histiyosit ve mononukleer hücre infiltrasyonu (yıldızlar), H&E, X100, 100 µm Barr.

Submukozada mukozadaki yangısal değişiklikleri takip eden eşlik eden ve yangının tipi ve şiddetine paralellik gösteren hücre infiltrasyonları mevcuttu. Özellikle kas demetlerinin arasında bazı alanlarda hafif, bazı alanlarda ise şiddetli, çoğunluğu lenfosit, plazma hücresi ve histiyositlerden oluşan yangısal hücre kompozisyonları hakimdi. Bu hücreler kas demetleri arasına girerek intersitisyel dokuda değişen derecede genişlemeye neden olmaktaydı (Şekil 4.5.).



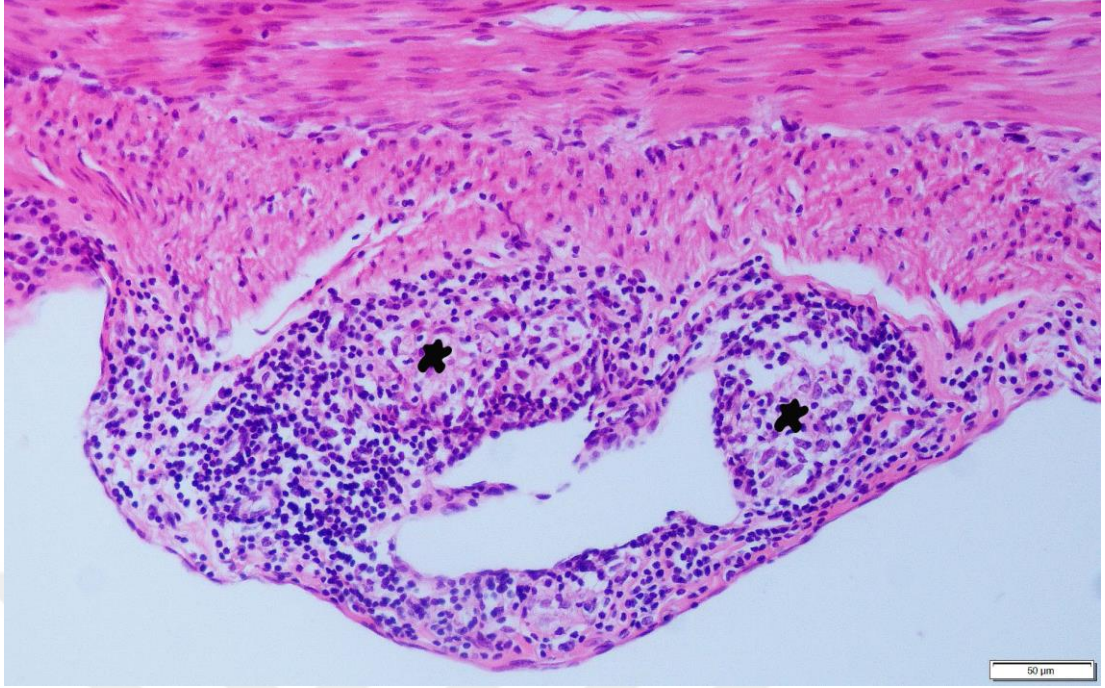
Şekil 4.5. İleum, lamina propria ve submukozada ödem ve yangısal hücre infiltrasyonu nedeniyle genişleme (yıldızlar), lenfangitis (oklar) H&E, X40, 200µm Barr.

Villus epitelleri ile direkt bağlantı içerisinde olan lenfo-epiteliyal dokuların en önemli kısımlarından birini oluşturan Peyer plakları, bağırsaktaki enfeksiyonun şiddetine göre değişen derecelerde etkilenmişti. En belirgin patolojik bulgu, lenf folikülündeki hiperplaziydi (Şekil 4.6.). Lamina propriada epiteloid histiyosit varlığı yoğun olan olgularda Peyer plaklarının merkezleri, bazı olgularda da perifoliküler bölgelerinde histiyositik infiltrasyonlarının belirginleştiği fark edildi. Peyer plaklarının çevresindeki alanlarda (parafoliküler bölge) ise çoğunluğu lenfosit ve plazma hücresinden oluşan, aralarında histiyosit ve makrofajların da bulunduğu hücre infiltrasyonları mevcuttu.



Şekil 4.6. İleum, paucibasiller form, lakteallerde dilatasyon (oklar), Peyer plaklarında şiddetli hiperplazi (P), H&E, X40, 200µm Barr.

Serozada görülen yangısal değişikliklerin şiddeti, L. propriadaki ile paralellik göstermekteydi. En belirgin lezyonlar pembe-homojen renkli ödem ile şiddetli lenfangitis ve perilenfangitisti. Hafif olgularda ödem belirgin olmamakla birlikte lenfangitis mevcuttu. Şiddetli olgularda ise seroza katmanı şiddetli ödem ve yangısal hücre infiltrasyonları nedeniyle değişen derecelerde genişlemişti. Lenf damarları dilate durumdaydı. Bazılarının lümenlerinde makrofaj, lenfosit ve plazma hücrelerinden oluşan yangısal hücreler mevcuttu. Bazı olgularda ise bu yangısal infiltrat lümeni tamamen doldurmuş durumdaydı. Mezotel hücrelerinin hemen altında cep ya da bombeleşme tarzında, merkezleri iyi kazeifiye, etrafı histiyositik hücrelerle çevrili ve kimi olgularda mineralizasyon gösteren nekroz alanlarına rastlandı (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. İleum, seroza, lenfangitis, lenf damarı, duvarı ve lümeninde granulomlar (yıldızlar), H&E, X200, 50 µm Barr.

4.1.1.1.4. Kontrol Grubu Bağırsakları

Kontrol grubundaki bağırsaklar segmental olarak değerlendirildiğinde bağırsak segmentlerinin hiçbir katmanında yangı bulgusu görülmedi. Mukozadaki enterositlerde dökülme yoktu. Submukozada yangısal hücre infiltrasyonu gözlenmedi. Lakteallerin genişlikleri normaldi, dilatasyon belirtisi mevcut değildi. Brünner bezlerinde kistik dilatasyon bulguları yoktu. Peyer plaklarının boyutları normaldi, yerleşik lenfositlerin haricinde herhangi bir infiltrasyon bulgusuna rastlanmadı. Serozadaki lenf damarlarının lümenlerinin normal genişlikte olduğu değerlendirildi. Kan ve lenf damarlarının çevrelerinde herhangi bir yangısal infiltrasyon görülmedi.

4.1.1.1.5. Semikantitatif Analiz

Çalışmada kullanılan hastalıklı ve kontrol grubu dokularına yapılan Hematoksilen & Eozin boyama sonuçları histopatolojik olarak incelenerek, lezyonların bağırsak segmentlerine göre yerleşimi ve şiddetinin semikantitatif analiz bulguları Tablo 4.1.'de belirtilmiştir.

Tablo 4.1. Olgularda belirlenen lezyonların bağırsak segmentlerine göre yerleşimi ve şiddetinin semkantitatif analiz tablosu. “0” yok, “+” hafif, “++” orta ve “+++” şiddetli.

OLGU NO	LEZYONLAR																										
	VA			EN			PPH	MNHİ			EH			LA			BP			LDH			K/M			TLS	
	D	J	İ	D	J	İ	İ	D	J	İ	D	J	İ	D	J	İ	D	J	İ	D	J	İ	D	J	İ		
1	+	+++	+++	+	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+	+	+++	0	+	+++	0	+	+++	53	
2	0	+	++	0	0	++	+++	+	+	+++	+	++	+++	+	+	++	0	+	+++	0	+	+	0	0	0	29	
3	0	+	+++	0	0	0	+++	+	++	+++	++	++	+++	+	++	+++	0	++	++	+	+	+++	0	0	0	35	
4	+	++	++	+	+	++	++	+	++	++	+	+	++	+	++	++	0	+	+	0	0	+	0	0	0	28	
5	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+	++	++	+	+	+++	0	0	++	54	
6	+	++	++	0	++	++	+++	++	++	+++	+	++	++	++	++	+++	0	+	+	0	++	++	0	0	0	37	
7	+	++	++	+	+	+++	++	+	++	+++	+	+	++	++	++	+++	+	+	+	0	+	+	0	0	0	34	
8	++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+	0	+++	0	0	0	56	
9	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	+++	+	++	+++	++	++	+++	+	+	+++	+	+	++	0	0	+	49	
10	+	+	+++	0	0	0	+++	++	+++	+++	++	++	++	++	++	+++	0	0	+	0	0	++	0	0	0	32	
11	+	++	++	0	++	+++	+++	++	++	+++	+	++	+++	++	++	+++	+	+	+	+	++	++	0	0	0	41	
12	+	++	+++	+	+	++	+++	++	++	+++	+	+	+++	+	++	+++	0	+	++	0	0	+	0	0	0	35	
13	+	+	++	0	+	++	++	+	++	++	+	+	+	++	++	++	0	+	+	0	+	+	0	0	0	27	
14	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+	+++	+++	++	+++	+++	+	++	+++	0	+	++	0	0	0	51	
15	+	+	++	0	0	+	+++	+	++	++	+	++	++	+	+++	+++	+	+	++	0	0	+	0	0	0	30	
16	0	+	++	0	0	+	++	+	++	+++	+	+	++	++	+++	+++	0	+	++	0	0	++	0	0	0	29	
17	+	+	+++	0	+	++	+++	++	++	+++	+	+	++	++	++	+++	+	+	++	0	+	++	0	0	0	36	
18	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+	++	++	++	+++	+++	0	0	0	57	

Tablo 4.1. (Devam) Olgularda belirlenen lezyonların bağırsak segmentlerine göre yerleşimi ve şiddetinin semkantitatif analiz tablosu. “0” yok, “+” hafif, “++” orta ve “+++” şiddetli.

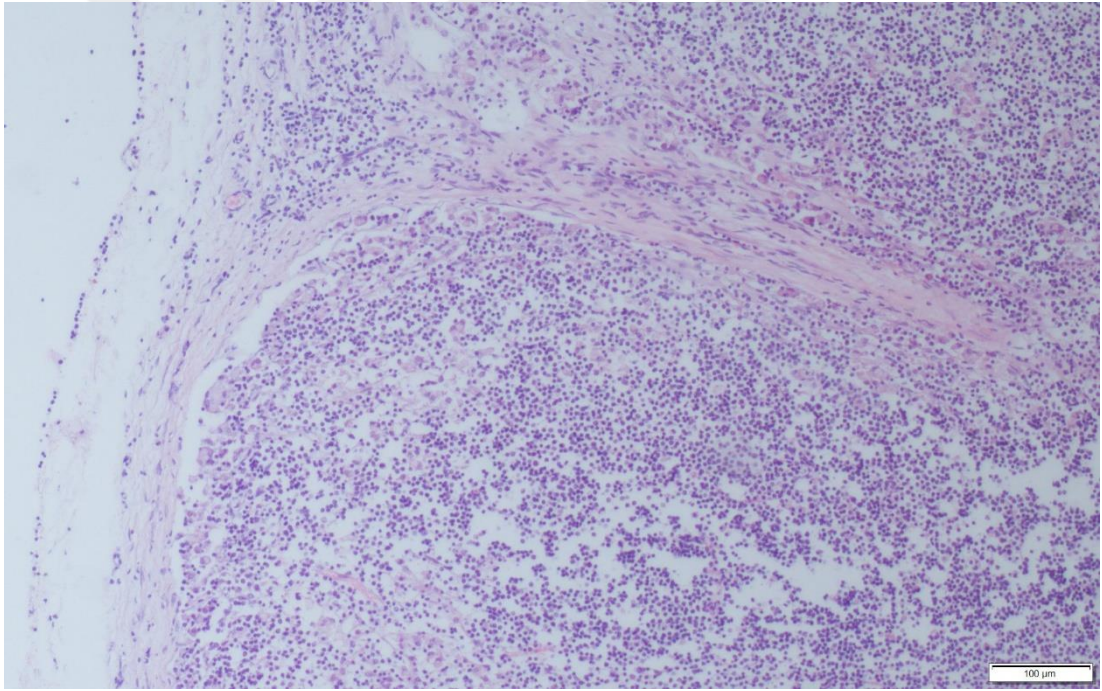
19	++	++	+++	++	++	+++	+++	++	++	+++	+	++	+++	++	+++	+++	+	+	++	++	++	+++	0	0	0	49
20	+	+++	+++	+	+++	+++	+++	++	+++	+++	0	+	++	+	+	++	0	+	++	+	+++	+++	0	0	0	42
21	+	+++	+++	0	++	++	+++	+	+++	+++	+	++	++	++	+++	+++	0	+	+	0	+++	+++	0	0	0	42
22	0	++	+++	0	+	+++	+++	+	++	+++	0	0	+	0	+	++	0	+	++	0	0	0	0	0	0	25
23	0	+	+++	0	+	+++	+++	+	+	++	0	0	+	0	+	+++	0	0	++	0	0	++	0	0	0	24
K1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TS	24	46	61	18	35	52	65	37	51	65	26	38	54	38	51	64	12	27	44	10	24	46	0	1	6	895

D: Duodenum, J: Jejunum, İ: İleum, VA: Villöz atrofi, EN: Epitel nekrozu, PPH: Peyer plaklarında hiperplazi, MNHİ: Monoökleer hücre infiltrasyonu, EH: Epiteloid histiyosit, LDH: Langhans tipi dev hücresi, BP: Bağ doku proliferasyonu, LA: Lenfangitis, K/M: Kazeifikasyon/Mineralizasyon, TLS: Total lezyon skoru. TS: Toplam skor. Skor değeri 20’lik büyütmede, 3 farklı alanda incelenen değerlerin ortalaması alınarak yapılmıştır.

Yapılan semikantitatif analize göre, soldan sağa total lezyon skoru göz önünde bulundurulduğunda 17 olguda hastalığı şiddetli, 6 olguda ise orta şiddette seyrettiği belirlendi. Hafif şiddette olgulara rastlanmadı. Lezyonların en şiddetli seyrettiği lokalizasyon ise tüm bulgulara ileum olarak belirlendi.

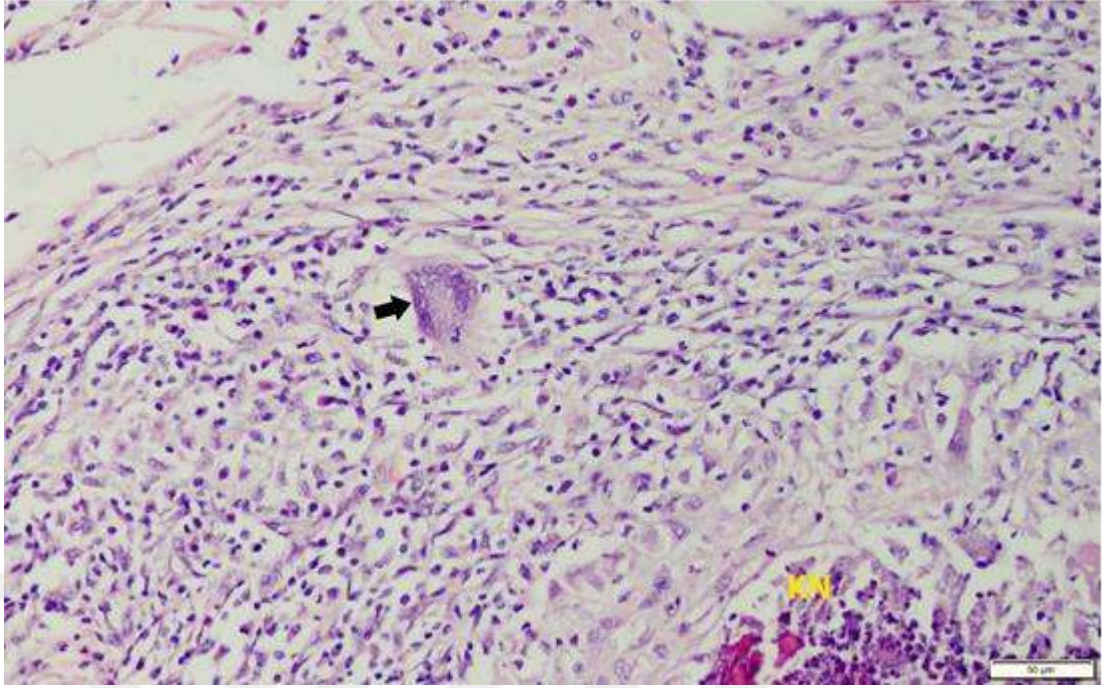
4.1.1.2. Mezenteriyel Lenf Düğümleri

Mezenteriyel lenf düğümleri bağırsaklarla paralel olarak etkilenmişti. Tüm olgularda kortikal sinuslar ve subkapsular alanlar etkilenmişti. Şiddetli olgularda kapsulanın ödem ve yangısal hücre infiltrasyonu sebebiyle genişlediği görüldü (Şekil 4.8.).



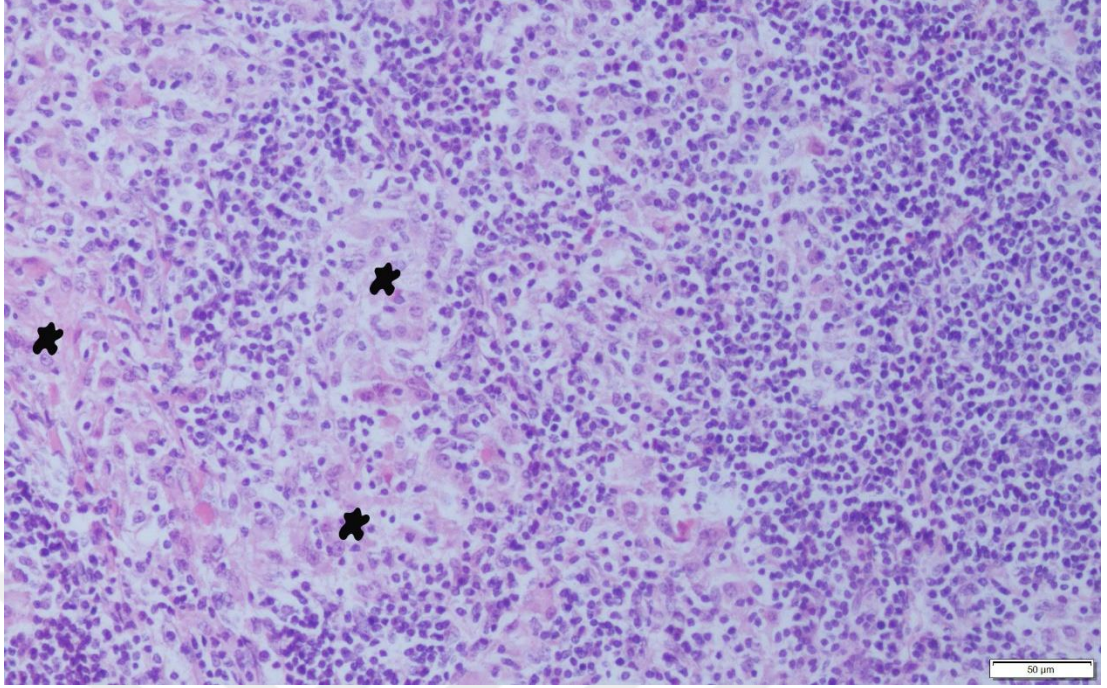
Şekil 4.8. Mezenteriyel lenf düğümü, kapsulada ve devamında trabekülde görülen yangısal infiltrasyon ve kortikal lenf folliküllerinde hiperplazi, H&E, X100, 100µm Barr.

Üç olguda kapsula altında dışa doğru protruze olan merkezleri kazeifiye, yer yer mineralizasyon gösteren etrafı fibröz kapsülle çevrili granülomlarla karşılaşıldı (Şekil4.9.).



Şekil 4.9. Mezenteriyel lenf düğümü, kapsula altında kazeifiye ve mineralize olmuş granulom. KN: kazeifikasyon nekrozu, ok: Langhans tipi dev hücresi. H&E X200, 50µm Barr.

