

## Sığırlarda *Mycobacterium bovis*'in moleküler ve sito-histopatolojik tanı yöntemleri ile gösterilmesi ve sonuçlarının karşılaştırılması\*

Ezgi AKDEŞİR, M. Özgür ÖZYİĞİT, M. Müfit KAHRAMAN

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye.

**Özet:** Bu çalışmada tüberkülin deri testi (PPD) pozitif 30 baş sığırdaki *Mycobacterium bovis*'in varlığının klasik ve moleküler teknikler ile ortaya konması ve sonuçların birbirleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Klasik yöntemler organların makroskopik muayenesi, örneklenen dokuların Hematoksilen-Eozin (HE), Ziehl Nilseen (ZN) ve immunohistokimya (İHK) ile mikroskopik, dokuda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR<sub>doku</sub>) ile moleküler; toplanan kan örneklerinin buffy coat'ta immunositokimya (İSK<sub>bc</sub>) ile mikroskopik, buffy coat'ta polimeraz zincir reaksiyonu (PCR<sub>bc</sub>) ile moleküler incelemelerinden oluşmuştur. Makroskopide 26 tipik tüberkülin gözlenirken, mikroskopide HE ile 27, ZN ile 20 doku tüberkülozla uyumlu bulunmuştur. Akciğer, mediastinal lenf düğümü ve karaciğerden yapılan İHK'da 26, PCR<sub>doku</sub>'da 18; İSK<sub>bc</sub>'de 3, PCR<sub>bc</sub>'de ise 14 pozitif sonuç elde edilmiştir. İHK pozitif boyanmış etkenlere, makrofaj, dev hücresi, lenfositler ve fibrositlerin sitoplazmalarında rastlanmıştır; İSK<sub>bc</sub> pozitif reaksiyon ise mononükleer lökositlerin sitoplazmalarında görülmüştür. ZN boyamanın her zaman etkeni göstermediği; İHK'ya kıyasla spesifik olmadığı ve doğrulamak için diğer yöntemlere ihtiyaç olduğu görülmüştür. *Mycobacterium bovis*'e ait moleküllerin varlığı dokuda (PCR<sub>doku</sub>) gösterilmiş ancak, bu molekülleri saptamaya yönelik yöntemlerin sığır tüberkülozunun tanısında kullanılma duyarlılığı, İHK yöntemine kıyasla, düşük bulunmuştur. Yöntemler arasında İHK'nın, PCR<sub>bc</sub>'ye ve İSK<sub>bc</sub>'ya kıyasla duyarlılığının (Mc Nemar; sırasıyla p<0.05 ve 0.01), HE ile ZN boyamada ise uyumluluğunun (Cohen kappa; sırasıyla p<0.001 ve 0.05) daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Sığır tüberküloz hastalığının kesin teşhisinde kullanılan tekniklerin birinin diğerine üstünlüğünden ziyade, birbirini tamamladığı ve bir arada kullanıldığı zaman teşhisin hem daha hızlı hem de daha güvenilir olduğu düşünülmüştür. Sonuç olarak yine, bu çalışma sonucunda moleküler (PCR<sub>doku/bc</sub>) tekniklerin diğer yöntemlere kıyasla rutin olarak ne derecede tercih edilebileceğinin tespiti için daha fazla çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Buffy coat, histopatoloji, *Mycobacterium bovis*, PCR, sığır.

### Demonstration of *Mycobacterium bovis* in cattle via molecular and cytohistopathological diagnostic techniques and comparison of the results

**Summary:** In this study the detection of *Mycobacterium bovis* with classical and molecular techniques and comparisons of the test results in the thirty slaughtered cattle positive to intradermal tuberculin test (PPD) was aimed. The classical methods include macroscopic examination of the organs, microscopic examination of tissues and blood samples that were stained by HE, ZN, immunohistochemistry and immunocytochemistry and PCR as molecular investigation. Characteristic tubercle development was observed in 26 animals' macroscopic examination yet 27 and 20 cases were found compatible with tuberculosis in HE and ZN respectively. Tuberculosis positive results were also obtained from lungs, mediastinal lymph nodes and liver via immunohistochemistry (IHC), PCR<sub>tissue</sub>, immunocytochemistry of the buffy coat (ICC<sub>bc</sub>) and PCR of the buffy coat (PCR<sub>bc</sub>) in 26, 18, 3 and 14 cows respectively. The agents were observed extracytoplasmically and intracytoplasmically in macrophages, giant cells, lymphocytes and fibrocytes in IHC. ICC<sub>bc</sub> positivity was observed within the cytoplasm of mononuclear leukocytes. Furthermore, the agent was not always detected via ZN staining, which verifies the necessity of ancillary tests. Among these methods IHC has revealed significant sensitivity compared to those of PCR<sub>bc</sub> and ICC<sub>bc</sub> (Mc nemar; p<0.05 ve 0.01 respectively), and exhibited compatibility with HE and ZN (Cohen kappa; p<0.001 and 0.05 respectively). These results confirm the fact that rather than one single golden technique, combination of various techniques is necessary for accurate and rapid diagnosis of bovine tuberculosis. It has also been concluded that further investigation is necessary to clarify the efficient routine usage of molecular techniques (PCR<sub>tissue/bc</sub>) in place of other diagnostic techniques.

Keywords: Buffy coat, cattle, histopathology, *Mycobacterium bovis*, PCR.