Kortikal sinuslar olgunun şiddetine göre değişen derecede genişlemişti. Şiddetli olgularda biriken lenf sıvısı ve yoğun hücre infiltrasyonları sebebiyle dilate durumdaydı. Sinuslarda görülen yangısal hücre kompozisyonu lenfosit ağırlıklı olmakla birlikte yer yer makrofaj ve histiyositlerden oluşturuyordu. Perifoliküler alanlar, parakortikal ve medullar bölgedeki lenf foliküllerinin destek dokuları olan trabeküller ödem ve histiyosit-lenfosit infiltrasyonlarından dolayı genişlemişti. Bazı alanlarda fibroblast ve fibrosit proliferasyonu vardı. Bazı alanlar ise trabeküllerin hyalinize görünümde olduğu belirlendi. Kortikal ve parakortikal lenf folikülleri bütün olgularda hiperplazikti. Hafif şiddetteki bazı olgularda subkapsular sinuslarda histiyositozis vardı. Bazı olgularda ise kortikal ve medullar sinuslarda yer yer nodüler, yer yer diffuz epiteloid ve dev hücre infiltrasyonlarıyla karşılaşıldı. Hafif ve orta şiddetteki olgularda lenf düğümlerindeki hücresel infiltrasyon lenfositik-histiyositik karakterden yoğun epiteloid histiyosit, makrofaj ve Langhans tipi dev hücrelerini içeren infiltrasyonlara değişmekteydi. Kimi olgularda mikroskop sahasında x40'lık büyütmede sayıları 2 ile 5 arasında değişen, parankim içerisine dağınık vaziyette, epiteloid histiyosit hücrelerin baskın olduğu mikrogranulomlara rastlandı (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Mezenteriyel lenf düğümü, parakortikal bölgede epitelioid histiyosit kümelerinden oluşan mikrogranulom alanları (yıldızlar), H&E, X200, 50µm Barr.

Bazı alanlarda ise subkortikal olarak başlayan ve medullaya doğru ilerleyen kordonlar ya da öbekler halinde epitelioid histiyosit kümelerinden oluşan hücresel yığıntılar mevcuttu. Bu hücre kümeleri arasında bazıları tipik bazıları atipik formda Langhans tipi dev hücrelerine rastlandı. Langhans tipi dev hücrelerinin yerleşimi genellikle mikrogranulomların çevresine doğru olmakla birlikte, sayıları ve büyüklükleri granulomun boyutlarına göre değişmekteydi. Büyük alanlar halinde görülen granulomlarda Langhans tipi dev hücreleri daha iri, çekirdekleri eksantrik yerleşimli ve geniş sitoplazmalı olmakla birlikte sayıca daha fazlaydı. Küçük boyuttaki mikrogranulomlarda ise çekirdekleri az sayıda, sitoplazmadaki yerleşimi zaman zaman merkezi olan ve dar sitoplazmalı Langhans tipi dev hücreleri vardı. Bunları epitelioid histiyositlerden ayırmada zorluklarla karşılaşıldı.

Şiddetli olgularda kortikal ve parakortikal lenf foliküllerinde ve kapsula altında bağırsak serozası altındakilere benzer görünümde ancak daha geniş alanları kaplayan kazeöz odaklar ve mineralizasyonlar belirgindi. Bazı olgularında lenf damarlarındaki trombotik kitlelerde de kazeöz odaklara rastlandı. Bazıları merkezlerinde mineralizasyon barından kazeöz odaklar; yoğun epitelioid histiyosit, makrofaj, plazma

hücre, lenfosit ve Langhans tipi dev hücrelerinden oluşan hücrelerel reaksiyonla çevrelenmiş durumdaydı. Bu yapının etrafı fibroblast ve fibrositlerden oluşan neovaskularizasyondan zengin yapıyla sınırlandırılmıştı.

4.1.1.2.1. Kontrol grubu Mezenteriyel Lenf Düğümleri

Kontrol grubundaki mezenteriyel lenf düğümlerinin subkapsular, kortikal ve medullar sinuzoidlerinin genişlikleri normaldi. Retiküler çatının arasında bulunan lenf foliküllerinde boşalma yoktu. Trabeküllerde herhangi bir ödem bulgusu ya da genişleme söz konusu değildi. Parakortikal bölgedeki lenfosit miktarı normal görünüyordu.

4.1.1.2.2. Semikantitatif Analiz

Çalışmada kullanılan hastalıklı ve kontrol grubu dokularına yapılan hematoxilen & eozin boyama sonuçları histopatolojik olarak incelenerek, lezyonların mezenteriyel lenf düğümlerindeki şiddetinin semikantitatif analiz bulguları Tablo 4.2.'da belirtilmiştir

Tablo 4.2. Çalışma dokularındaki mezenteriyel lenf düğümlerinin belirtilen lezyonlara göre semikantitatif skorlaması. “0” yok, “+” hafif, “++” orta ve “+++” şiddetli. SG: sinuzoidlerde genişleme, YH: yangı hücresi, LFH: lenf folikülü hiperplazisi, NEK: nekroz, MG: mikrogranulom, EH: epiteloid histiyosit, LDH: Langhans tipi dev hücresi, TBS: Toplam Bireysel Skor, TLS: Toplam Lezyon skoru. Skor değeri 20’lik büyütmede, 3 farklı alanda incelenen değerlerin ortalaması alınarak yapılmıştır.

ON	SG	YH	LFH	NEK	MG	EH	LDH	TBS
1	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	19
2	+++	+	+++	++	++	+++	++	16
3	++	++	+++	0	++	++	++	13
4	++	+++	+++	+	++	++	+	14
5	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	19
6	+++	+++	+++	+	++	++	+	15
7	++	++	++	0	++	++	+	11
8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	21
9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	21
10	++	++	+++	0	++	+++	+++	15
11	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	19
12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	21
13	++	+	++	0	++	++	+	10
14	++	+	+	++	++	++	+	11
15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	21
16	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	19
17	++	++	++	+	++	++	+	12
18	++	+++	++	++	+++	+++	+	16
19	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	21

Tablo 4.2. (Devamı) Çalışma dokularındaki mezenteriyel lenf düğümlerinin belirtilen lezyonlara göre semikantitatif skorlaması. “0” yok, “+” hafif, “++” orta ve “+++” şiddetli. SG: sinuzoidlerde genişleme, YH: yangı hücresi, LFH: lenf folikülü hiperplazisi, NEK: nekroz, MG: mikrogranulom, EH: epiteloid histiyosit, LDH: Langhans tipi dev hücresi, TBS: Toplam Bireysel Skor, TLS: Toplam Lezyon skoru. Skor değeri 20’lik büyütmede, 3 farklı alanda incelenen değerlerin ortalaması alınarak yapılmıştır

20	+	++	++	++	++	++	++	13
21	++	++	+++	0	++	++	+	12
22	++	++	++	0	++	++	+	11
23	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	20
K1	0	0	0	0	0	0	0	0
K2	0	0	0	0	0	0	0	0
K3	0	0	0	0	0	0	0	0
K4	0	0	0	0	0	0	0	0
K5	0	0	0	0	0	0	0	0
TLS	56	54	61	38	57	59	45	370

Yukarıdaki tabloda, yapılan semikantitatif analiz bulgularına göre; soldan sağa toplanarak yapılan total lezyon skoruna göre mezenteriyel lenf düğümlerinde 14 olguda “şiddetli” 9 olguda ise “orta” şiddette lezyonların şekillendiği belirlendi.

4.1.1.3. İstatistiksel Analiz Bulguları

Histopatolojik bulguların semikantitatif analizi sonuçlarının istatistiksel analizi yapıldı. İnce bağırsaklarda görülen villöz atrofi, epitel nekrozu, mononukleer hücre infiltrasyonları ve epiteloid histiyosit yoğunluğu şeklindeki lezyonların, duodenum-ileum, duodenum-jejunum, jejunum-ileum arasında (Tablo 4.3.), ileumdaki epitel nekrozu-epiteloid histiyosit yoğunluğu, mononukleer hücre infiltrasyonu-Langhans tipi dev hücresi arasındaki (Tablo 4.4.) ilişki Sample T testi kullanılarak kendi aralarında ayrı ayrı değerlendirildi. Bunun yanı sıra mezenteriyel lenf düğümü ile ileum

arasındaki epiteloid histiyosit yoğunlukları ve mononukleer hücre infiltrasyonları bulguları karşılaştırmalı olarak Sample T testi ile değerlendirildi (Tablo 4.5.).

Tablo 4.3. Bağırsak segmentlerinin semikantitatif skorlamalarının istatistiksel analizi.

Gruplar	D-J	D-I	J-I
Villöz atrofi	0,786±0,130 P<0,005	1,321 ±0,171 P<0,005	0,536±0,141 P<0,005
Epitel nekrozu	0,607±0,148 P<0,005	1,214±0,188 P<0,005	0,607±0,139 P<0,005
Mn. Hc. İnf.	0,500±0,109 P<0,005	1,000±0,126 P<0,005	0,500±0,109 P<0,005
Epiteloid hist.	0,429±0,108 P<0,005	1,000±0,136 P<0,005	0,571±0,108 P<0,005

*Veriler ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.

**D: duodenum, J: Jejunum, I: İleum, VA: Villöz Atrofi, EN: Epitel Nekrozu, EH: Epiteloid Histiyosit, Mn. Hc. İnf.: Mononukleer hücre infiltrasyonu.

Tablo 4.4. İleumdaki semikantitatif skorlamaların istatistiksel analizi

GRUPLAR	ileum	P değeri
Ep.nek.-ep.his.	0,071±0,192	0,713
Ldh-Mn.Hc.İnf.	0,679±0,155	P<0,005

*Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

**Ep.nek.: Epitel nekrozu, Ep.his.: Epiteloid histiyosit, Ldh: Langhans tipi dev hücresi, Mn.Hc.İnf: Mononukleer hücre infiltrasyonu.

Tablo 4.5. Mononükleer hücre infiltrasyonu ve epiteloid histiyosit semikantitatif skorlamalarının ileum ile mezenteriyel lenf düğümü arasındaki istatistiksel analizi

GRUPLAR	İleum-mld	P değeri
Mn.Hc.İnf.	0,393±0,148	P<0,05
Ep. His.	0,178±0,115	P<0,05

*Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

** Ep.his.: Epiteloid histiyosit, Mn.Hc.İnf: Mononükleer hücre infiltrasyonu, mld: mezenteriyel lenf düğümü.

4.1.2. Ziehl-Neelsen Boyama

Bağırsak ve lenf düğümlerindeki lezyonların asido-resistans bir bakteri olan MAP yönünden değerlendirilmesinin yapılabilmesi amacıyla Ziehl-Neelsen özel boyama yöntemi kullanıldı. Mavi zemin üzerindeki parankim dokuların arasında yangısal infiltrasyondaki fagositik hücre sitoplazmaları içinde ve nekrotik alanlarda serbest halde çomak ya da kırıntı şeklinde, küçük gruplar veya yığıntılar formunda, pembeden koyu kırmızı renge değişen renklerde gram pozitif, asido-resistans, etkenlere rastlandı. Etkenin lokalizasyonu ince bağırsak ve mezenteriyel lenf düğümlerinde ayrı olarak incelendi. İnce bağırsaklarda duodenum, jejunum ve ileumda görülen etken tutulumları mukoza, submukoza ve seroza katmanlarında ayrı ayrı değerlendirildi.

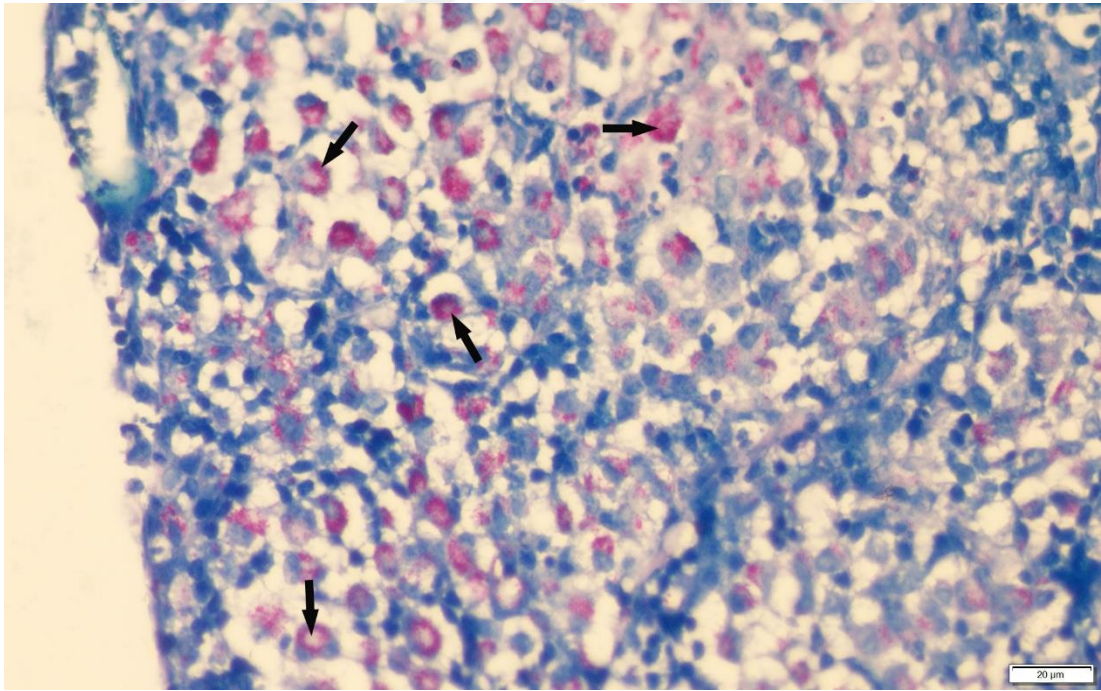
4.1.2.1. Bağırsaklar

4.1.2.1.1. Duodenum

İnce bağırsakların ilk bölümü olan duodenumdan alınmış kesitlerin Ziehl-Neelsen boyamaları incelendiğinde, etkenlerin lezyonlu bölgelerde, değişen yoğunluklarda yerleşim gösterdiği tespit edildi. Villusların apikal bölgelerindeki L. propriada dağınık halde, bazı alanlarda tek tük, bazı alanlarda yığınaklar halinde etkenlerin varlığı izlendi. Benzer yapıdaki etken boyanmalarına L. propriadaki yangısal hücre infiltrasyonlarını oluşturan hücrelerin sitoplazmalarında da rastlandı. Pozitif boyanmalar çoğunlukla makrofaj, az sayıdaki epiteloid histiyosit ve tek tük

bulunan Langhans tipi dev hücrelerinde görülmekle birlikte, bazı alanlarda tek tük nötrofil lökosit sitoplazmalarında da gözlemlendi. Submukozada çoğunlukla pozitif boyanmalara rastlanmazken bazı olgularda histiyosit ve makrofajların sitoplazmaları ve intersitisyel bölgede serbest halde, pembe-kırmızı renkli boyanan etkene ait yapılara rastlandı (Şekil 4.11.). Serozal bölgedeki etkene ait boyanmalar L. propria ile paralellik göstermekteydi. Özellikle lenf damarları lümeni, duvarı ve çevresinde etkene ait pozitif boyanmalar belirginken mezotel katmanının altındaki gevşek bağ dokuda belli belirsiz etkene ait yapılara rastlandı.

Kontrol grubundan alınan kesitlere yapılan Ziehl-Neelsen boyamalarında; hastalıklı hayvanlarda etken görülen yerler kontrol grubunda incelendi. Hastalıklı hayvanların ince bağırsaklarının L. proprialarında etkenle dolu makrofaj görünüşleri kontrol grubu kesitlerinde mevcut değildi. Peyer plaklarının çevrelerinde görülen etken dolu makrofajlar kontrol grubunda gözlenmedi. İnce bağırsakların geneline bakıldığında asit-fast reaksiyonu gösteren herhangi bir alanla karşılaşılmaı.

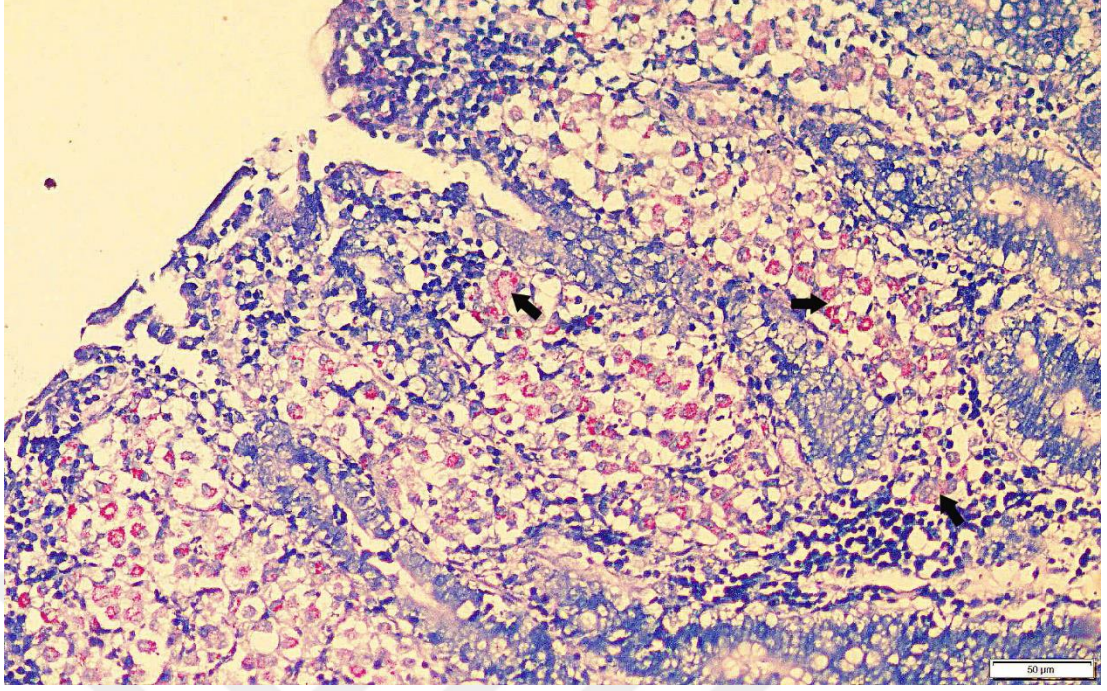


Şekil 4.11. Duodenum, lamina propriada asit fast reaksiyon pozitif alanlar (oklar). Ziehl-Neelsen, X400, 20µm Barr.

4.1.2.1.2. Jejunum

Ziehl-Neelsen boyaması sonucunda tespit edilen etken boyamaları, jejunumda görülen histopatolojik lezyonların duodenuma nazaran daha şiddetli olmasına paraleldi. Jejunumdaki villus atrofi ve füzyonu görülen bölgelerdeki L. propriada pembe-kırmızı renkli etkenlerin az yoğunlukta olduğu dikkati çekti (Şekil 4.12.). L. propriadaki genişleyen lakteallerin lümeninde ve çevresinde bulunan mononükleer hücre infiltrasyonlarındaki hücrelerin sitoplazmalarında pozitif boyanmalarla gösterilen etkenlere rastlandı. Etkene ait yapılar belirgin olarak makrofajlar ve Langhans tipi dev hücrelerinin sitoplazmalarında gözlenirken bazı alanlarda tek tük nötrofil lökositlerde de tespit edildi. Yangısal hücre infiltrasyonu ve ödem nedeniyle genişleyen L. propriada yangı hücrelerinin arasında serbest halde kimi zaman yığınaklar halinde, kimi zaman ise bölgede dağınık halde etkenlere rastlandı. Duodenumda serozal bölgede görülen etkenler daha yoğun vaziyette jejunum serozasında da görülmekteydi.

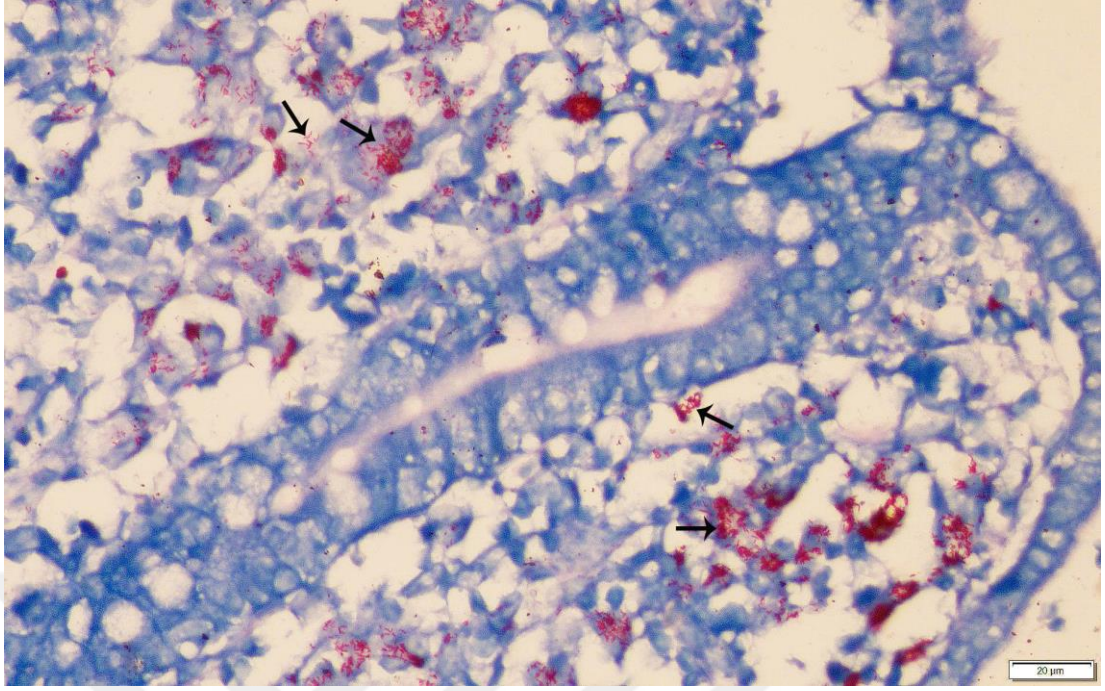
Kontrol grubundan alınan kesitlere yapılan Ziehl-Neelsen boyamalarında; hastalıklı hayvanlarda etken görülen yerler kontrol grubunda incelendi. Hastalıklı hayvanların ince bağırsaklarının L. proprialarında etkenle dolu makrofaj görünimleri kontrol grubu kesitlerinde mevcut değildi. Peyer plaklarının çevrelerinde görülen etken dolu makrofajlar kontrol grubunda gözlenmedi. İnce bağırsakların geneline bakıldığında asit-fast reaksiyonu gösteren herhangi bir alanla karşılaşılmaı.



Şekil 4.12. Jejunum, lamina propriada asit fast reaksiyon pozitif alanlar (oklar). Ziehl-Neelsen, X200, 50µm Barr.

4.1.2.1.3. İleum

Villusların apikal bölgelerindeki L. propriada dağınık ve yığınaklar halinde etkenlerin varlığı izlendi. Benzer yapıdaki etken boyanmalarına L. propriadaki yangısal hücre infiltrasyonlarını oluşturan hücrelerin sitoplazmalarında da rastlandı. Pozitif boyanmalar çoğunlukla makrofaj, epiteloid histiyosit ve Langhans tipi dev hücrelerinde görülmekle birlikte tek tük bulunan nötrofil lökositlerin sitoplazmalarında da gözlendi (Şekil 4.13.). Submukozada hafif derecelerde pozitif boyanmalara rastlanırken bazı olgularda histiyosit ve makrofajların sitoplazmaları ve intersitisyel bölgede serbest halde, pembe-kırmızı renkli boyanan etkene ait yapılara rastlandı. Serozal bölgedeki etkene ait boyanmalar L. propria ile paralellik göstermekteydi. Özellikle lenf damarları lümeni, duvarı ve çevresinde etkene ait pozitif boyanmalar belirginken, mezotel katmanının altındaki gevşek bağ dokuda belli belirsiz etkene ait yapılara rastlandı.

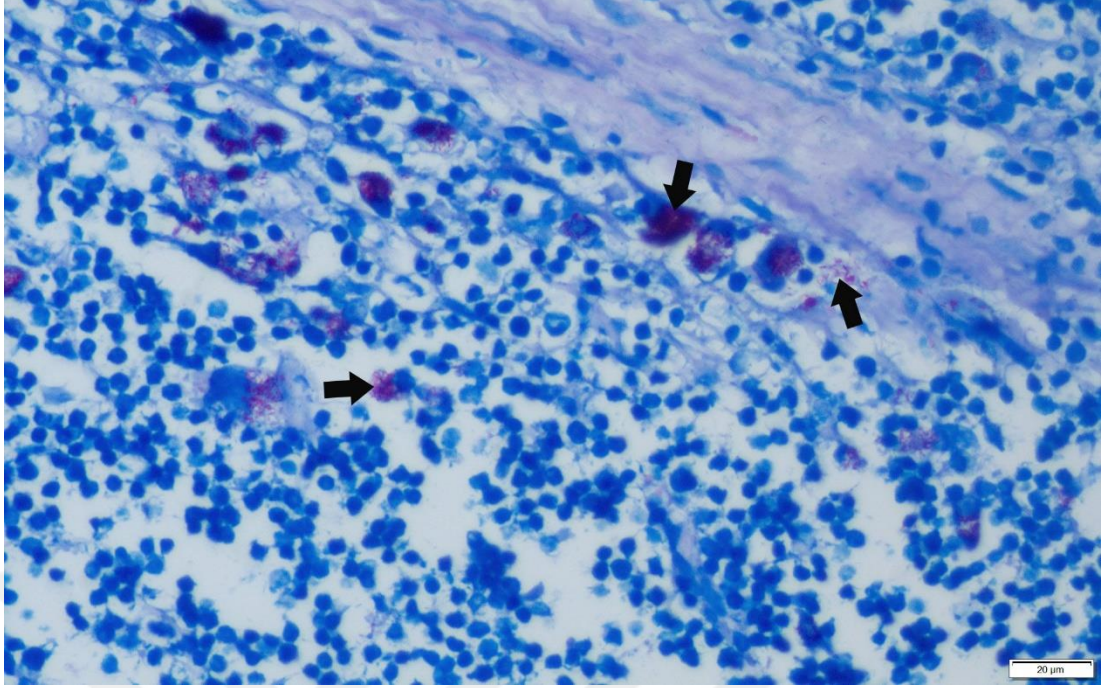


Şekil 4.13. İleum, lamina propriada asit fast reaksiyon pozitif alanlar (oklar). Ziehl-Neelsen, X400, 20µm Barr.

Kontrol grubundan alınan kesitlere yapılan Ziehl-Neelsen boyamalarında; hastalıklı hayvanlarda etken görülen yerler kontrol grubunda incelendi. Hastalıklı hayvanların ince bağırsaklarının L. proprialarında etkenle dolu makrofaj görünüşleri kontrol grubu kesitlerinde mevcut değildi. Peyer plaklarının çevrelerinde görülen etken dolu makrofajlar kontrol grubunda gözlenmedi. İnce bağırsakların geneline bakıldığında asit-fast reaksiyonu gösteren herhangi bir alanla karşılaşılmadı.

4.1.2.2. Mezenteriyel Lenf Düğümleri

Histopatolojik değerlendirmede şiddetli olguların mevcut olduğu olgularda kapsula altındaki ve sinuslardaki hücre infiltrasyonunu oluşturan yangısal hücrelerden makrofaj sitoplazmalarında asit-fast reaksiyonu gösteren etkenlerin yığıntılar veya kümeler şeklinde bulunduğu görüldü. Bu olguların kimisinde epitelioid histiyosit ve Langhans tipi dev hücrelerinin bazılarının sitoplazmalarında da az miktarda pembe-kırmızı renkli etkene ait yığıntılar vardı. Perifoliküler ve parakortikal-medullar alanlardaki trabeküllerde bulunan yangısal hücre infiltrasyonu elemanlarının bazılarında da pozitif boyanmalar gözlemlendi (Şekil 4.14.).



Şekil 4.14. Mezenteriyel lenf düğümü, lenf folikülünün periferinde asit fast reaksiyon pozitif alanlar (oklar). Ziehl-Neelsen, X400, 20µm Barr.

Kontrol grubunun mezenteriyel lenf düğümü kesitlerinde asit-fast reaksiyonu görülmedi. Hastalık grubunda asit-fast reaktif bölgelerle karşılaştırıldığında, hastalık grubu lenf düğümlerinin kortikal, medullar ve subkapsuler alanlarında ve folliküler ve parafolliküler alanlarda etkene ait yapılara rastlanmadı.

4.1.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

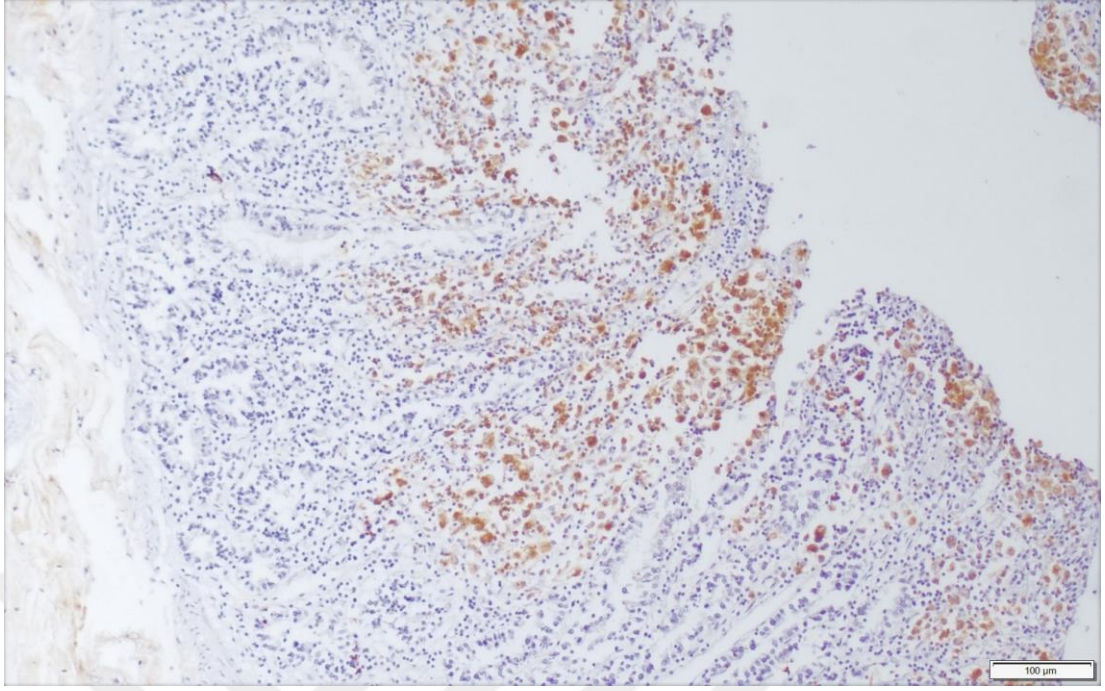
İmmunohistokimyasal metotla yapılan boyamalarda anti-Mannose Bağlayıcı Lektin ve anti-Osteopontin antikorlarının ince bağırsaklar ve mezenteriyel lenf düğümlerindeki salınımları incelendi. Hematoksilen & Eozin ve Ziehl-Neelsen boyamalarda tespit edilen lezyonlu bölgelerde immunpozitiflikler değerlendirildi. Buna göre immunpozitif boyanmalar yönünden duodenum, jejunum, ileum ve mezenteriyel lenf düğümleri incelendi.

4.1.3.1. Anti-Mannoz Bağlayıcı Lektin (MBL) Boyanmalar

4.1.3.1.1. Bağırsaklar

4.1.3.1.1.1. Duodenum

Duodenumun lümene bakan yüzündeki villus epitelleriyle Liberkühn kript epitellerinin sitoplazmalarında hafif derecede immunopozitiflikler tespit edildi. Dilatasyona uğramış lakteallerin endotellerinde, lakteal çevresinde serbest halde ve az sayıdaki histiyositlerin sitoplazmalarında da hafif derecede immunreaksiyon görüldü. Lamina propriada bulunan lenfosit, plazma hücrelerinde çok hafif immunreaksiyon görülürken nötrofillerde ise hiç immunopozitiflik gözlenmedi. Lamina propriadaki diğer yangısal hücrelerden olan ve sayıca diğer hücelere yakın olan histiyositlerin sitoplazmalarında ise kuvvetli immunopozitifliklere rastlandı (şekil 4.15.). Brünner bezlerinde immunreaksiyon ya hiç gözlenmedi ya da hafif derecede immunopozitifliklere rastlandı. Serozada bulunan lenf damarları ve çevresi en kuvvetli immunreaksiyon veren bölgeydi. Lenf damarlarının endotel katmanında ve lenf damarı çevresindeki bağ dokuda ile damar lümeni ve çevresinde bulunan histiyositlerde de şiddetli immunopozitiflikler mevcuttu.

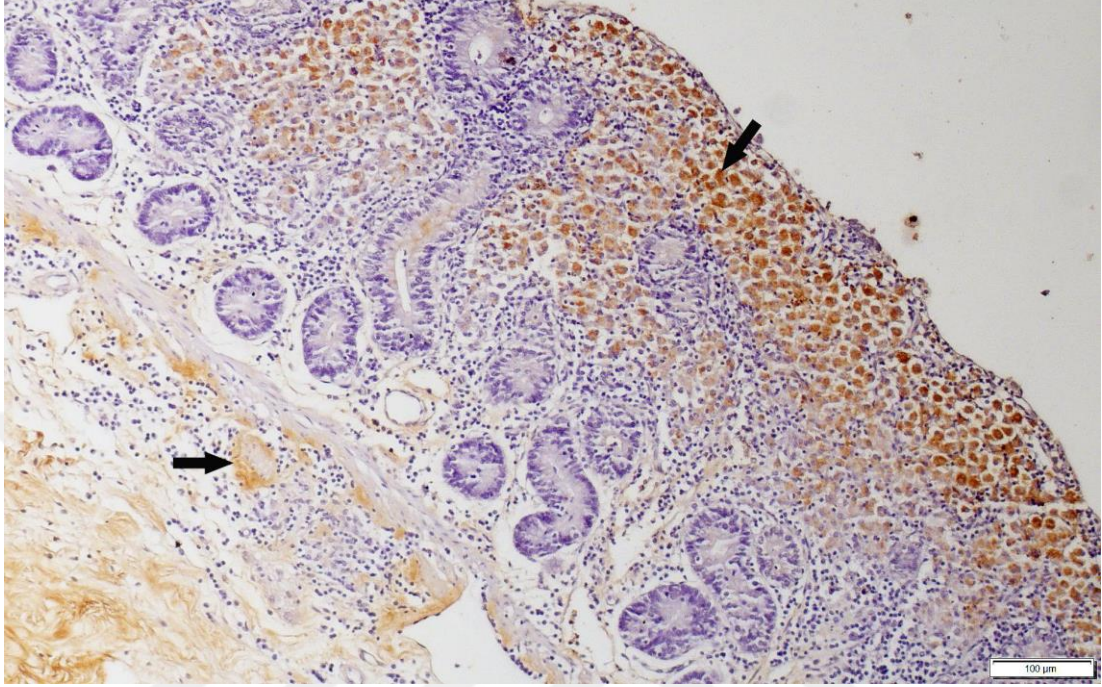


Şekil 4.15. Duodenum, lamina propriada anti-MBL şiddetli immunopozitif alanlar, ABC-P, X100, 100µm Barr.

4.1.3.1.1.2. Jejunum

Hematoxilen eozin ve Ziehl-Neelsen boyamalarda tespit edilen alanlar anti-MBL immunoreaktivite yönünden incelendi. Jejunumdaki histopatolojik lezyonların şiddetine paralel olarak duodenuma göre, anti-MBL immunoreaktivitesinin genel olarak daha kuvvetli ve daha fazla alanda gözlemlendiği belirlendi. Villus epitellerinde segmental olarak görülen deskuamasyon bölgelerindeki ve sağlam kalan segmentlerdeki enterositlerin sitoplazmalarında hafiften orta dereceye değişen şiddette immunopozitif reaksiyonlara rastlandı. Jejunumda görülen nonspesifik subakut enteritis lezyonlarının görüldüğü ve Ziehl-Neelsen boyamada etkenlerin tespit edildiği olgularda histiyosit, makrofaj, Langhans tipi dev hücresi sitoplazmalarında orta ve şiddetli derecede anti-MBL immunopozitif alanlara rastlandı. Lenfosit ve plazma hücrelerindeyse ya çok hafif immunopozitiflik gözlemlendi ya da hiç immunopozitiflik gözlemlenmedi. Lezyonları epitelooid histiyosit yığıntıları şeklinde olan olgularda ise bu hücrelerin sitoplazmalarında lapa tarzında, şiddetli derecede immunreaktivitelere rastlandı. Benzer şiddetteki immunopozitifliklere submukozadaki histiyositik hücre

sitoplazmaları ile serozadaki lenf damarları lümeni ve çevresindeki histiyosit ve makrofaj sitoplazmalarında da rastlandı (Şekil 4.16.).



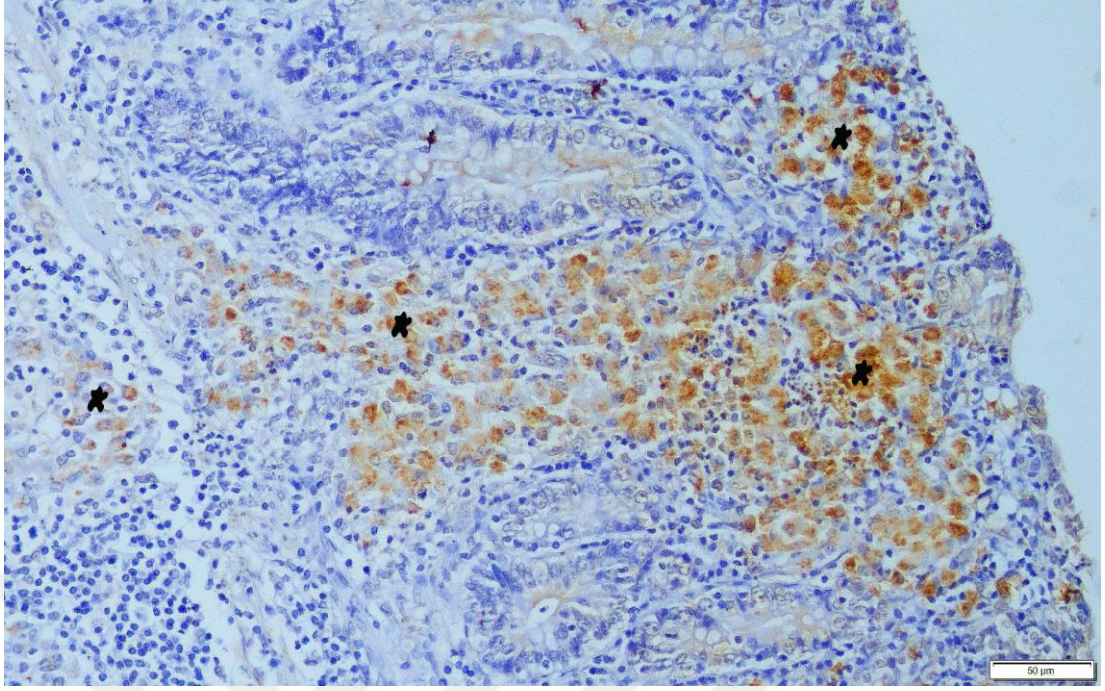
Şekil 4.16. Jejunum, lamina propria ve submukozadaki anti-MBL şiddetli immunopozitif alanlar (oklar), ABC-P, X100, 100µm Barr.