\* Çalışmanın sonuçları ESVP, ESTP ve ECVP'nin ikinci birleştirilmiş Avrupa kongresi, 27 - 30 Ağustos, 2014 Berlin, Almanya'da poster olarak sunulmuştur.

## Giriş

Sığır tüberkülozu, *Mycobacterium bovis* etkeni tarafından oluşturulan ve genellikle solunum sistemi problemlerine sebep olan kronik bir hastalıktır. Uzun süre ve maliyet gerektirdiği için hastalığın tedavisi yerine mücadele etkeni taşıyan hasta hayvanların tespit edilip elimine edilmesi şeklinde yapılmaktadır (5); bu da hastalığın klinik tanısını daha da önemli kılmaktadır. Hastalığın klinik tanısı intradermal tüberkülin testi (PPD), gamma interferon testi (IFN- $\gamma$ ) yanında solunum sekresyonları, süt, idrar, dışkı gibi numunelerden hazırlanan frotilerin Ziehl Neelsen (ZN) boyamasında asidorezistans basillerin görülmesi veya mikrobiyolojik kültür ile de mümkündür (11,24,27). Tüberküloz tanısında, PPD ve IFN- $\gamma$  testietkene karşı aktif bir bağışıklığın olması durumunda kullanılabilir (1,27). Ancak hastalığın erken dönemlerinde ya da bağışıklığı baskılanmış bireylerde yanlış negatif veya diğer adi bakterilere ve patojen olmayan mikobakterilere karşı reaksiyon nedeniyle de yanlış pozitif sonuç alınabilmekte ve tanı güvenilirliğini kaybetmektedir (35,41,45). İnsanlarda Edinsel İmmün Yetmezlik Sendromlu (AIDS) bireylerin tüberküloza yatkın olduğu ve klinik testlere sıklıkla yanlış negatif yanıt verdikleri bildirilmektedir (20,22,34). Bu nedenle de etkenin kanda ve/veya dokuda kendisinin ya da bir moleküler komponentinin doğrudan gösterimi tanıda önem kazanmaktadır.

Sunumu yapılan bu çalışma, farklı tanı yöntemlerinin [konvansiyonel metodlar, immunohistokimya, immunositokimya ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)] kıyaslanarak sığır tüberkülozu tanısında kullanılabilirliğini ve hayvanlarda hastalığın canlı tanısı için hastalık etkenine ait bileşenlerin kanda moleküler ve sitopatolojik yöntemler ile tespit edilebilirliğini ve dokudaki lezyonlar ile ilişkisini ortaya koymayı amaçlamaktadır.

## Materyal ve Metod

Bu çalışmanın etik açıdan uygunluğu Uludağ Üniversitesi Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından 27.03.2012 tarihi ve 2012-04/06 karar numarasıyla onaylanmıştır.

*Doku ve kan örneği kullanılan hayvanlar:* Çalışmada, farklı çiftliklerde tüberkülin deri testi uygulamasında müspet tespit edilerek kesime sevk edilmiş, 26 baş 2 yaş üzeri, 4 baş 2 yaş altı toplam 30 başsüt sığırını örneklenmiştir.

*Kan örnekleri:* Kesimi takiben boyundan akmakta olan kan, 10ml EDTA'lı kan tüplerine (Hematube®) alındı. Soğuk zincir altında laboratuvara getirilen kan örnekleri 5000 rpm'de 5dk.süreyle santrifüje edilerek lökositler ayrıştırıldı. Lökosit katmanı (buffy coat) aspire edildi. Aspiratın 0,5 $\mu$ l'si lizinli lamlara damlatılarak 3 adet frotiler hazırlandı, kalanı ise PCR için 1,5ml hacimli mikrotüplere aktarıldı. Lizinli lamlardaki frotiler +4°C'de mikrotüpler ise -20°C'de saklandı.

*Doku Örnekleri:* İç organların çıkarılmasından sonra gözle ve palpasyonla genel bir inceleme yapılarak, lezyonların görüldüğü retrofaringeal ve mediastinal lenf yumrusu ile akciğer ve karaciğer dokuları örnekledi. Organ örnekleri her hayvan için ayrı eldiven ve bistiiri kullanılarak kilitli poşetlere alındı ve soğuk zincir altında laboratuvara ulaştırıldı. Her bir hayvandan, sağlıklı ve lezyonlu kısımları içerecek şekilde örneklenen dokularının bir kısmı histopatolojik inceleme için %10'luk tamponlanmış formaldehit (Merck Millipore, Merck 103999, %37 pH: 6,9)çözeltilisine alındı. Diğer bir kısmı da PCR<sub>doku</sub> incelemelerinde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı. Formaldehit çözeltilisinde 48 saat bekletilip trimlenerek kasetlere alınan dokular, yıkama aşamasından sonra manuel doku takibinde alkol ve ksilol serisinden geçirilerek, parafin ile blokladı ve mikrotomda kesit alınana kadar +4°C'de saklandı. Parafin bloklardan hazırlanan kesitlere rutin ve histokimyasal boyalar uygulanarak ışık mikroskopunda (Olympus, CX41, U-D03, Japonya) incelendi ve resimlendi.

*Hematoksilen-Eozin ve Ziehl-Neelsen boyama:* Her iki boyama için de lamlar alkol ve ksilol serilerinden geçirildi. HE için rutin boyama prosedürü uygulandı. Mikroskopik incelemede, HE doku kesitlerinde yangı hücresi infiltrasyonu, dev hücresi, kazeifikasyon, kalsifikasyon varlığı ve bağ doku oluşumuna dikkat edildi; ZN boyamada ise mavi zemin üzerinde kırmızı-pembe renkli basil görülen, asidorezistans bakteri olup olmadığına dikkat edildi (23).