4.1.3.1.1.3. İleum

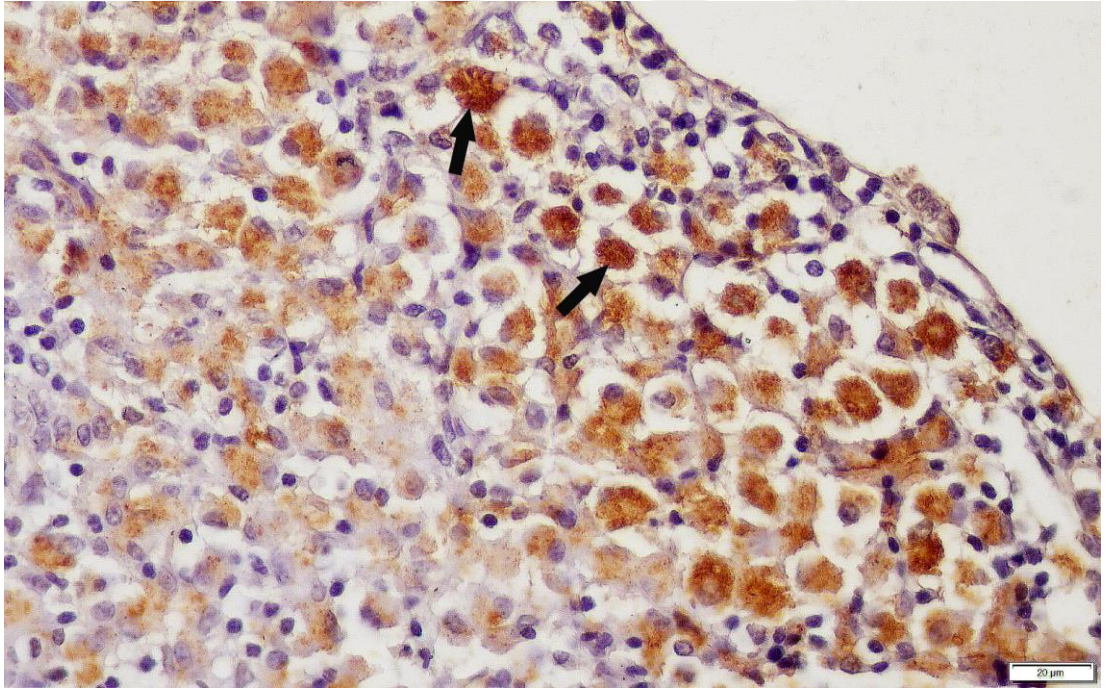
Enfeksiyonun şiddetinin en yüksek olduğu bölge olan ileumda, çoğunlukla deskuame olan ve az sayıdaki sağlam kalan villus epitellerinin sitoplazmalarında ortadan şiddetliye değişen derecede anti-MBL immunreaktivite gözlemlendi. Liberkühn kript epitelleri ve lümeneye dökülmüş mukusla karışık hücresel debrislerde orta derecede immunpozitifliklere rastlandı. Epitel katmanının altındaki lakteallere ait endotellerin sitoplazmalarıyla bazal membranlarında, ayrıca lakteallerin lümeni ve çevresinde görülen mononükleer seri yangı hücrelerinin sitoplazmalarında immunpozitiflikler tespit edildi. Lamina propriadaki makrofaj, epiteloid histiyosit ve Langhans tipi dev hücrelerinde orta dereceden şiddetliye değişen immunreaktivite gözlemlendi (Şekil 4.17.). Lezyonların epiteloid histiyosit yığınları şeklinde görüldüğü olgularda diğer hücrelerden belirgin şekilde seçilebilen, sitoplazmalarında lapa tarzında koyu kahve renkli şiddetli immunpozitiflikler barındıran histiyositlere

rastlandı (Şekil 4.18.-4.19.). İleumda Peyer plaklarındaki hiperplazinin şiddetine paralel olarak, Peyer plaklarındaki lenfositlerin sitoplazmalarında hafif, histiyositlerin sitoplazmalarında ise şiddetli derecede immunreaksiyonlar görüldü. Lenf folikülleri içerisindeki epiteloid histiyosit ve makrofaj ağırlıklı mikrogranulomları oluşturan hücrelerde de şiddetli pozitif immunreaksiyonlar gözlemlendi. Parafoliküler bölgede görülen hücre infiltrasyonunu oluşturan makrofaj ve histiyosit sitoplazmalarında ise şiddetli immunopozitifliklere rastlandı. Serozada bulunan lenf damarlarındaki yangısal reaksiyon ile görülen immunopozitifliklerin şiddeti birbirine paralellik göstermekteydi. Subakut karakterde yangısal reaksiyon görülen serozadaki makrofaj, histiyosit ve Langhans tipi dev hücrelerinde şiddetli derecede immunopozitiflik gözlenmekteydi. Serozadaki lenf damarlarının endoteli, damar duvarı ve çevresinde orta şiddette immunreaktivite mevcuttu. Lenf damarlarının lümeninde ve çevresindeki histiyosit ve makrofajların sitoplazmalarında şiddetli immunopozitiflikler görüldü. Seroza altında bleb ya da cep şeklindeki alanlarda görülen kazeöz odakların çevresindeki epiteloid histiyosit, makrofaj, Langhans tipi dev hücrelerinin sitoplazmalarında ve kazeöz değişikliklerin periferinde şiddetli immunopozitifliklere rastlandı. Bu granulomatöz odakların merkezlerindeki kazeifikasyon ve mineralizasyonun görüldüğü alanlarda immunreaksiyon ya hiç yoktu ya da hafif şiddetteydi.

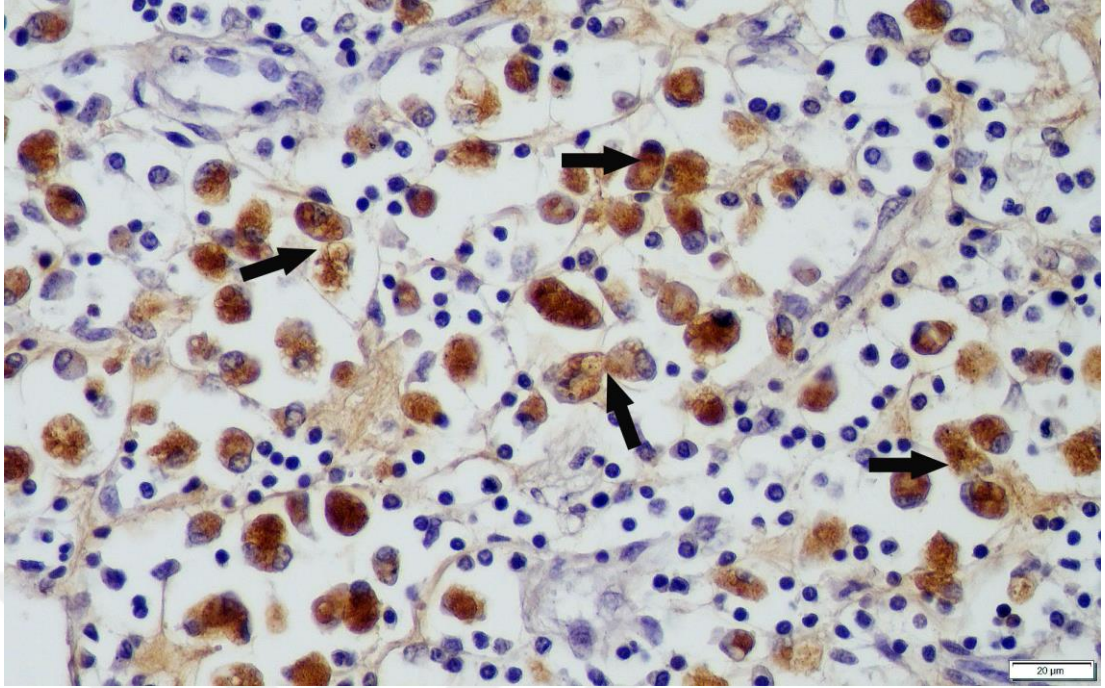
Kontrol grubuna ait kesitlerin anti-MBL immunohistokimyasal boyamalarında bağırsaklarda herhangi bir immunopozitiflik gözlenmedi (Şekil 4.20.).



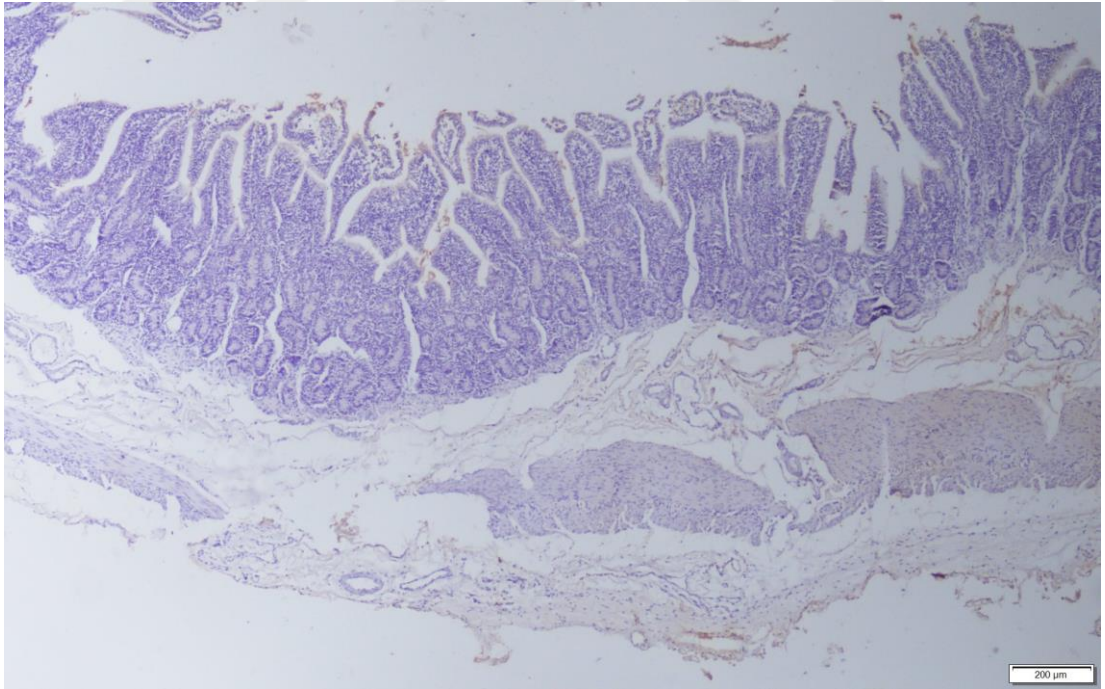
Şekil 4.17. İleum, lamina propria ve submukozada anti-MBL şiddetli immunopozitif alanlar (yıldızlar), ABC-P, X200, 50µm Barr.



Şekil 4.18. İleum, lamina propriada makrofajların sitoplazmasında anti-MBL immunopozitif vakuoller (oklar), ABC-P, X400, 20µm Barr.



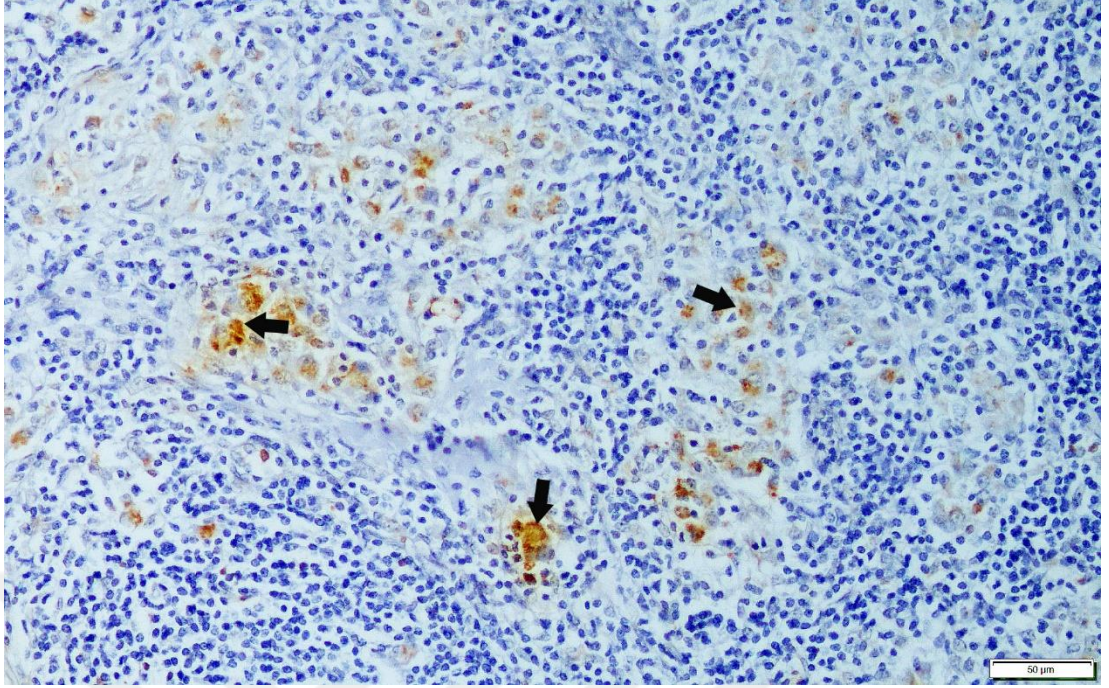
Şekil 4.19. İleumda lamina propriadaki makrofajların sitoplazmasında vakuoller içerisinde ve serbest haldeki anti-MBL immunopozitif vakuoller (oklar). ABC-P, X400, 20µm Barr.



Şekil 4.20. Kontrol grubu, jejunum, lamina propriada anti-MBL negatif immunreaksiyon, ABC-P, X40, 200µm Barr.

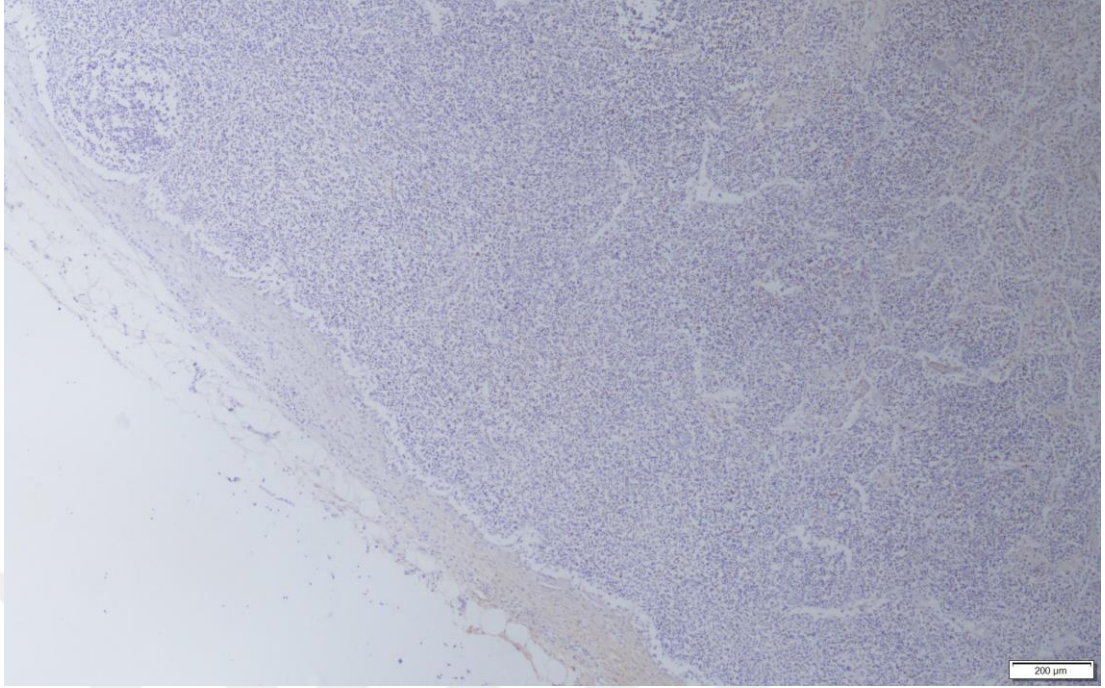
4.1.3.1.2. Mezenteriyel Lenf Düğümleri

Kortikal medullar sinuslar incelendiğinde, sinuslardaki hücre infiltrasyonunun meydana getiren histiyosit ve makrofajlarda şiddetli immunopozitiflikler görüldü. Genişlemiş olan subkapsular doku ile kortikal ve medullar sinus lumenlerindeki histiyositler ve Langhans tipi dev hücreleri sitoplazmalarında şiddetli immunopozitiflikler görüldü. Lenf folikülü içerisindeki mikrogranulom parankimdeki dağınık olarak bulunan ve zaman zaman parankim içerisine kollar ya da çit tarzında infiltre olan bazı alanlarda birbirleriyle birleşen granulomları oluşturan çoğunluğu epiteloid histiyosit ve makrofajlardan oluşan aralarında bazıları atipik bazıları ise tipik görünümdeki Langhans tipi dev hücrelerinin sitoplazmasında şiddetli immunopozitifliklere rastlandı (Şekil 4.21.). Lenf foliküllerinin arasında bulunan destek dokudaki granulomatöz odaklarda da şiddetli immunopozitif reaksiyonlar mevcuttu. Lezyonun şiddetlendiği ve kazeöz odakların belirginleştiği ve bunların fibröz dokuyla sınırlandığı nekrotik granulomatöz odaklarda ise nekrotik bölgeler negatif immunreaksiyon gösterirken nekrozun periferinde serbest halde pozitif immunreaksiyon gözlendi. Nekrozu çevreleyen makrofaj, epiteloid histiyosit ve Langhans tipi dev hücrelerinin sitoplazmalarında şiddetli immunopozitiflikler gözlenirken granulomu çevreleyen fibrotik hücrelerde ya çok hafif görüldü ya da hiç immunopozitiflik gözlenmedi.



Şekil 4.21. Mezenteriyel lenf düğümü, parenkim içerisindeki epitelooid histiyositlerde anti-MBL şiddetli immunopozitif alanlar (oklar), ABC-P, X200, 50µm Barr.

Kontrol grubuna ait dokularda kortikal ve medullar sinuslar ile lenf foliküllerindeki histiyositlerde çok hafif ya da hiç immunreaksiyon gözlenmedi (Şekil 4.22.).



Şekil 4.22. Kontrol grubu, mezenteriyel lenf düğümü, anti-MBL negatif immunreaksiyon, ABC-P, X40, 200µm Barr.