*İmmunohisto ve -sitokimyasal boyamalarda kullanılan tüberküloz pozitif örneklerin hazırlanması:* Makroskopik ve histopatolojik olarak tüberküloz tanısı konarak sığır dokusundan hazırlanmış olan dokuların tüberküloz bakımından pozitifliği Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Bu inceleme sonucunda dokularda BD MGIT TBc (Becton Dickinson, ABD) identifikasyon kiti kültür sonuçları ile *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*'yi içermektedir) varlığı tespit edilmiştir. Bu dokulardan elde edilen kesitler ve tuşeler İHK ve İSK boyama sırasında tüberküloz pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

*İmmunohistokimyasal boyama:* İmmunohistokimya boyama için rutin işlemleri takiben kesitler *Mycobacterium bovis*'e spesifik Anti-mycobacterium bovis poliklonal primer antikor (ORB100411, Biorbyte, İngiltere) ve sekonder antikor, kromojen uygulanması (DAB), zemin boyama (Harris Hematoksilin) ve takip eden rutin işlemlerden sonra (4) ışık mikroskopunda (Olympus, CX41, U-D03, Japonya) incelendi ve fotoğraflandı.

**İmmunositokimyasal boyama:** PPD müspet hasta hayvanların kanından elde edilen buffy coat yayılmış lamalar %10'luk tamponlu formaldehit içerisinde 20dk. tespit edildi. Rutin basamaklardan sonra, antijenlerin açığa çıkarılması amacıyla Tween 20 eklenmiş sitrat tampon çözeltisi (50 µl/100ml) (pH:6) kullanılarak mikrodalga fırında 360 Watt'da 5dk süreyle işleme tabi tutuldu. Takiben İHK için uygulanan işlemler sırası ile uygulandı.

**DNA ekstraksiyonu:** Kan ve dokulardan DNA çıkarılmasında 'spin-column' tabanlı çalışan ticari kit (QIAamp DNA Minikit, 250, Katalog no:51306,Qiagen) tarafından önerilen yöntem takip edildi.

Kandan DNA ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ürünün DNA konsantrasyonu 5µl örneklenerek spektrofotometrede (190-840nm, NanoDrop 2000, Thermo Scientific, ABD) ölçüldü. PCR<sub>bc</sub> analizi aşamasına kadar DNA örnekleri +4°C'de saklandı.

Çalışma kapsamında akciğer ve lenf yumrularından (retrofaringeal ve mediastinal) alınan toplam 25 mg doku mekanik olarak homojenize edildi; varsa lezyonlu karaciğer dokuları da dâhil edilerek rutin DNA ekstraksiyon işlemi uygulandı. PCR<sub>doku</sub> analizi aşamasına kadar DNA örnekleri +4°C'de saklandı.

**Buffy coat ve dokuda Gerçek Zamanlı (Real Time) PCR:** Gerçek zamanlı PCR analizleri için Taqman® prob tabanlı çalışan, IS6110 gen sekansını hedef alan ticari kit (TaqVet™ Mycobacterium tuberculosis Complex, Laboratoire Service International, Fransa) ve primer dizileri kullanıldı(42).Uygulama sırasında üretici firmanın önerisi doğrultusunda hedef ile aynı tabiatta olan eksternal pozitif kontrol (inaktive edilmiş bakteri veya virüs) kullanılmıştır. Bütün bu çalışmalar ticari kiti satan firmanın (Diagen) önerdiği Konya'daki özel bir laboratuvarın imkanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

**İstatistiksel Analiz:** Çalışmada kullanılan testler ile elde edilen oranların değişiminin önem kontrolü için İHK testi "altın standart" kabul edilmiş ve "Mc Nemar Test"i uygulanarak sensitivite, spesivite, pozitif ve negatif tahmini değer ile birlikte p değerlerine yer verilmiştir. Testler arasındaki uyum değerlendirmesi için de Cohen kappa katsayısı kullanılarak bu değerlere ait p değeri hesaplanmıştır. Analizler için SPSS 20 programı kullanılmıştır.

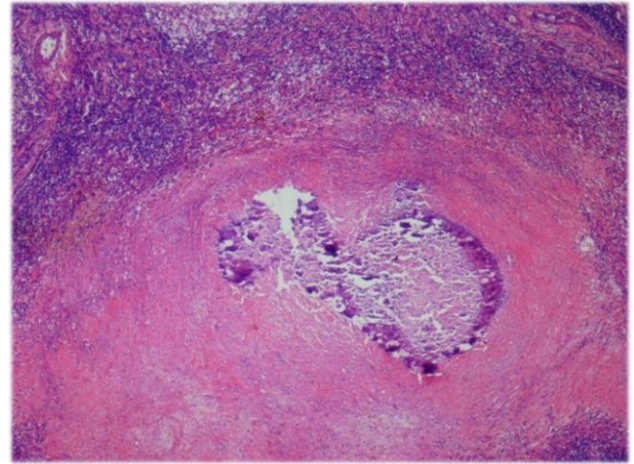
## Bulgular

PPD deri uygulaması müspet hayvanların makroskopik muayene, kan ve doku örneklerine ait histopatoloji ile İHK, İSK ve PCR sonuçları toplu olarak Tablo-1 de gösterilmiştir.

**Makroskopik Bulgular:** PPD müspet hayvanların (30 baş) 26'sının (%86) akciğer veya lenf yumrularında kazeifikasyon ve kalsifikasyon gösteren tüberkül yapısı gözlemlendi. PPD müspet iken tipik tüberkül yapısı gözlenmeyen 4 sığırdan (4, 11, 17 ve 22.olgular) ikisinde tipik

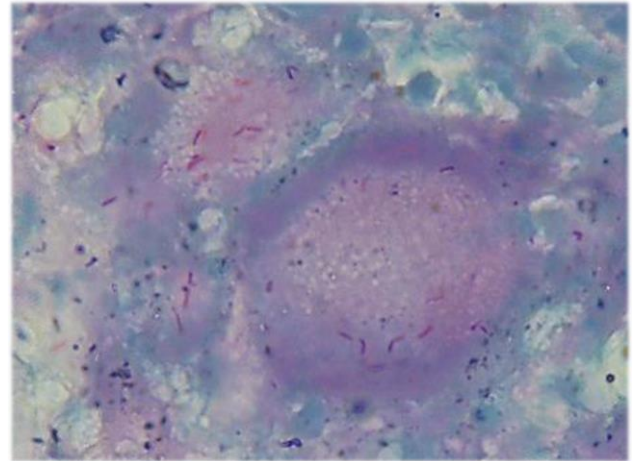
olmayan lenfadenopati (11 ve 17. olgular) ve diğer ikisinde (4 ve 22. olgular) ise hafif şiddette pulmoner hiperemi dışında makroskopik lezyon saptanamadı. Otuz olgudan 12'sinde (%40) akciğer ve mediastinal lenf yumrusu, 6'sında (%20) solunum sistemiyle beraber karaciğer, 3'ünde (%10) sadece akciğer, 4'ünde (%13) sadece lenf yumrusu tutulumu gözlemlendi.

**Hematoksilen-Eozin ve Ziehl-Neelsen:** Rutin HE boyamalarda, 27 olguda merkezindeki nekrotik alanı mononükleer yangı hücreleri, yer yer dev hücrelerinin çevrelediği ve bağ dokunun kuşattığı tipik granülom yapısı gözlemlendi (Şekil-1). ZN uygulanmış preparatların incelenmesi sonucunda, histopatolojik incelemede tüberkül yapısı gözlenen 27 olgunun 20'sinde (%74) asidorezistans bakteri gözlemlendi (Şekil2).



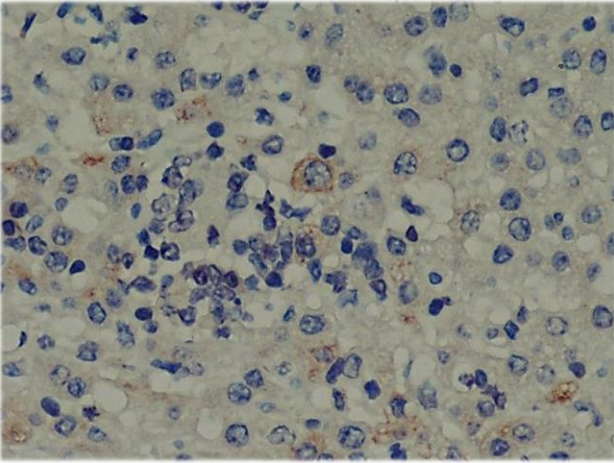
Şekil 1. Lenf yumrusu, mononükleer lökositler infiltrasyon ve bağ dokusu ile çevrili kalsifiye nekroz alanından oluşan granülom yapısı (HE x4, 16. olgu).

Figure 1. Lymph node, granuloma formation with mononuclear leukocyte infiltration, necrosis, calcification and surrounding connective tissue (HE x4, case 16).

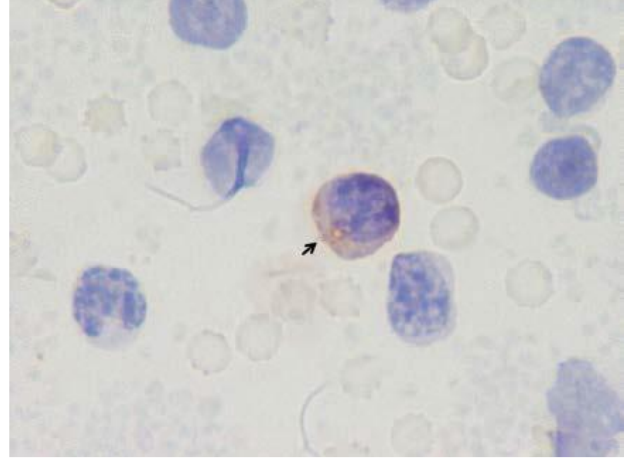


Şekil 2. Bir dev hücrenin sitoplazmasında asidorezistans bakteri ve komponentleri (ZN x100, 20. olgu).

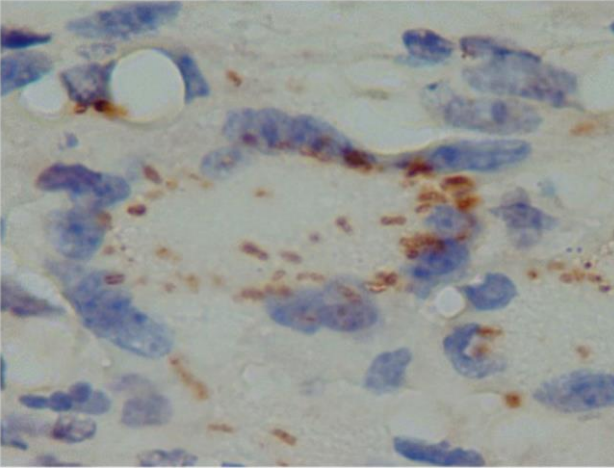
Figure 2. Acid-resistant microorganisms and their components in a giant cell cytoplasm (ZN x100, case 20).