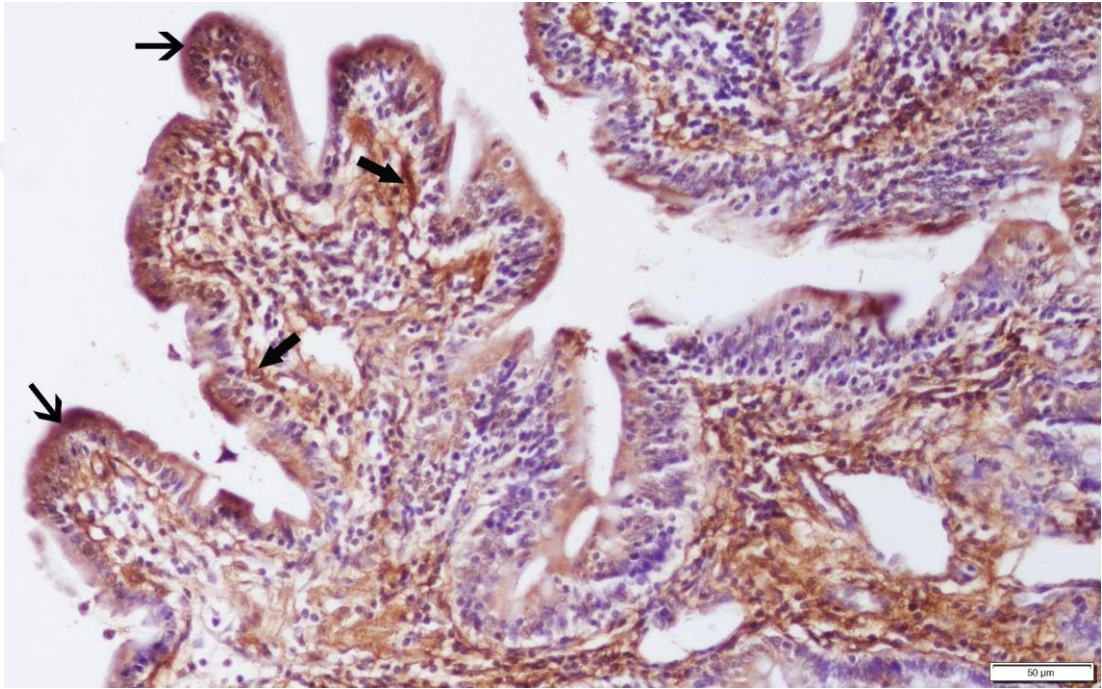
4.1.3.2. Anti-Osteopontin Boyanmalar

4.1.3.2.1. Bağırsaklar

4.1.3.2.1.1. Duodenum

Villus atrofi ve füzyonu ile epitelyal deskuamasyonun hafif olarak seyrettiği duodenumda osteopontin salınımlarının daha hafif ve daha az bölgede şekillendiği görüldü. İmmunopozitif boyanmaların en belirgin olarak görüldüğü bölge villusların lümene bakan yüzeyindeki enterositlerdi. Anti-osteopontin pozitif boyanmalara enterositlerin fırçamsı kenar ve sitoplazmalarında hafif şiddette ve dağınık şekilde rastlandı. Bununla birlikte L. propriadaki histiyositik hücrelerin sitoplazmalarında da orta derecede immünopozitivite belirlendi. Benzer pozitif reaksiyonlara kript epitellerinin lümene bakan yüzleri ve lümenlerinde serbest halde rastlandı (Şekil 4.23.). Submukozada bulunan Brünner bezlerinde çoğunlukla pozitif boyanmalar tespit edilmezken, histopatolojik olarak enfeksiyonun şiddetli seyrettiği belirlenen bazı olgularda daha şiddetli boyandığı görüldü. Tunika muskularisteki kas tabakası

immunreaktivite yönünden çoğunlukla negatifti. Kas demetleri arasında mononükleer seri hücre infiltrasyonları barındıran bazı olgularda ise histiyosit sitoplazmalarında hafif-orta derecede immunpozitifliklere rastlandı. Fibroblastik aktivitenin yoğun olduğu olgularda, özellikle retiküler hücrelerde daha yoğun olmak üzere fibroblast-fibrositlerde yoğun immunreaktivite görüldü. Serozadaki immunpozitivite, yangılı lenf damarları içerisinde ve çevresinde bulunan histiyositik seri hücrelerin sitoplazmalarıyla sınırlıydı.

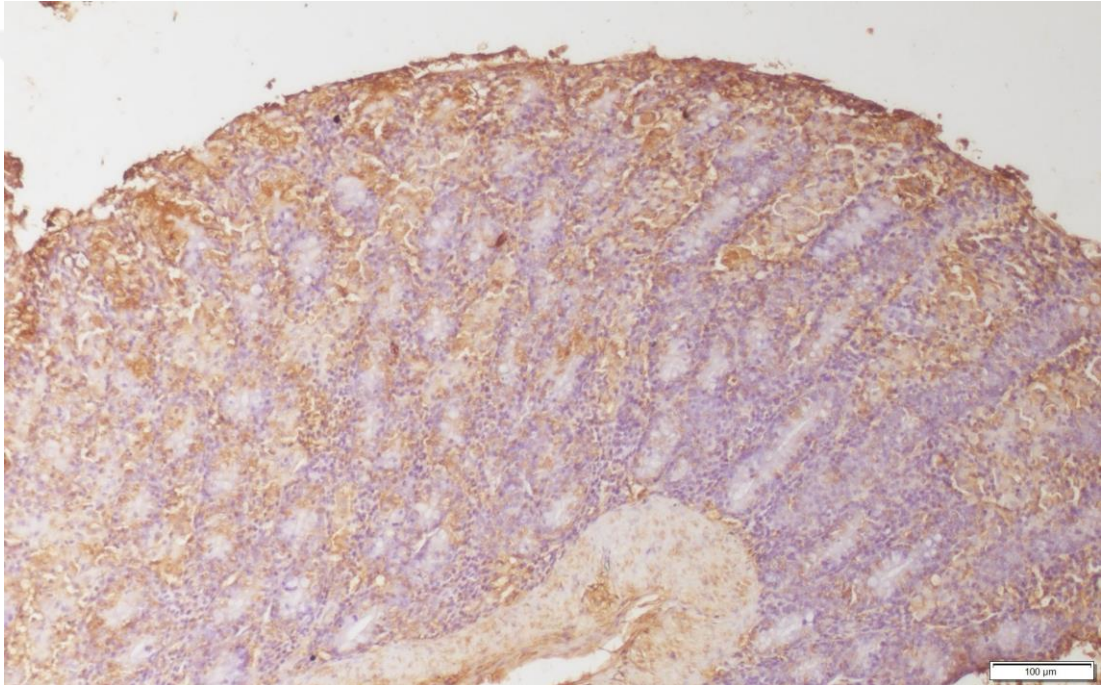


Şekil 4.23. Duodenum, enterositlerde (ince oklar), lamina propriada ve bağ dokuda (kalın oklar) anti-OPN şiddetli immunpozitif alanlar, ABC-P, X100, 100µm Barr.

4.1.3.2.1.2. Jejunum

Hematoksilen eozin ve Ziehl-Neelsen boyamalarda tespit edilen alanlar anti-osteopontin immunoreaktivite yönünden incelendi. Jejunumdaki histopatolojik lezyonların şiddetine paralel olarak duodenuma göre, anti-osteopontin immunoreaktivitesinin genel olarak daha kuvvetli ve daha fazla alanda gözlemlendiği belirlendi. Jejunumda görülen nonspesifik subakut enteritis lezyonlarının görüldüğü ve Ziehl-Neelsen boyamada etkenlerin tespit edildiği olgularda histiyosit, makrofaj, Langhans tipi dev hücresi sitoplazmalarında hafif-orta şiddette anti-osteopontin

immunopozitif alanlara rastlandı (Şekil 4.24.). Lenfosit ve plazma hücrelerindeyse ya çok hafif immunopozitiflik gözlendi ya da hiç immunopozitiflik gözlenmedi. Olayın kronikleştiği ve fibröz dokunun belirginleştiği olgularda retikulum iplikleri, fibroblast ve fibrositlerde ise kuvvetli immunopozitiflik belirlendi. Lezyonları epiteloid histiyosit yığıntıları şeklinde olan olgularda ise bu hücrelerin sitoplazmalarında hafiften orta şiddete değişen derecelerde immunreaktivitelere rastlandı. Benzer şiddetteki immunopozitifliklere submukozadaki histiyositik hücre sitoplazmaları ile serozadaki lenf damarları lümeni ve çevresindeki mononükleer seri yangı hücrelerinin sitoplazmalarında da rastlandı.

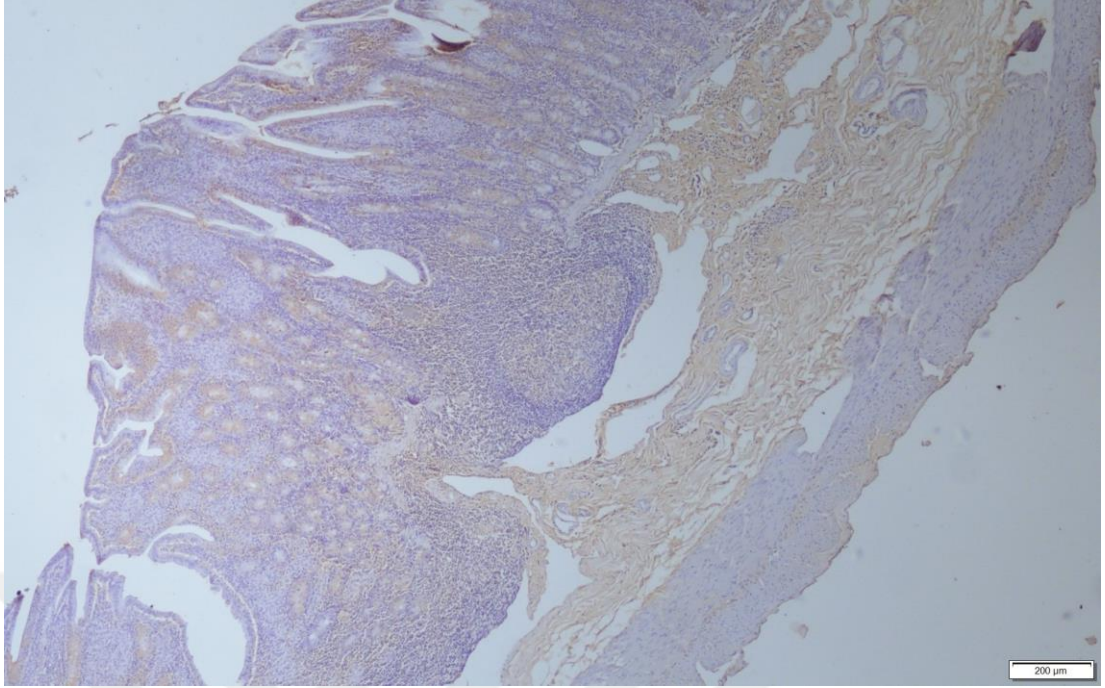


Şekil 4.24. Jejunum, enterositlerde, lamina propriada ve bağ dokuda anti-OPN şiddetli immunopozitif alanlar, ABC-P, X100, 100µm Barr.

4.1.3.2.1.3. İleum

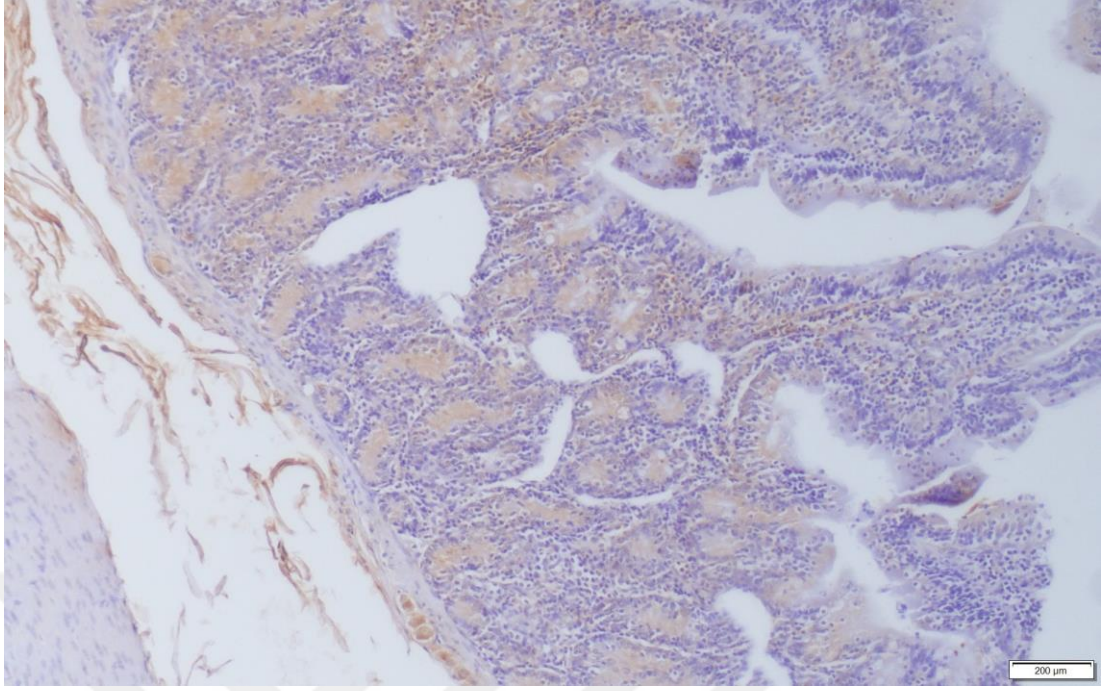
Enfeksiyonun şiddetinin en yüksek olduğu bölge olan ileumda, deskuame olan enterosit ve villus epitellerinde ortadan şiddetliye değişen derecede anti-osteopontin immunreaktiviteleri gözlendi. Liberkühn kript epitelleri ve lümene dökülmüş mukusla karışık hücresel debrislerde hafif-orta derecede immunpozitifliklere rastlandı. Epitel katmanının altındaki lakteallere ait endotellerin sitoplazmalarıyla bazal

membranlarında, ayrıca lakteallerin lümeni ve çevresinde görülen mononükleer seri yangı hücrelerinin sitoplazmalarında immunopozitiflikler tespit edildi. Lamina propriadaki makrofaj, epiteloid histiyosit ve Langhans tipi dev hücrelerinde hafif-orta şiddette immunreaktivite gözlemlendi. Olgunun kronikleştiği ve fibröz doku komponentlerinin proliferasyonu olduğu bölgelerde şiddetli immunopozitifliklere rastlandı. İleumda Peyer plaklarındaki hiperplazinin şiddetine paralel olarak, Peyer plaklarındaki lenfositlerin sitoplazmalarında hafif derecede, histiyositlerin sitoplazmalarında ise orta şiddette immunreaksiyonlar görüldü. Parafoliküler bölgede görülen hücre infiltrasyonunu oluşturan makrofaj ve histiyosit sitoplazmalarında ise orta derecede immunopozitifliklere rastlandı. Serozadaki lenf damarlarındaki yangısal reaksiyonun şiddetine göre görülen immunreaksiyonların şiddeti de paralel olarak değişmekteydi. Subakut karakterde yangısal reaksiyon görülen serozadaki makrofajlar ve histiyositlerde hafiften orta dereceye değişen şiddette immunopozitiflikler görülürken, bölgede bulunan Langhans tipi dev hücreleri de ortadan şiddetliye değişen derecelerde immunopozitiflik göstermekteydi. Serozadaki lenf damarlarının endoteli, damar duvarı ve çevresinde orta şiddette immunreaktivite mevcuttu. Lenf damarlarının lümeninde ve çevresindeki histiyosit ve makrofajların sitoplazmalarında ortadan şiddetliye değişen immunopozitiflikler görüldü (Şekil 4.25.). Seroza altında bleb ya da cep şeklindeki alanlarda görülen kazeöz odakların çevresindeki epiteloid histiyosit, makrofaj, Langhans tipi dev hücrelerinin sitoplazmalarında ve bunları çevreleyen fibröz doku komponentlerinde ortadan şiddetliye değişen derecelerde immunopozitifliklere rastlandı. Bununla birlikte granülomun periferine doğru yangı hücrelerinin arasındaki bölgede serbest halde osteopontin salınımları da görüldü. Bu granümatöz odakların merkezlerindeki kazeifikasyon ve mineralizasyonun görüldüğü alanlarda immunreaksiyon ya hiç yoktu ya da çok hafif şiddetteydi.



Şekil 4.25. İleum, enterositlerde, lamina propria, Peyer plakları ve subserozal dokuda anti-OPN şiddetli immunopozitif alanlar, ABC-P, X40, 200µm Barr.

Kontrol grubunda uygulanan anti-osteopontin antikoruyla yapılan immunohistokimyasal işlemde; bağırsakların enterositlerinde genel olarak hafif şiddette bir immunopozitifliklerin olduğu tespit edildi. Bununla birlikte bağırsağın genelinde L. propria, seroza gibi bağ doku hücrelerinin yoğun olarak bulunduğu bölgelerde bu hücrelerde hafif derecede immunopozitiflikler saptandı. Makrofajlarda hafif derecede immunreaksiyonlar gözlemlendi (Şekil 4.26.). Bu şiddetteki immunopozitif alanlar, çalışma grubunda göz ardı edildi.

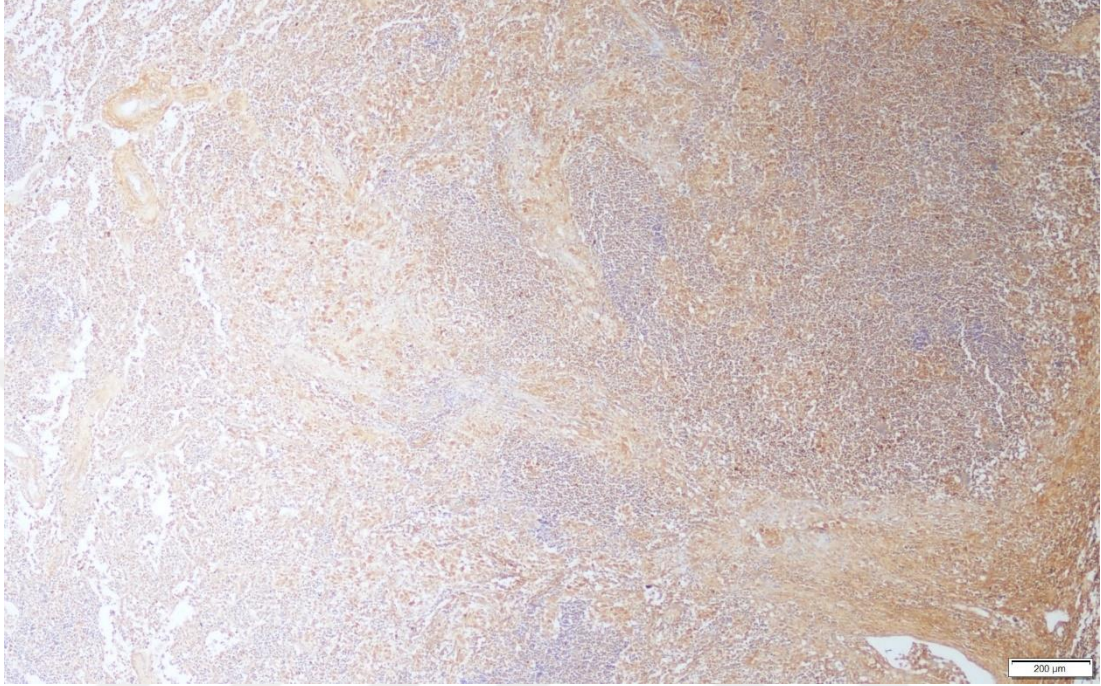


Şekil 4.26. Kontrol grubu, jejunumda anti-OPN hafif immunopozitif alanlar, ABC-P, X40, 200µm Barr.