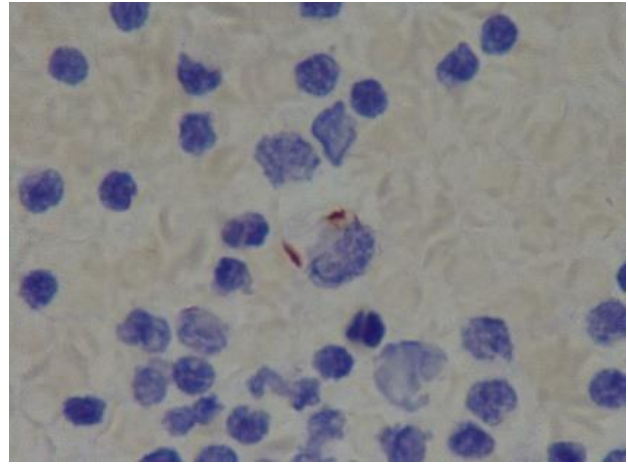
Şekil 3. Lenf yumrusunda makrofajların sitoplazmasında *M. bovis* pozitif boyanma (İHK x100, DAB kromojen, 25.olgu)  
Figure 3. *M. bovis* positive staining in macrophage cytoplasm in a lymphnode (IHCx100, DAB chromogen, Case 25)



Şekil 5. Kan frotisinde *M. bovis* pozitif boyanma gösteren lenfositler (İSK x100, DAB kromojen, 1.olgu)  
Figure 5. *M. bovis* positive staining lymphocytes staining in blood smear (ICCx 100, DAB) chromogen, Case 1)

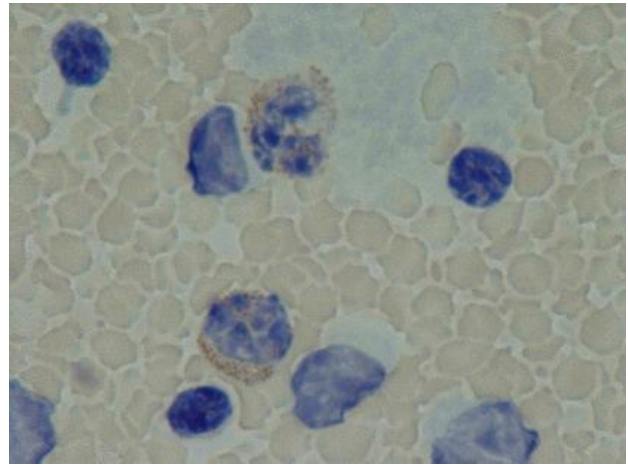


Şekil 4. Bir dev hücrenin sitoplazmasında *M. bovis* pozitif boyanma (İHK x100 DAB kromojen, 26.olgu)  
Figure 4. *M. bovis* positive staining in cytoplasm of a giant cell (IHCx100, DAB chromogen, Case 26)



Şekil 6. Monosit sitoplazmasında *M. bovis* pozitif boyanma (İSK x 100, DAB kromojen, 24.olgu)  
Figure 6. *M. bovis* positive staining in in a monocyte cytoplasm (ICCx100, DAB, Case 24)

**İmmunohistokimya:** Morfolojik olarak tipik tüberkül yapısının görülmesine müsaade ettiği ve etkenleri de ortaya koyduğu için etiyolojik tanıya yardımcı olan İHK, bu çalışma sırasında referans olarak (altın standart) kabul edildi. Primer antikor ile pozitif reaksiyon veren basillere, nekroz alanlarını çevreleyen bağ dokuda serbest şekilde, makrofaj, dev hücresi nadiren lenfosit ve fibrositlerin sitoplazmalarında rastlandı (Şekil3,4). Pozitif reaksiyonun granülomun dışına doğru gidildikçe azaldığı saptandı. İHK sonucunda 26 olguda pozitif boyanma gözlemlendi. Aynı dokulara uygulanan PCR<sub>doku</sub> ile İHK'nın sonuçları ile karşılaştırıldığı zaman, İHK ile pozitif sonuç verdiği halde PCR<sub>doku</sub>'nun negatif olduğu olgu sayısının 9 olduğu gözlemlendi. Buna karşın, İHK'nın negatif olduğu 3 olguda, PCR<sub>doku</sub> incelemesinin pozitif sonuç verdiği dikkati çekti. Ayrıca, İHK sonuçları İSK<sub>bc</sub> ile karşılaştırıldığında, İSK<sub>bc</sub>'de pozitif bulunan olguların üçünde de (3/25), İHK'da pozitif reaksiyon gözlemlendi.



Şekil 7. Bazı nötrofil granüllerinde *M. bovis* pozitif boyanma (İSKx100, DAB kromojen, 8.olgu)  
Figure 7. *M. bovis* positive staining in some neutrophil granules (ICCx100, DAB chromogen, Case 8)

Tablo 1. PPD müspet pozitif hayvanlara ait kan ve dokularda, HE, ZN, İHK ve İSK<sub>bc</sub> boyamaları ile PCR<sub>doku</sub> ve PCR<sub>bc</sub> sonuçları.  
Table 1. The results of HE, ZN, IHC, ICC<sub>bc</sub> stainings in tissues and PCR<sub>tissue</sub> and PCR<sub>bc</sub> in PPD positive animals.

Olgu No	Makroskobik Lezyon	HE	ZN	İHK	İSK <sub>bc</sub>	PCR <sub>doku</sub> (Doku)	PCR <sub>bc</sub> (Kan)
1	Akciğer, karaciğer ve MLY	+	+	+	+	+	+
2	Karaciğer ve MLY	+	+	+	-	-	-
3	Akciğer ve MLY	+	+	+	-	-	-
4	Lezyonsuz	-	-	-	-	+	-
5	Akciğer, RFLY ve MLY	+	+	+	-	+	-
6	RFLY ve MLY	+	+	+	-	-	-
7	Akciğer	+	+	+	-	-	-
8	Akciğer ve MLY	+	+	+	-	+	-
9	RFLY, MLY ve karaciğer	+	+	+	-	-	+
10	Akciğer	+	+	+	-	+	+
11	MLY	+	+	+	-	+	-
12	Akciğer, RFLY ve MLY	+	+	+	-	+	-
13	Akciğer	+	+	+	-	-	-
14	Akciğer ve MLY	+	-	-	-	-	+
15	Akciğer	+	+	+	-	+	+
16	Akciğer ve MLY	+	+	+	-	+	-
17	Faringeal lenfadenopati	-	-	-	-	+	-
18	Akciğer ve MLY	+	-	+	-	-	+
19	Akciğer, MLY ve karaciğer	+	+	+	-	+	+
20	Akciğer ve MLY	+	+	+	-	-	+
21	Akciğer ve MLY	+	-	+	-	-	+
22	Lezyonsuz	-	-	-	-	-	-
23	MLY	+	+	+	-	+	+
24	Akciğer, MLY ve karaciğer	+	+	+	+	-	+
25	Akciğer, Plöra ve karaciğer	+	+	+	-	+	+
26	Akciğer ve MLY	+	-	+	-	+	-
27	Akciğer ve MLY	+	-	+	-	+	-
28	Akciğer ve MLY	+	-	+	-	+	+
29	Akciğer ve MLY	+	-	+	-	+	-
30	Akciğer, MLY ve karaciğer	+	+	+	+	+	+

MLY: Mediastinal Lenf Yumrusu, RFLY: Retrofaringeal Lenf Yumrusu, HE: Hematoksilen&Eozin, ZN: Ziehl-Neelsen, İHK: İmmunohistokimya, İSK: İmmunositokimya, PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**İmmunositokimya:** Pozitif reaksiyona lenfosit (Şekil5), monosit (Şekil-6) ve nötrofil lökositlerin sitoplazmasında (Şekil-7) rastlandı. Tipik tüberkül yapısı gözlenen 27 olgunun 3 tanesinde (1, 24 ve 30. olgular) lökosit katmanı frotilerinde pozitif reaksiyon gözlemlendi. Bu olguların üçü de HE, ZN, İHK ve PCR<sub>bc</sub> incelemeleri yönünden tüberküloz pozitif idi.

**Polimeraz Zincir Reaksiyonu:** Dokularda (akciğer, lenf yumrusu veya karaciğer), ticari firma direktiflerine göre uygulanan PCR<sub>doku</sub> incelemelerinde, 18 pozitif olgu saptandı. Diğer inceleme yöntemlerinde (HE, ZN, İHK, İSK<sub>bc</sub>, PCR<sub>bc</sub>) tüberküloz yönünden negatif bulunup,

PCR<sub>doku</sub> incelemesinde dokuda pozitivite gösteren iki olgu (4 ve 17. olgular) tespit edildi. İSK<sub>bc</sub> ile negatif bulunup, PCR<sub>bc</sub> incelemesinde pozitif saptanan 11 olgu gözlemlendi (Tablo1).

İstatiksel incelemede, altın standart olarak İHK temel alınarak yapılan ikili karşılaştırmaların değerlendirme sonuçları Tablo-2’de, Testler arasındaki uyumu gösteren Cohen kappa katsayıları ve ilgili p değerleri Tablo3’te görülmektedir. Pozitif/negatif tabanlı yapılan bu karşılaştırmalar sonucunda yapılan İHK testinin ZN, İSK<sub>bc</sub> ve PCR<sub>bc</sub> testlerine göre pozitivitesinin istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) sonuç verdiği gözlemlendi.

Tablo 2. İHK altın standart alınarak diğer tanı yöntemlerinin (HE, ZN, İSK<sub>bc</sub>, PCR<sub>doku</sub>, PCR<sub>bc</sub>) öneminin incelenmesi,  
Table 2. Tabulation of the significance of other diagnostic methods (HE, ZN, ICC<sub>bc</sub>, PCR<sub>tissue</sub>, PCR<sub>bc</sub>) by IHC gold standard,

	HE	ZN	İSK <sub>bc</sub>	PCR <sub>doku</sub>	PCR <sub>bc</sub>
+ / - (%)	26/0	20/6	3/23	16/10	13/13
Sensitivite (%)	96.2	100	100	88.8	92.8
Spesifite (%)	100	40	14.8	16.6	18.7
PPV (%)	100	76.9	11.5	61.5	50
NPV (%)	75	100	100	50	75
P değeri	1.000	<0.05	<0.001	0.39	<0.05