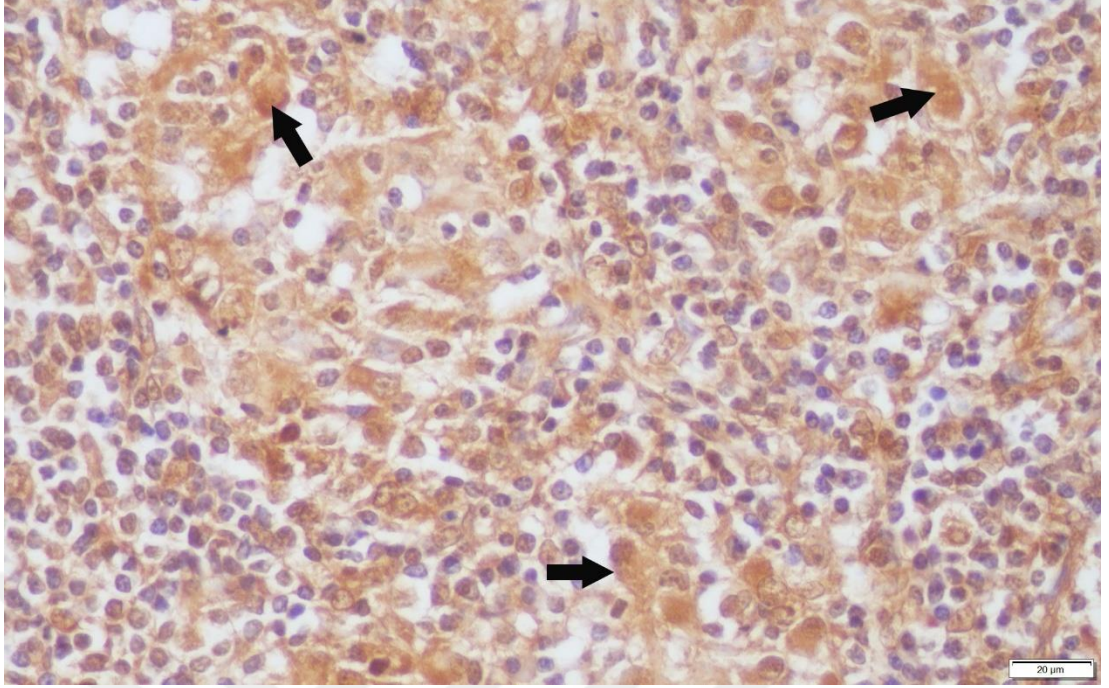
4.1.3.2.1. Mezenteriyel Lenf Düğümleri

Mezenteriyel lenf düğümlerinin anti-osteopontin immunreaksiyonları incelendiğinde histopatolojik olarak tespit edilen lezyonların bulunduğu yerlerde immunopozitiflikler tespit edildi (Şekil 4.27.). Kortikal sinuslar ve subkapsular alanlarda ödem ve yangısal hücre infiltrasyonu görülen şiddetli olgularda, yangısal infiltrasyondaki makrofaj, epiteloid histiyosit ve Langhans tipi dev hücrelerinde ortadan şiddetliye değişen derecelerde immunopozitiflikler görüldü. Lenf folikülleri ve parafoliküler bölgelerde görülen histiyosit, makrofaj ve Langhans tipi dev hücrelerinde hafif-orta derecede immunreaksiyonların varlığı dikkati çekti. Lenf düğümünün parankiminde histopatolojik olarak belirlenen, merkezleri kazeifiye olmamış mikrogranulomları oluşturan, başta epiteloid histiyosit olmak üzere makrofajların ve tek tük belirlenen Langhans tipi dev hücrelerinin sitoplazmalarında ortadan şiddetliye değişen derecelerde immunopozitiflikler görüldü. Merkezlerinde kazeifiye odak ve mineralizasyon görülen granulomların çevresindeki epiteloid histiyosit, makrofaj ve Langhans tipi dev hücrelerinde hafif-orta derecede, bunların çevresindeki fibroblast ve fibrositlerden oluşmuş bağ doku componentleri ve bu

komponentlerin arasındaki bölgede serbest halde şiddetli immunopozitiflikler gözlemlendi (Şekil 4.28.). Bu granülomların merkezindeki nekroze ve mineralize alanlarda immunreaksiyon ya hiç yoktu ya da çok hafifti.

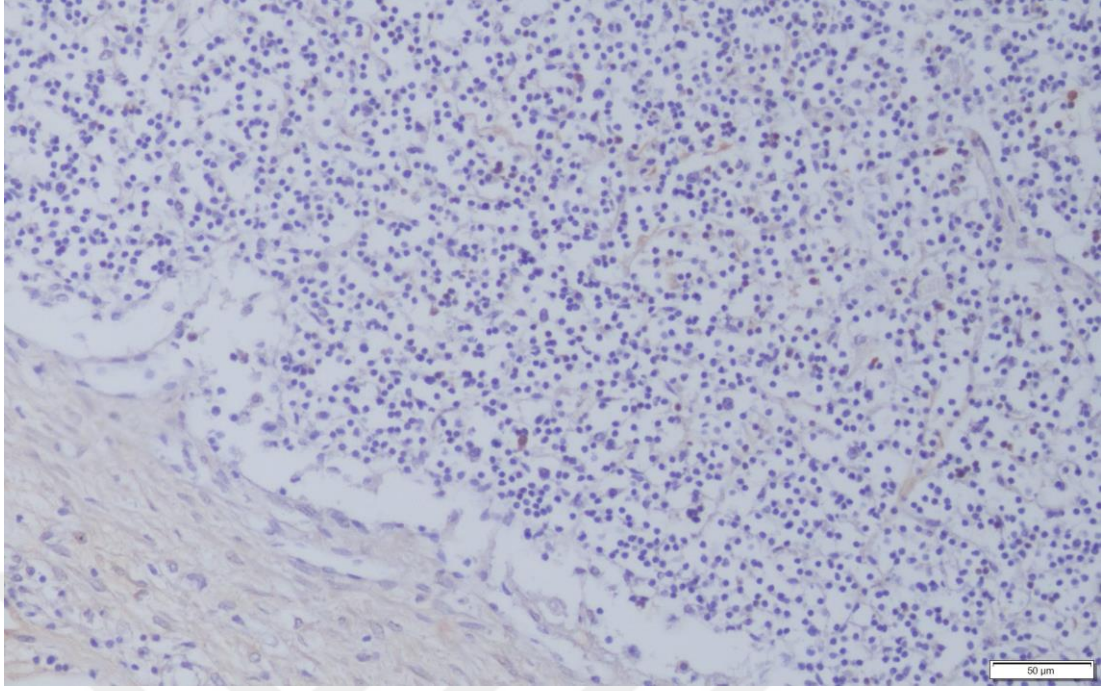


Şekil 4.27. Mezenteriyel lenf düğümü, anti-OPN şiddetli immunopozitif alanlar, ABC-P, X40, 200µm Barr.

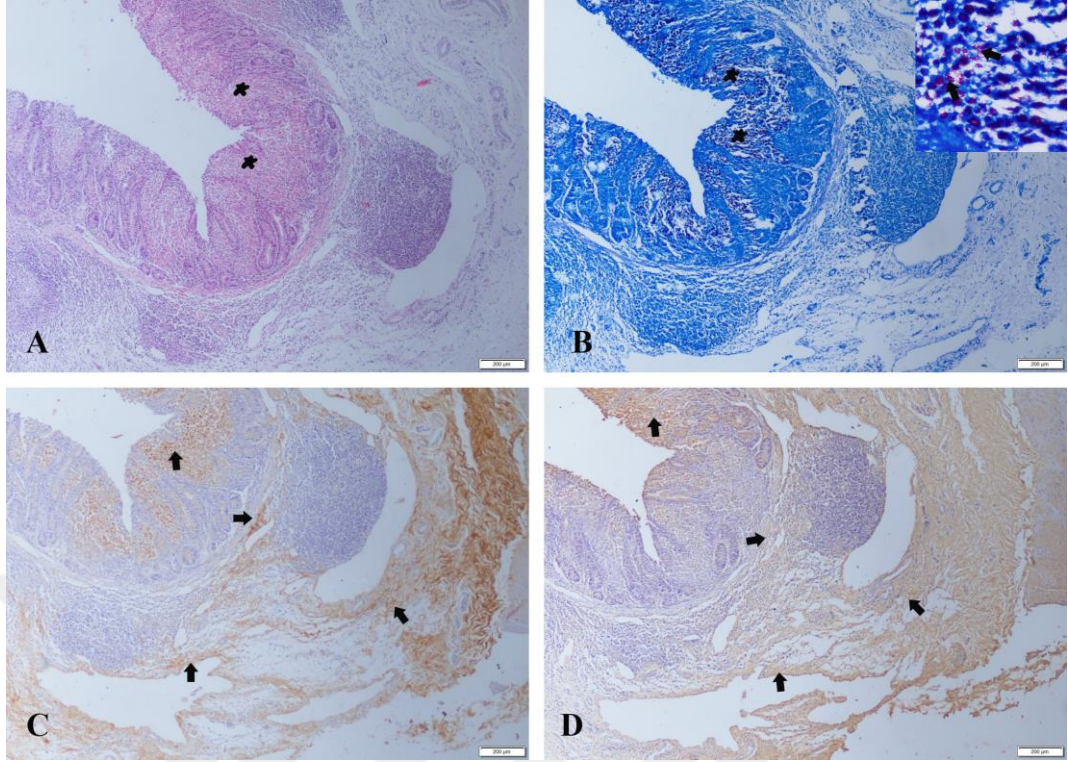


Şekil 4.28. Mezenteriyel lenf düğümü, mikrogranulomu oluşturan anti-OPN immunopozitif epiteloid histiyositler ve makrofajlar, ABC-P, X400, 20µm Barr

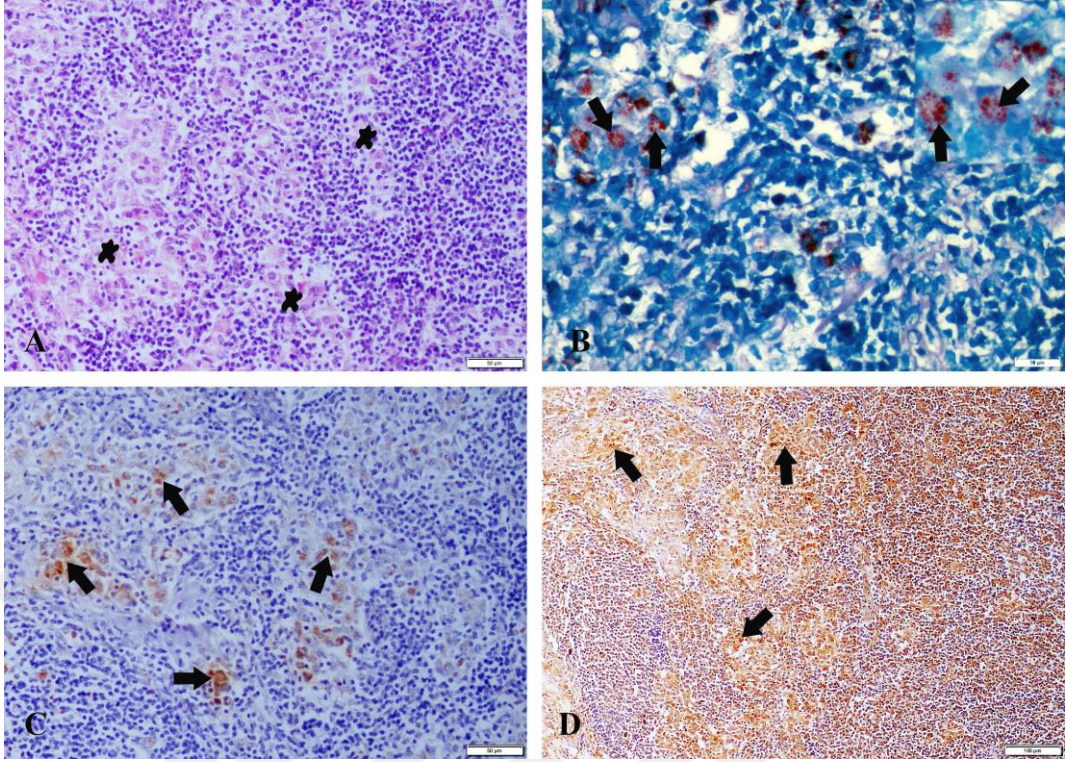
Kontrol grubuna ait mezenteriyel lenf düğümlerinde kapsula ve intrafoliküler trabeküllerdeki bağ dokuda hafif immunopozitiflikler gözlemlendi. Folikül çatısını oluşturan ve folikülün aralarında görülen bağ doku elemanlarında hafif immunopozitiflikler bulunmaktaydı. Lenf düğümünün parankimatöz bölgelerinde herhangi bir immunreaksiyon görülmedi (Şekil 4.29.).



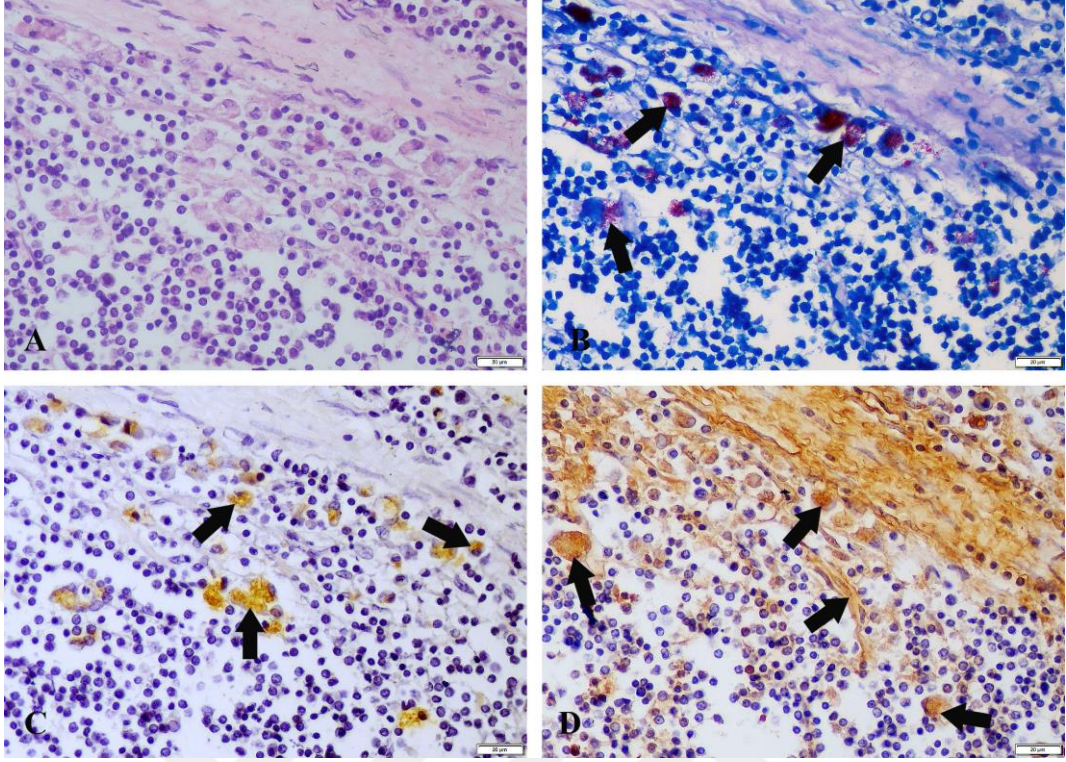
Şekil 4.29. Kontrol grubu, mezenteriyel lenf düğümü anti-OPN negatif immunreaksiyonları, ABC-P, X200, 50µm Barr.



Şekil 4.30. Çalışma grubu, ileum, multibasiller form. A:Lamina propriada yangısal hücre infiltrasyonu (yıldızlar) H&E, X40, 200µm Barr. B: Lamina propriada asit fast reaksiyon pozitif alanlar (yıldızlar), Küçük resim: Asit fast reaksiyonu yakınlaştırılmış görünüm, Ziehl-Neelsen, X40, 200µm Barr. C: Lamina propriada ve submukozada anti-MBL immunreaksiyonları (oklar) ABC-P, X40, 200µm Barr. D: Lamina propriada ve submukozada anti-OPN immunreaksiyonları (oklar). ABC-P, X40, 200µm Barr.



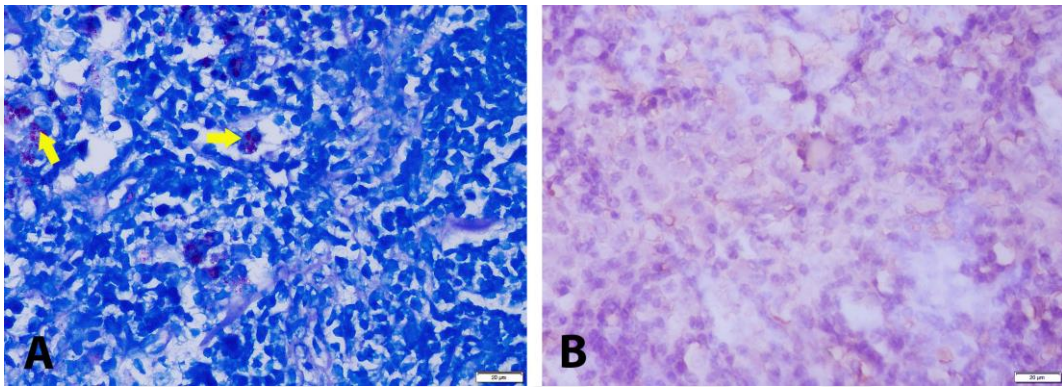
Şekil 4.31. Çalışma grubu, mezenteriyel lenf düğümü, mikrogranulom. A: Epiteloid histiyosit ve yangısal hücre infiltrasyonu (yıldızlar), H&E, X200, 50µm Barr. B: Epiteloid histiyositlerde asit fast reaksiyon pozitif (oklar), Ziehl-Neelsen, X400, 20µm Barr. Küçük resim: Etkenlerin yakınlştırılmış görünümü (oklar), Ziehl-Neelsen, X1000, 10µm Barr. C: Epiteloid histiyositleride anti-MBL immunreaksiyonları (oklar) ABC-P, X200, 50µm Barr. D: Epiteloid histiyositleride anti-OPN immunreaksiyonları (oklar). ABC-P, X100, 100µm Barr.



Şekil 4.32. Çalışma grubu, mezenteriyel lenf düğümü, trabekül periferinde makrofaj ve epiteloid histiyositler. A: H&E, X400, 20µm Barr. B: Asit fast reaksiyon pozitif alanlar (oklar), Ziehl-Neelsen, X400, 20µm Barr. C: anti-MBL immunopozitif reaksiyonlar (oklar). ABC-P, X400, 20µm Barr. D: anti-OPN immunopozitif reaksiyonlar (oklar). ABC-P, X400, 20µm

4.1.3.3. Anti-*Mycobacterium tuberculosis* Ag85B İmmunohistokimyasal Bulguları

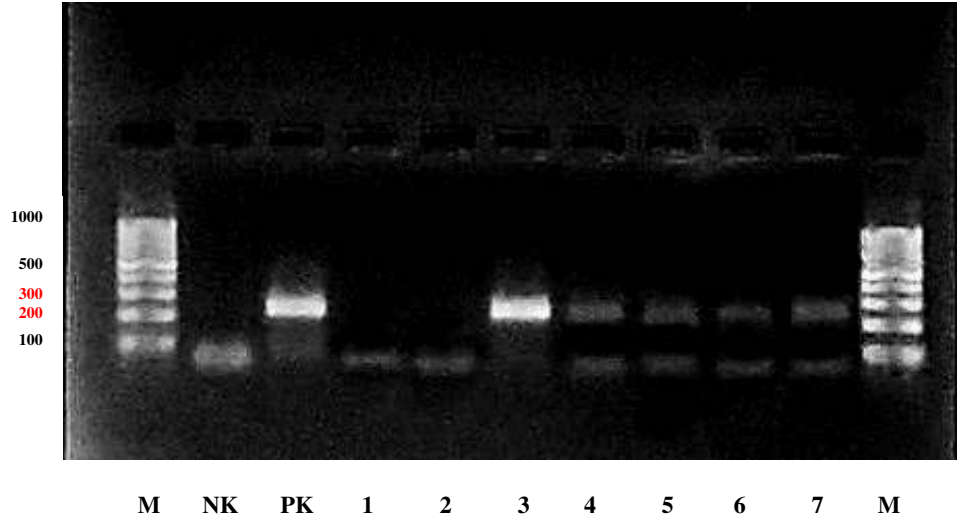
Ziehl-Neelsen boyamada asit fast reaksiyonu pozitif olan çalışma gruplarındaki etkenin *Mycobacterium tuberculosis* olmadığına gösterilmesi amacıyla Anti-*Mycobacterium tuberculosis* Ag85B antikoru kullanılarak immunohistokimyasal yöntem uygulandı. Çalışma gruplarının kesitleri incelendiğinde dokularda herhangi bir immunreaksiyon görülmedi (Şekil 4.33.).



Şekil 4.33. Çalışma grubu, mezenteriyel lenf düğümü. A: Asit fast reaksiyon pozitif alanlar (sarı oklar), Ziehl-Neelsen X400, 20µm Barr, B: Aynı bölgede anti-TB negatif immunreaksiyon, ABC-P, X400, 20µm Barr.