McNemar Testi, PPV: Tahmini Pozitif Değer, NPV: Tahmini Negatif Değer

Tablo 3. Diğer tanı yöntemlerinin (HE, ZN, İSK<sub>bc</sub>, PCR<sub>doku</sub>, PCR<sub>bc</sub>) altın standart İHK ile uyumluluğunun Cohen kappa testi ile incelenmesi,  
Table 3. Analysis of the Tabulation of the compatibility of other diagnostic methods (HE, ZN, ICC<sub>bc</sub>, PCR<sub>tissue</sub>, PCR<sub>bc</sub>) by IHC gold standard,

Testler	Kappa katsayısı (κ)	P değeri
HE	0.839	<0.001
ZN	0.471	0.02
İSK	0.034	0.474
PCR <sub>doku</sub>	0.063	0.661
PCR <sub>bc</sub>	0.110	0.351

Cohen kappa Testi

### Tartışma ve Sonuç

Sığır tüberkülozu ile mücadele etmek için tanıya önem verilmekte ve eradikasyon çalışmaları uygulanmaktadır (8,11,14). Bu amaçla canlı hayvanlarda PPD, klinik tanı ve IFN- $\gamma$  sonuçlarına bakılarak teşhis konulmaya çalışılmaktadır (21). Tüberküloz tanısında açıklanan yöntemlerden bazılarının uzun zaman alması; bazılarında ise etken sayısının az olması; IFN- $\gamma$ 'nın artmasını baskılayan IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinlerdeki artış (37) ve immün sistemi zayıf hayvanlardaki yetersiz immün yanıtlar göz önüne alındığında, tanı yöntemlerinin eksikliğini gidermeye yönelik yardımcı ve alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmakta ve dolayısıyla bu alanlarda daha fazla araştırma yapma ihtiyacı ortaya çıkmaktadır. İHK yöntemi mikobakteriyel antijenlerin gösteriminde sık başvurulan yardımcı yöntemlerden birisidir (6,7,16,40,43). Yirmidört keçi ve 18 sığırdaki ZN ve İHK metodlarının karşılaştırılması amacı ile yapılan bir çalışmada tipik granulomların olduğu kesitlerde etken ZN ile %52 oranında boyanırken, bu oran İHK'da % 64'tür (11). Sunumunu yaptığımız bu çalışmada ZN ile boyanmış preparatların incelenmesi, makroskopik yönden tüberkülozla uyumlu bulunmuş olguların doğrulanmasına yardımcı olmuş ancak organlarında mikroskopik lezyon gösteren hayvanların (27 adet) dokularından hazırlanan preparatların ZN ile boyanmasının sonucunda 20 tanesi pozitif (%74) sonuç vermiştir. Pausibasillar veya latent infeksiyonda bakteriyel hücre

duvarı yapısının değişmesinin ZN boyamada yanlış negatif sonuca neden olabileceği bildirilmiştir (13, 26, 36, 39). Yine, ZN boyama ile arada oluşan bu farkın ölen basillerin veya antijenik parçalarının lökositler tarafından fagosite edilmesinin İHK yöntemi ile saptanabilirken, ZN boyamalarda bu durumun tespit edilmemesinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (31). *M. bovis*'e spesifik poliklonal antikorlarla yapılan bir başka çalışmada, İHK incelemelerinde bakterilerin hücre içi ve hücre dışı olarak, nekroz alanının periferinde, nekrozu çevreleyen bağ doku ve lökosit infiltrasyon kuşağında yer aldığı, granulomun periferine gidildikçe bakteri yoğunluğunun azaldığı (2) benzer görünüme çalışmamızda da rastlanmıştır.

PCR, mikobakterilerin tanısı ve tiplendirilmesinde, insanlarda ve daha az olarak sığırlarda bakteri kültürü, doku, kan, sekret gibi çeşitli örnekler üzerine uygulanan yöntemlerden birisidir (3,12,15,18,30) ve *M. bovis* ile ilgili spesifik ve suş tayinine yönelik PCR çalışmaları da vardır (38,47). Ticari insan kiti kullanılarak sunumunu yaptığımız bu çalışmada PCR<sub>doku</sub> incelemeleri sonucunda doku numularında pozitif reaksiyon %60 oranında iken, aynı dokular üzerinde yapılan İHK boyanması sonuçları %86,6'dır. İHK'da kullanılan primer antikorlar, PCR'de kullanılan primerler (17) ve bakterinin intrasellüler doğası ile impermeabil özelliklerinin (1) ortaya çıkan bu farklılığın nedeni olabileceği ileri sürülmüştür. Sunumunu yaptığımız bu çalışmada ise, uygulanan diğer yöntemlerde negatif bulunurken, sadece 2 olguda (4ve 17. olgular)