4.2. Moleküler Yöntem Bulguları

Çalışmada kullanılan dokulara PZR testi IS900 gen bölgesine yönelik 150C/921 primer çifti kullanılarak uygulandı. Paratüberkülozis şüpheli dokulardan izole edilen DNA örneklerinde 229bp’de pozitif bantlar saptandı ve 23 örnekten 21 tanesinin MAP pozitif olduğu doğrulandı. DNA örneklerinden 2 tanesinde (olgu no X, olgu no X), DNA içermeyen PZR karışımında, sağlıklı keçiye ait DNA örneğinde ve Tüberkülozis pozitif akciğer dokusundan izole edilen DNA örneğinde PZRda pozitif bant görülmedi (Şekil 4.34.).



Şekil 4.34. 150C/921 primerleri ile yapılan PZR testi sonrası IS900 genine ait jel görüntüsü. M: marker, NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol (MAP 316F suşu), 1: sağlıklı bağırsak dokusu, 2: Tüberkülozis pozitif akciğer dokusu, 3-7: MAP pozitif örnekler (Olgu No 19-23)

PZR sonucunda; Paratüberkülozis şüpheli parafine gömülü bağırsak dokularından izole edilen DNA örneklerinde 229 bp’de pozitif bantlar saptandı ve örneklerin MAP olduğu doğrulandı. DNA içermeyen PZR karışımında, sağlıklı bir koyuna ait bağırsak dokusundan ve Tüberkülozis pozitif akciğer dokusundan izole edilen DNA örneklerinde ise pozitif DNA bandı gözlenmedi (Şekil 4.34.).

5. TARTIŞMA

Paratüberkülozisin sığırlarda makroskopik, mikroskopik ve immunohistokimyasal yöntemlerle incelenmiş olduğu çok detaylı çalışmalar mevcuttur (Chiodini ve ark., 1984; Clarke, 1997; Collins ve Manning, 2020; Englund ve ark., 2002). Keçilerde görülen lezyonlar bazı farklılıklar dışında detaylı olarak araştırılmamıştır (Alibaşoğlu ve ark., 1973; Kumar ve ark., 2010; Sigurdardottir ve ark., 1999). Bu çalışmada keçilerde MAP'ın histopatolojik bulguları ve lezyonların ortaya çıkmasındaki patogenetik mekanizmaların bazıları detaylı olarak incelenmiştir.

Paratüberkülozis'in keçilerdeki ırk predispozisyonuyla ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır (Gelberg, 2017; Kumar ve ark., 2010; Windsor, 2015). Bu çalışmada, Saanen ve Kıl keçilerinde Halep keçilerine göre hastalığın daha sık görüldüğü tespit edildi. Ancak çalışmada incelenen bu ırkların gerek Akdeniz ve Ege bölgelerindeki gerekse Burdur ili ve çevresinde yetiştirilen hayvan ırklarından olması, ırk predispozisyonu belirleme açısından bir genelleme yapılmasını mümkün kılmamaktadır. Ayrıca çalışmada kullanılan materyalin sayısı da yeterli değildir. Bu nedenle keçilerdeki ırk predispozisyonunun belirlenmesi amacıyla ileri düzeyde survey ve genetik araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Küçük ruminantlarda etkene maruz kalma ve hastalığın klinik semptomları ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmış olup erken yaşlarda enfeksiyona maruz kalma ve klinik bulguların gözlenmesiyle ilgili farklı yorumlar yapılmış, erken enfeksiyonun postnatal dönemde görülebileceğine dair raporlar bildirilmiştir (Begara-McGorum ve ark., 1998; Clarke, 1997; Sweeney, 2011; Windsor, 2015). Sunulan olguda materyal metot kısmında belirtilen bilgiler özetlendiğinde, çalışmada kullanılan hastalıklı hayvanların %92'sinin 2 yaş ve üstünde olması, literatür bilgileriyle uyumluluk göstermektedir (Chiodini ve ark., 1984; Gelberg, 2017; Hazıroğlu ve Milli, 2001). Ancak çalışmadaki hayvanların %8'inde, 2 yaşın altındaki hayvanlarda da görülebildiği bu çalışmada gösterilmiştir.

MAP'ın patogenezisinde etkenin giriş yerinin ileum mukozası olduğu, etkenin "M" hücreleri tarafından içeri alındığı ve *L. propriada* yangıya sebep olduğu, zamanla

lezyon şiddetlendikçe ince bağırsakların proksimali ve distaline doğru ilerleyebileceğine dair raporlar mevcuttur (Clarke, 1997; Manning ve Collins, 2001; Sweeney, 2011) Bu çalışmada villus epiteli nekrozları ve villöz atrofinin en şiddetli olarak sırasıyla ileum, jejunum ve duodenumda görülmesi, duodenumda L. propriada yangısal hücre infiltrasyonu bulunmasına karşın villus morfolojisinin çok etkilenmemesi ve epitellerin sağlam olması; bunun yanında yapılan semikantitatif analiz bulgularında da görüldüğü üzere hastalığın bulgularının en şiddetli olduğu yerin ileum olduğu ve bu değerlerin istatistiksel analizinin anlamlı çıkması ($p<0,005$) literatür bulgularını doğrular nitelikteydi.

Bilindiği gibi bağırsak içeriğindeki suyun en fazla emildiği bölge duodenum mukozasıdır (Noyan, 2008). Bununla birlikte enfeksiyonun tanıtıcı klinik bulgularından olan kronik ishale rağmen şiddetli bir dehidrasyon görülmemesi duodenum mukoza epitelinin çoğunlukla sağlam olması ile alakalı olabileceğini akla getirmektedir.

MAP'ın en önemli klinik bulgularından birisi bağırsak serozası ve mezenteriyumdaki ödem ile karın boşluğundaki ascitistir. Klasik kitaplarda bunun hipoproteinemiyeye bağlı kanın hipoozmolaritesi nedeniyle şekillendiği belirtilmektedir (Brown ve ark., 2006; Gelberg, 2017; Hazıroğlu ve Milli, 2001). Sunulan bu çalışmada submukozal ve mezenteriyel lenf düğümlerindeki lenf damarlarında görülen mikrogranulom kaynaklı trombozların lenfatik drenajı bozduğundan şekillenen ödemin şiddetini artırdığı düşünülmektedir.

Paratüberküloziste hücre aracılı immun yanıtı göre hastalığın mikroskobik görünümü değişmektedir. Hücre aracılı immun yanıt güçlüyse paucibasiller, zayıfsa multibasiller form oluşmaktadır. Ayrıca bu formlar hastalığın klinik görünümüleriyle de ilişkilendirilmiştir (Clarke, 1997; Sweeney, 2011). Bu çalışmada Paratüberkülozis teşhisi konulan keçilerden sadece bir tanesinin paucibasiller ve diğer olguların multibasiller formunda olduğu gözlenmiştir. Semikantitatif skorlamalarda soldan sağa bireysel skor toplamına bakıldığında hastalığın ince bağırsaklardaki bulgulara göre 17 olguda “şiddetli”, 6 olguda ise “orta şiddetli” olduğu; mezenteriyel lenf düğümlerinde ise 14 olguda “şiddetli”, 9 olguda “orta şiddetli” olduğu tespit edilmiştir. Bununla

birlikte istatistiksel analiz bulgularında; ileumdaki lezyonların şiddeti multibasiller form görünümünü destekler nitelikte anlamlı ($p<0,05$), ileum ve mezenteriyel lenf düğümü bulguları karşılaştırıldığında lezyonların birbiriyle olan ilişkisi anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Bu durum klinik bulguların çoğunlukla ve belirgin olarak multibasiller formda ortaya çıkması ve hayvan sahibinin ancak hastalığın ileri evrelerinde teşhis için başvurması ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca keçi sürülerinde klinik bulgular ortaya çıktıkça hekime ya da patoloji laboratuvarına başvurulmasının, hastalığın yayılması ve tekrarlanan enfeksiyonların şekillenmesine neden olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle hastalığın paucibasiller formunda kontrol altına alınması ve sürüden elimine edilmesi için tüm sürüye dışkı ve antikor testleri ve şüphelenilen olgularda nekropsi yapılmasının koruyucu hekimlikte önemli olduğu gündeme gelmektedir.

MBL'nin opsonin olarak görev yaptığı ve akut faz reaksiyonunun başlamasında rol oynadığı bilinmektedir (Erken, 2013; Güneşçar ve ark., 2011). Birçok enfeksiyonda başta akciğer olmak üzere dokulardaki salınımı ve etkileri incelenmiş olmasına rağmen keçilerde gözlenen Paratüberkülozis olgularındaki salınımı ve etkileri histopatolojik düzeyde incelenmemiştir (Jack ve ark., 2001; Özyıldız ve ark., 2019; Van Kooyk, 2008). Sunulan çalışmada MAP lezyonlarındaki MBL salınımları, lezyonlara göre dağılımı, şiddeti ve etkinliği detaylı olarak araştırılmıştır.

MBL'nin etkenin opsonizasyonu ve fagositte edilmesinde önemli bir rolü olduğu ancak etkenin makrofajlar içerisinde elimine edilemediğinden makrofajlar içerisinde korunduğu ve enfeksiyonun ilerlemesine neden olduğu literatür bilgilerinde mevcuttur (Güneşçar ve ark., 2011). Bu çalışmada özellikle multibasiller formda *L. propria*, Peyer plakları, lenf damarları ve mezenteriyel lenf düğümlerinde Ziehl-Neelsen pozitif alanlarda MBL'nin de immun pozitif reaksiyon vermesi literatür bilgileri ile uyumluydu. Bunula birlikte lezyonların kazeifiye olduğu ileri safha enfeksiyonlarda ise nekrotik alanlarda etkene rastlanmaması etkenin lenfatik sisteme dahil olduktan sonra vücut direncine göre elimine edebileceğini ancak tekrarlayan reenfeksiyon ya da süperenfeksiyon gibi durumlar nedeniyle akut yangısal yanıtın lamina propriada yeniden başlayabileceğini göstermektedir. Bu da geçici iyileşmelerin

ve klinik bulguların zaman zaman iyileşip zaman zaman kötüleşmesinin nedenini açıklamaktadır. Ayrıca sadece keçilerde görülen kazeifikasyon ve mineralizasyonun keçilerin immün sisteminin farklı biçimde çalışmasını sağlayan özelleşmiş bir sistemin bulunabileceğini düşündürmektedir.

MBL'nin etkenin tanınabilirliğini ve fagositozunu sağlama ve serin proteazları aktive ederek etkenin makrofajlar içinde elimine edilmesine yardımcı olma şeklinde bilinen iki önemli özelliği vardır. (Erken, 2013; Güneşçar ve ark., 2011; Yuan ve ark., 2015). Sunulan çalışmadaki L. propriada bulunan makrofajlar, epitelooid histiyositler ve Langhans tipi dev hücrelerde anti-MBL pozitif boyanmalar ve villus epitelleri ile kript epitellerindeki negatif boyanmalar etkenin Peyer plaklarının hemen üzerindeki epitel dokuda bulunan "M" hücreleri yardımıyla içeri alındığı ve makrofajlar tarafından saklandığı (Clarke, 1997; Gelberg, 2017; Sweeney, 2011) konusundaki görüşleri doğrulamaktadır. Bununla birlikte kazeöz odakların merkezleri ve çevresinde anti-MBL negatif bölgelerin olması, MBL'nin fagositozda oldukça önemli bir görev üstlendiği ancak MAP enfeksiyonunda enfeksiyonun sınırlandırılması ve yok edilmesi durumunda herhangi bir etkinliğinin bulunmadığını belgelemektedir.

OPN hücre yenilenmesi ve epitelyal bariyerin korunmasında önemli görevleri olan bir proteindir (Giachelli ve ark., 1995; Young ve ark., 1990). Bu çalışmada villus epitelleri, kript epitelleri ve Liberkühn bezlerindeki anti-OPN pozitif boyanmalar, propriya mukozadaki yangısal olaylar devam etmekteyken vücudun epitelyal bariyeri koruma ve yenileme çabasında OPN'nin etkin bir görev aldığını göstermektedir.

OPN kronik ve granümatöz enfeksiyonlardaki etkinliği konusunda çalışmalar yapılmış olup halen birçok hastalığın patogenezisindeki rolü ve önemi araştırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda OPN plazma seviyelerinin Paratüberkülozise çok benzeyen ve ilişkisi olduğu düşünülen Crohn hastalığı, çeşitli kanser türleri, otoimmün hastalıklar ile birlikte kronik yangıyla karakterize birçok hastalıkta yükseldiği belirtilmiştir (Senger ve ark, 1989a; Singhal ve ark., 1997). Bununla birlikte Sevtekin ve Özmen (2018), sığır tüberkülozu ile ilgili yaptıkları çalışmada dokulardaki osteopontin seviyelerini incelemiş ve tüberküloz lezyonlarında önemli rolleri

olduğunu belirtmiştir (Sevtekin ve Özmen, 2018). Bu çalışmada lezyon olarak Tüberkülozis ve Crohn hastalığına benzeyen MAP enfeksiyonlarında OPN'nin etkinliği ve rolü detaylı olarak incelenmiş, OPN'nin MAP'ta MBL ile birlikte fagositozu kolaylaştırıcı, villus epitellerini koruyucu ve yangıyı sınırlandırarak mineralizasyonu teşvik edici özelliklerinin olduğu tespit edilmiştir.

OPN'nin kronik granümatöz yangılarda çoğunlukla makrofajlardan salındığı ve yangısal hücreleri bölgeye çekmede kemotaktik etkisinin olduğu bilinmektedir (O'Regan ve Berman, 2000; Scatena ve ark., 2007). Sunulan bu çalışmada enfeksiyonun hafif şiddette olduğu ve mononükleer hücre infiltrasyonlarının görüldüğü paucibasiller formda makrofajların sitoplazmasında kuvvetli pozitif anti-OPN boyanmaları literatür bulgularıyla uyumluydu. Bununla birlikte yangı bölgesindeki lenfosit ve plazma hücrelerinde de hafif immunopozitif alanlar gözlemlendi. Bu durum OPN'nin sadece makrofajlar değil aynı zamanda lenfosit ve plazma hücreleri tarafından salınarak antikor aracılı immun yanıtı başlattıkları ve sonrasında oluşacak olan gecikmiş tip aşırı duyarlılık tepkisini oluşturan granümatöz yangıyı tetiklediğini göstermektedir.

Diğer bir bulgu ise hem lenf düğümleri hem de lenf damarları çevresindeki granümatöz odaklar ve bunların çevresindeki alanlarda OPN'nin kuvvetli boyanmasıydı (Senger ve ark., 1989a). Aynı şekilde nekrotik alanların içerisinde de OPN pozitifliklerin görülmesi granümatöz kitlenin eritilmesi ve serin proteazların ve diğer litik enzimlerin salınmasında önemli görevlerinin olduğunu düşündürmektedir. Ancak bu konunun netleşmesi için nekrotik bölgeler ve granümatöz alanların bulunduğu bölgelerde serin proteazların aktivasyonu ve diğer litik enzimlerin aktivasyonları ile ilgili ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

OPN'nin embriyonel dönemde ya da postnatal kemik oluşumunda kalsiyumun çökmesine aracılık ettiği bilinmektedir (Sodek ve ark., 1995; Sodek ve ark., 2000). Bu çalışmada incelenen kesitlerde bazı olgularda seroza altındaki lenf damarları ile lenf düğümlerindeki kazeöz lezyonların periferine yakın kısımları ve çevresinde ortadan şiddetliye değişen şiddette OPN immunopozitif alanların görülmesi, kalsifiye alanlarda negatif olması, nekrotik bölgedeki distrofik kireçlenmeye yardımcı olduğunu

düşündürmektedir. Böylece OPN'nin sadece organogenezis ve hücre yenilenmesi değil aynı zamanda nekrotik dokuların ortadan kaldırılamama durumlarında mineral birikimlerini tetikleyerek etkeni sabitleştirmede önemli bir görevi olduğu görülmektedir.

OPN'nin embriyonal dönemde kemik oluşumunda, mineralizasyonda rolü olduğu ve kronik yangılarda gözleendiği daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Giachelli ve ark., 1995). Ancak patolojik olarak distrofik mineralizasyondaki etkisi ve rolüne dair herhangi bir bilgiye ulaşılammıştır (Dodds ve ark., 1995; McKee ve Nanci, 1995; Zohar ve ark.,1997). Bu çalışmada dikkati çeken diğer bir bulgu da multibasiller formda subserozal lenf damarları hem de lenf düğümlerindeki kazeifikasyon ve mineralizasyon bölgelerinin çevresindeki fibröz dokuda kuvvetli anti-OPN immunopozitif boyanmalar gözlenmesiydi. Bu durum OPN'nin distrofik mineralizasyonda da önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. İleum L. propriyasında epitelooid histiyositlerin arasındaki fibröz hücreler ile kazeöz veya nonkazeöz mikrogranulomların çevresindeki fibroblastik dokuda OPN'nin şiddetli immunopozitiflik göstermesi, OPN'nin yangıyı sınırlandırıcı bir etkiye sahip olduğunu, kemotaktik etkisinin yanında immun sistemin güçlü olduğu durumlarda klinik bulguların hafiflemesinin OPN ile ilişkisi olabileceğini düşündürmektedir.

OPN ve MBL yangısal yanıtta önemli görevleri olan sinyal proteinleridir. Her ikisinin de ortak özelliği etkenin tanınması ve fagositozundaki kemotaktik etkisidir (Erken, 2013; Scatena ve ark., 2007; Sodek ve ark., 2000). MBL ve OPN'nin dokulardaki salınımları ve etkinlikleri daha önceden farklı çalışmalarda ayrı ayrı incelenmiş olup MBL ile OPN arasındaki ilişki ve bunun patogenezdaki önemi belirtilmemiştir. Sunulan çalışmada MBL ve OPN'nin ZN boyamalarla eş zamanlı olarak etkenin görüldüğü makrofajlar, epitelooid histiyositler ve Langhans tipi dev hücrelerinde görülmesi hem MBL'nin hem de OPN'nin etkenin opsonizasyonunda görev aldığını belgelemektedir. Yangının orta şiddette seyrettiği hatta şiddetlendiği bazı olgularda villus epitellerinin MBL immunonegatif, OPN kuvvetli immunopozitif reaksiyon vermesi OPN'nin MBL'den farklı olarak mukozal bariyeri korumada önemli bir görevi olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte kazeifiye alanlarda ve çevresindeki bağ dokuda etkenin görülmemesine karşın OPN'nin şiddetli pozitif

olması OPN'nin fagositoz dışında etkenin elimine edilmesi ve çevreden sınırlandırılmasında olumlu etkisinin olduğunu göstermektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak MAP enfeksiyonu ile ilgili tanı, tedavi, bulgular, korunma ve tedavi ile ilgili oldukça fazla çalışma yapılmış ancak patogenezi hakkında hala yeterli bilgi bulunmamaktadır. Sunulan bu çalışma ile keçilerde MAP enfeksiyonunun patolojik bulguları detaylıca incelenmekle beraber patogenezisinde önemli rolleri bulunan MBL ve OPN sinyal proteinlerinin fonksiyonları ayrı ayrı ve karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Elde edilen bulgular ışığında MBL'nin etkenin tanınması ve fagosite edilmesinde, OPN'nin ise etkenin fagosite edilmesi ile birlikte lezyonların sınırlanması, etkenin yok edilmesi ve mineralizasyonu ile sabitlenmesinde önemli görevleri olduğu ortaya çıkarılmıştır. MBL'nin paratüberkülozis enfeksiyonundaki etkisi daha önce sadece kan serum düzeylerine bakılarak yapılmıştır ancak lezyonlu dokulardaki salınımını belgeleyen histopatolojik bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışma ile ilk kez Paratüberkülozis enfeksiyonunda MBL'nin dokudaki salınımı detaylı olarak incelenmiştir. OPN ile ilgili tüberküloz ve çeşitli kronik granülomatoz enfeksiyonlardaki salınımları ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Ancak Paratüberkülozdaki salınımlarının diğerleri enfeksiyonlar ile benzerlik gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmada ayrıca MBL ve OPN sinyal proteinlerinin etkileri ve birbirleri ile ilişkileri ortaya çıkarılmıştır. Ancak yine de ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışma ile paratüberkülozis hakkında verilen bilgilerle bilime ışık tutulmuş, yapılacak çalışmalara öncülük edilmiştir.

KAYNAKLAR

Alibasoglu M, Dunne HW, Guss SB (1962). Naturally occurring arteriosclerosis in cattle with Johne's disease. *Am J Vet Res.*, **23**:49.

Alibasoglu M, Erturk E, Yucel N (1973). Türkiye’de rastlanan ilk keçi paratüberkülozis olayları üzerinde patolojik incelemeler. *J Fac Vet Med.*, 43-63.

Barclay R, Ewing DF, Ratledge C (1985). Isolation, identification, and structural analysis of the mycobactins of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Bacteriol.*, **164**:896-903.

Barclay R, Ratledge C (1983). Iron-binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, and mycobactin-dependent *M. paratuberculosis* and *M. avium*. *J Bacteriol.*, **153**:1138-1146.

Beard PM, Daniels MJ, Henderson D, Pirie A, Rudge K, Buxton D, Rhind S, Greig A, Hutchings MR, McKendrick I, Stevenson K, Sharp JM (2001). Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J Clin Microbiol.*, **39**, 1517–1521.

Begara-McGorum I, Wildblood LA, Clarke CJ, Connor KM, Stevenson K, McInnes CJ, Sharp JM, Jones DG (1998). Early immunopathological events in experimental ovine paratuberculosis. *Vet immunol immunopathol.*, **63(3)**, 265-287.

Begg D, Whittington R (2010). Paratuberculosis in Sheep. Paratuberculosis: organism, disease, control, 157.

Behr MA, Stevenson K, Kapur V (Eds.) (2020). *Paratuberculosis: organism, disease, control*. CABI.

Brennan PJ (1986). The carbohydrate-containing antigens of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev.*, **57**:39-51.

Brown CC, Baker DC, Barker IK (2006). *Paratuberculosis (Johne's Disease)*. In: *Jubb Kennedy Palmer's Pathology of Domestic Animals 5th Edition*. Ed: Maxie GM. Elsevier. 2: 222-5.

Buergelt CD, Hall C, McEntee K, Duncan JR (1978). Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet Pathol.*, **15**(2), 196-207.

Butler WT, Ridall AL, McKee MD (1996). *Osteopontin* in: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds) *Principles of bone biology*. p. 167-181.

Cancel AM, Chapman DA, Killian GJ (1999). Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. *Biol reproduc.*, **60**(2), 454-460.

Chaturvedi S, Singh SV, Srivastava AK, Gangwar NK, Kumar N, Rawat KD, Gupta S, Chaubey KK, Singh R, Sing R, Dhama K (2017). Comparative evaluation of FAT, IS900 PCR and microscopy vis a vis histo-pathology for the detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection in tissues of goats naturally died in herds endemic for Johne's disease. *Ind J Anim Sci.*, **87**, 685-693.

Chiodini RJ (1996). Immunology: resistance to paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, **12**, 313-343.

Chiodini RJ (2005). The history of paratuberculosis. *Acedido em.*, 29.

Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS (1984). Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *Cornell Vet.*, **74**(3), 218-262.

Clarke CJ (1997). The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J Comp Pathol.*, **116**(3), 217-261.

Clarke CJ, Little D (1996). The pathology of ovine paratuberculosis: Gross and histological changes in the intestine and other tissues. *J Comp Pathol.*, **114(4)**, 419–437.

Cocito C, Gilot P, Coene M, de Kesel MYRIAM, Poupart P, Vannuffel P (1994). Paratuberculosis. *Clin Microbiol rev.*, **7(3)**, 328-345.

Collins MT (1996). Diagnosis of paratuberculosis. *Vet Clin Food Anim Pract.*, **12(2)**, 357-371.

Collins MT (2011). Diagnosis of paratuberculosis. *Vet Clin Food Anim Pract.*, **27(3)**, 581-591.

Collins MT, Manning E (2020). Johne's Information Center. <https://johnes.org/> (Erişim Tarihi: 17.12.2020)

Corpa JM, Garrido J, Marin JG, Perez V (2000). Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J Comp Pathol.*, **122(4)**, 255-265.

Çolak D (2015). Doğal bağışıklık (Ders Notları). <https://docplayer.biz.tr/10097154-Dogal-bagisiklik-prof-dr-dilek-colak.html> (Erişim Tarihi: 20.11.2020)

Dagleish MP, Benavides J, Chianini F (2010). Immunohistochemical diagnosis of infectious diseases of sheep. *Small Rum Res.*, **92(1-3)**, 19-35.

Dambuza IM, Brown GD (2015). C-type lectins in immunity: recent developments. *Cur Op Immunol.*, **32**, 21-27.

Denhardt DT, Noda M (1998). Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem.*, **72(S30–31)**, 92-102.

Dennis MM, Reddacliff LA, Whittington RJ (2011). Longitudinal study of clinicopathological features of Johne's disease in sheep naturally exposed to *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. *Vet Pathol.*, **48(3)**, 565-575.

Dodds RA, Connor JR, James IE, Lee Rykaczewski E, Appelbaum E, Dul E, Gowen M (1995). Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. *J Bone Min Res.*, **10(11)**, 1666-1680.

Donaghy J, Keyser M, Johnston J, Cilliers FP, Gouws PA, Rowe MT (2009). Inactivation of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* in milk by UV treatment. *Let Appl Microbiol.*, **49(2)**, 217-221.

Englund S, Bölske G, Johansson KE (2002). An IS 900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Let.*, **209(2)**, 267-271.

Erken E (2013). Mannoz Bağlayıcı Lektin Eksikliği ve Klinik Bulgular. *Arch Med Rev J.*, **22(4)**, 565-574.

Fecteau ME, Whitlock RH (2011). Treatment and chemoprophylaxis for paratuberculosis. *Vet Clin Food Anim Pract.*, **27(3)**, 547-557.

Fedarko NS, Fohr B, Robey PG, Young MF, Fisher LW (2000). Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack. *J Biol Chem.*, **275(22)**, 16666-16672.

Fernández M, Fuertes M, Elguezabal N, Castano P, Royo M, Ferreras MC, Benavides J, Pérez V (2017). Immunohistochemical expression of interferon- γ in different types of granulomatous lesions associated with bovine paratuberculosis. *Comp Immunol Microbiol.*, **51**, 1-8.

Franzen A, Heinegård D (1985). Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J.*, **232(3)**, 715-24.

Gelberg HB (2017). *Paratuberculosis*. In: Zachary JF, editor. *Pathologic basis of veterinary disease, 6th edition, Vol 1*. St. Louis: Elsevier, Inc; . p. 398–9.

Giachelli CM, Liaw L, Murry CE, Schwartz SM, Almeida M (1995). Osteopontin expression in cardiovascular diseases. *Ann NY Acad Sci.*, **760**:109-126.

Gillan S, O'Brien R, Hughes AD, Frank TJ, Griffin JFT (2010). Identification of immune parameters to differentiate disease states among sheep infected with *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol.*, **17**, 108–117

Gilmour NJL, Nisbet DI, Brotherston JG (1965). Experimental oral infection of calves with *Mycobacterium johnei*. *J Comp Pathol.*, **75**:281.

Gonda MG, Chang YM, Shook GE, Collins MT, Kirkpatrick BW (2007). Effect of *Mycobacterium paratuberculosis* infection on production, reproduction, and health traits in US Holsteins. *Prevent Vet Med.*, **80(2-3)**, 103-119.

González J, Geijo MV, Garcia-Pariente C, Verna A, Corpa JM, Reyes LE, Ferreras MC, Juste RA, Garcia-Martin JF, Perez V (2005). Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *J Comp Pathol.*, **133(2-3)**, 184-196.

Guardia A, Lozano F (2003). Mannose-binding lectin deficiencies in infectious and inflammatory disorders. *Rev Med Microbiol.*, **14(2)**, 41-52.

Gupta K, Gupta RK, Hajela K (2008). Disease associations of mannose-binding lectin & potential of replacement therapy. *Indian J Med Res.*, **127(5)**, 431.

Güneşçar R, Taştan D, Yıldırım A, Eryılmaz N (2011). Mannoz bağlayıcı lektinin yapısı, fonksiyonu, moleküler genetiği, hastalık ilişkisi ve terapötik potansiyeli. *Turk J Med Sci.*, **31(5)**, 1250-1261.

Hazıroğlu R, Milli ÜH (2001). *Paratüberkülozis. Veteriner Patoloji Cilt I.* Medipres Matbaacılık-Yayınılık. p. 107-9.

Hostetter J, Steadham E, Haynes J, Bailey T, Cheville N (2003). Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells. *Comp Immunol Microbiol.*, **26(4)**, 269-83.

Hoyer JR, Otvos Jr L, Urge L (1995). Osteopontin in Urinary Stone Formation a. *Ann NY Acad Sci.*, **760(1)**, 257-265.

Jack DL, Klein NJ, Turner MW (2001). Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol Rev.*, **180(1)**, 86-99.

Johne HA, Frothingham L (1895). A peculiar case of tuberculosis in a cow. *Deutsche Zeitschrift fur Tiermedizin und Vergleichende Pathologie*, **21**, 438-455.

Kahles F, Findeisen HM, Bruemmer D (2014). Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. *Mol Metab.*, **3(4)**, 384-393.

Kumar S, Singh SV, Singh AV, Singh PK, Sohal JS, Maitra A (2010). Wildlife (*Boselaphus tragocamelus*) small ruminant (goat and sheep) interface in the transmission of 'Bison type' genotype of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in India. *Comp Immunol Microbiol.*, **33(2)**, 145-159.

Lambeth C, Reddacliff LA, Windsor PA, Abbott KA, McGregor H, Whittington RJ (2004). Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep. *Aust Vet J.*, **82**, 504–508.

Lovell R, Levi M, Francis J (1944). Studies on the survival of Johne's bacilli. *J Comp Pathol Therap.*, **54**, 120–129.

Lybeck KR, Tessema GT, Kampen AH, Djonne B, Agdestein A (2020). *Paratuberculosis in goats. Paratuberculosis: organism, disease, control.* In eds: Behr, Stevenson, Kapur. CABI. 174-87.

Manning, EJ, Collins MT (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev Sci Tech IOE.*, **20(1)**: 133.

Marquetoux N, Mitchell R, Ridler A, Heuer C, Wilson P (2018). A synthesis of the patho-physiology of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in sheep to inform mathematical modelling of ovine paratuberculosis. *Vet Res.*, **49(1)**, 27.

McKee MD, Nanci A (1996). Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microsc Res Techniq.*, **33(2)**, 141-164.

Merkal RS, Curran B (1974). Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Microbiol.*, **28**:276-279.

Mikkelsen H, Aagaard C, Nielsen SS, Jungersen G (2011). Review of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigen candidates with diagnostic potential. *Vet Microbiol.*, **152(1-2)**, 1-20.

Minnikin DE, Goodfellow M (1980). *Lipid composition in the classification of acid-fast bacteria*, In M. Goodfellow and R. G. Board (ed.), *Microbiological classification and identification*. Academic Press, London. p. 189-256.

Moloney BJ, Whittington RJ, (2008). Cross species transmission of ovine Johne's disease from sheep to cattle: an estimate of prevalence in exposed susceptible cattle. *Aust Vet J.*, **86**, 117–123.

Momotani E, Whipple DL, Thiermann AB, Cheville NF (1988). Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet pathol.*, **25(2)**, 131-7.

Murray JF (1989). The white plague: down and out, or up and coming?—J. Burns Amberson lecture. *Am Rev Resp Dis.*, **140(6)**, 1788-1795.

Murray JF (2004). *Mycobacterium tuberculosis* and the cause of consumption: from discovery to fact. *Am J Resp Crit Care*, **169(10)**, 1086-1088.

Nielsen SS, Krogh MA, Enevoldsen C (2009). Time to the occurrence of a decline in milk production in cows with various paratuberculosis antibody profiles. *J Dairy Sci.*, **92(1)**, 149-155.

Nielsen SS, Toft N (2006). Age-specific characteristics of ELISA and fecal culture for purpose-specific testing for paratuberculosis. *J Dairy Sci.*, **89(2)**, 569-579.

Noyan A (2008). *Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji*. 17. Baskı, Ankara: Meteksan, s: 894-5.

O'Regan AW, Chupp GL, Lowry JA, Goetschkes M, Mulligan N, Berman JS (1999). Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol.*, **162(2)**, 1024-31.

Oldberg A, Franzén A, Heinegård D (1986). Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *P Natl Acad Sci.*, **83(23)**, 8819-23.

O'Regan A, Berman JS (2000). Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol.*, **81(6)**, 373-90.

Ott, SL, Scott JW, Bruce AW (1999). Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prevent Vet Med.*, **40(3-4)**: 179-92.

Ozyildiz Z, Ozmen O, Serpin N, Dolu H, Kutlu T, Ozsoy S Y (2019). Investigation of mannose-binding lectin, surfactant protein B and heat shock protein expression in bovine respiratory syncytial virus infection. *Rev Med Vet-Toulouse*, **170(1-3)**, 2-8.

Patarca R, Freeman GJ, Singh RP, Wei FY, Durfee T, Blattner F, Regnier DC, Kozak CA, Mock BA, Morse H (1989). Structural and functional studies of the early

T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. *J Exp Med.*, **170(1)**, 145-161.

Payne JM, Rankin JD (1961). The pathogenesis of experimental Johne's disease in calves. *Res Vet Sci.*, **2**:167–74.

Perez V, Tellechea J, Corpa JM, Gutierrez M, Garcia-Martin JF(1999). Relation between pathologic findings and cellular immune responses in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am J Vet Res.*, **60(1)**, 123-127.

Presnell JK, Schreibman MP, Humason GL (1997). *Humason's animal tissue techniques*. Johns Hopkins University Press. p. 108-15, 305-6.

Rittling SR, Denhardt DT (1999). Osteopontin function in pathology: lessons from osteopontin-deficient mice. *Nephron Exp Nephrol.*, **7(2)**, 103-113.

Scatena M, Liaw L, Giachelli CM (2007). Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscl Throm Vas.*, **27(11)**, 2302-2309.

Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos A (1989a). Elevated expression of secreted phosphoprotein I (osteopontin, 2ar) as a consequence of neoplastic transformation. *Anticancer Res.*, **9(5)**, 1291-1299.

Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos A, Tenen DG (1989b). Purification of a human milk protein closely similar to tumor-secreted phosphoproteins and osteopontin. *BBA Protein Struct M.*, **996(1-2)**, 43-48.

Sevtekin M, Ozmen O (2018). Immunohistochemical examination of osteopontin and sirtuin-1 expression in cattle tuberculosis. *Biotech Histochem*, **93(6)**, 405-10.

Sigurdardottir OG, Press CM, Saxegaard F, Evensen Ø (1999). Bacterial isolation, immunological response, and histopathological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol.*, **36(6)**, 542-550.

Singhal H, Bautista DS, Tonkin KS, O'Malley FP, Tuck AB, Chambers AF, Harris JF (1997). Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival. *Clin Cancer Res.*, **3(4)**, 605-611.

Sodek J, Chen J, Nagata T, Kasugai S, Todescan Jr R, Li IW, Kim RH (1995). Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. *Ann NY Acad Sci.*, **760**, 223-241.

Sodek J, Ganss B, McKee MD (2000). Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol M.*, **11(3)**, 279-303.

St Jean G (1996). Treatment of clinical paratuberculosis in cattle. *Vet Clin Food Anim Pract.*, **12(2)**, 417-430.

Stabel JR (2000a). Cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res.*, **61(7)**, 754-60.

Stabel JR (2000b). Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol.*, **77**, 465–473.

Stehman SM (1996). Paratuberculosis in Small Ruminants, Deer, and South American Camelids. *Vet Clin N Am Food Anim Pract.*, **12(2)**, 441–455.

Streeter RN, Hoffsis GF, Bech-Nielsen S, Shulaw WP, Rings M (1995). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am J Vet Res.*, **56(10)**, 1322-4.

Sweeney RW (2011). Pathogenesis of paratuberculosis. *Vet Clin Food Anim Pract.*, **27(3)**: 537-546.

Sweeney RW, Collins MT, Koets AP, McGuirk SM, Roussel AJ (2012). Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species. *J Vet Int Med.*, **26(6)**, 1239-50.

Sweeney RW, Jones DE, Habecker P, Scott P (1998). Interferon-gamma and interleukin 4 gene expression in cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res.*, **59(7)**, 842-7.

Sweeney RW, Whitlock RH, McAdams S, Fyock T (2006). Longitudinal study of ELISA seroreactivity to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected cattle and culture-negative herd mates. *J Vet Diagn Invest.*, **18(1)**, 2-6.

Sweeney RW, Whitlock RH, Rosenberger AE (1992). *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *Am J Vet Res.*, **53(4)**, 477-480.

Şababoğlu E, Türütoğlu H (2017). Ruminantlarda *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Enfeksiyonunun İmmunolojik Özellikleri. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg.*, **28(2)**, 109-114.

Taylor AW (1953). The experimental infection of cattle with varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. *J Comp Pathol Therap.*, **63**, 368-373.

Thoen CO, Karlson AG, Ellefson RD (1971). Comparison by gas-liquid chromatography of the fatty acids of *Mycobacterium avium* and some other nonphotochromogenic mycobacteria. *Appl Microbiol.*, **22**:560-563.

Timms VJ, Gehringer MM, Mitchell HM, Daskalopoulos G, Neilan BA (2011). How accurately can we detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection?. *J Microbiol Met.*, **85(1)**, 1-8.

Turenne CY, Wallace Jr. R, Behr MA, 2007. *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. *Clin Microbiol Rev.*, **20**, 205–229.

Van Kooyk Y (2008). C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses. *Biochem Soc Tran.*, **36(6)**, 1478-1481.

Waters WR, Stabel JR, Sacco RE, Harp JA, Pesch BA, Wannemuehler MJ (1999). Antigen-specific B-cell unresponsiveness induced by chronic *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of cattle. *Infect Immun.*, **67(4)**, 1593-1598.

Weber GF, Cantor H (1996). The immunology of Eta-1/osteopontin. *Cytokine Growth F R.*, **7(3)**, 241-248.

Whitlock RH, Buergelt C (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet Clin N Am Food Anim Pract.*, **12(2)**, 345-356.

Whittington RJ, Reddacliff L, Marsh I, Saunders V (1999). Detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded intestinal tissue by IS900 polymerase chain reaction. *Aust Vet J.*, **77(6)**, 392-397.

Whittington RJ, Windsor PA (2009). In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *Vet J*, **179(1)**, 60-69.

Windsor PA (2013). Understanding the efficacy of vaccination in controlling ovine paratuberculosis. *Small Ruminant Res.*, **110(2-3)**, 161-164.

Windsor PA (2014). Managing control programs for ovine caseous lymphadenitis and paratuberculosis in Australia and the need for persistent vaccination. *Vet Med Res Rep.*, **5**, 11-21.

Windsor PA (2015). Paratuberculosis in sheep and goats. *Vet Microbiol.*, **181(1-2)**, 161-169.

Worthley DL, Bardy PG, Gordon DL, Mullighan CG (2006). Mannose-binding lectin and maladies of the bowel and liver. *World J Gastroentero.*, **12(40)**, 6420.

Young MF, Kerr JM, Termine JD, Wewer UM, Wang MG, McBride OW, Fisher LW (1990). cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics*, **7(4)**, 491-502.

Yuan B, Zhou S, Lu Y, Liu J, Jin X, Wan H, Wang F (2015). Changes in the expression and distribution of claudins, increased epithelial apoptosis, and a mannan-binding lectin-associated immune response lead to barrier dysfunction in dextran sodium sulfate-induced rat colitis. *Gut Liver*, **9(6)**, 734.

Zohar R, Lee W, Arora P, Cheifetz S, McCulloch C, Sodek J (1997). Single cell analysis of intracellular osteopontin in osteogenic cultures of fetal rat calvarial cells. *J Cell Physiol.*, **170(1)**, 88-100.

Zurbrick BG, Follett DM, Czuprynski CJ (1988). Cytokine regulation of the intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine monocytes. *Infect Immun.*, **56(7)**, 1692-7.