PCR<sub>doku</sub> ile pozitif bulgularının gözlenmesi yöntemin sensitivitesinden kaynaklanabileceği, uzak bir ihtimal olsa da bu olgularda submakroskobik düzeyde lezyonların olabileceği ya da bütün özene rağmen kontaminasyonun şekillenmiş olabileceğini düşündürmüştür. İHK'da kullanılan primer antikorun *M.bovis*'e, PCR<sub>doku</sub> analizinde kullanılan ticari kitin ise *M.tuberculosis* kompleksine (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.caprae*,) ait herhangi bir mikobakteri cinsinde bulunan, IS6110 gen bölgesine spesifik olduğu düşünüldüğünde, bu iki olguda, düşük bir ihtimal olsa da *M.tuberculosis* kompleksi içerisinde *M.bovis* olmayan bir mikobakteri türüyle infeksiyon şekillendiği yorumunu yapmak da mümkündür. Makroskobik veya mikroskobik lezyon görülmeden PCR<sub>doku</sub>'da pozitif sonuç alınması (4. olgu), erken evredeki bir infeksiyon şeklinde de yorumlanabilir. Öte yandan, makroskopi dahil, hiçbir testte pozitif sonuç alınmamasına karşılık tüberkülin deri testinde müspet reaksiyon alınmış olması (22. olgu), PPD testinin patojen olmayan diğer mikobakterilerin varlığında da yanlış müspet sonuç verebileceğinin bir örneği olarak düşünülebilir. Sunulan bu çalışmamızdaki PCR<sub>doku</sub> ve İHK yöntemleri karşılaştırıldığı zaman, PCR<sub>doku</sub> ve İHK yöntemlerinin birbirlerine alternatif olmaktan ziyade birbirlerini tamamlayan iki teknik olabileceği düşünülmüştür.

İnsanlarda tüberküloz etkenini periferik kanda ortaya koyan PCR ağırlıklı çalışmalar (25,28,41) ile hastalığın tanısında periferik kanın kullanılabilmesi ortaya konmuştur. İnsanlarda farklı yöntemlerle, öncesinde tüberküloz tanısı konmuş 48 bireyin örneklendiği bir çalışmada (25), PCR ile %33 oranında lökosit katmanında etken DNA'sı saptanmış, bu da olguların aktif tüberkülozlu olup olmamalarıyla ilişkilendirilmiştir. Sığırlarda tüberkülozun periferik kanda tanısında ise immün sistemin reaksiyonuna dayalı çalışan testler (ELISA, tüberkülin deri testi, IFN- $\gamma$  Testi) yanı sıra serumda PCR metodu da kullanılmıştır (21). Bununla birlikte, literatür incelemelerinde sığırlarda, lökositlerdeki (örneğin buffy coat) *M.bovis* etkeni veya etkenine ait komponentlerin tespitine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Kaya ve arkadaşlarının (21) PPD müspet sığırların kan serumunda PCR ile yaptığı çalışmada %25,81 oranında pozitiviteye rastlanmış ve PCR'nin aktif tüberküloz saptamada uygun bir metod olabileceği belirtilmiştir. Sunumu yapılan bu çalışmamızda ise PCR<sub>bc</sub>'nin %46,6 oranını göstermesi bakterinin serbest olarak serumdan daha çok lökositler içerisinde olduğunu ve bu şekilde sensitivite oranının daha yüksek olabileceğine işaret etmiştir.

Kanda etkene ait antijenik yapıların pozitif olarak boyanması bakteriyemi veya etkeni fagosite etmiş, dolayısıyla etken antijenlerini barındıran mononükleer fagositik sistem hücrelerinin dokulardan kana geçmesi ihtimali ile açıklanmaya çalışılmıştır (10,19,32,44). Sunumunu yaptığımız bu çalışmada gerçekleştirilen İSK<sub>bc</sub> sonucunda,

periferik kandan alınan lökositlerde 3olguda (%10) gözlenen pozitif reaksiyon, kan lökosit katmanının etkene ait bileşenlerin tespiti yoluyla tüberküloz hastalığının tanısında kullanılabilmesini düşündürmüştür. Bu üç olgunun karaciğerinde de tüberküloz tutulumu olduğu ve karaciğer tutulumu şekillenen olguların bir tanesi hariç kan PCR<sub>bc</sub>'lerinde pozitif sonuç alındığı göz önünde bulundurulduğu zaman, etkenin kanda saptanması hastalığın generalizasyonu ile ilişkilendirilebilir. Çalışmamızda kandan hazırlanmış İSK<sub>bc</sub> preparatların incelenmesi sırasında serbest halde pozitif boyanmış basil yapısına rastlanmamış, sadece lökositlerin sitoplazmasında boyanma görülmüştür. Bu durum da bakterinin bakteriyemi safhasında serbest halde iken kanda, her zaman, yakalanmasının zor olacağına bir işaret olarak kabul edilmiştir. Hastalığın teşhisinde tüberküloz olduğu farklı testler ile önceden doğrulanmış sığırların serumunda IFN- $\gamma$ 'ya bakılarak yapılan çalışmalardan bir tanesinde %62 oranında müspet sonuç elde edilirken (21), benzeri bir diğer çalışmada ise IFN- $\gamma$ 'nın sensitivitesinin %85 spesifitesinin %93 olduğu tespit edilmiştir (33). Her iki çalışmada da IFN- $\gamma$  testinin diğer testler ile beraber kullanıldığı zaman anlamlı olduğu vurgulanmıştır. Ryan ve ark. (33)'nin yapmış olduğu çalışmada PPD müspet hayvanlarda IFN- $\gamma$  testinin 8. ve 28. günler arasında alındığı zaman bu duyarlılığa yukarıdaki oranlara eriştiklerini belirtmişlerdir. Sheridan ve ark. (37)'nin IFN- $\gamma$  kan düzeyleri üzerine yaptıkları çalışmada IL-10'nun kan IFN düzeylerini hastalığın evresi ile ilişkili olarak etkilediği, yüksek IL-10 düzeylerinde IFN- $\gamma$  düzeylerinin düştüğünü belirtmişlerdir. Sunulan çalışmamızda PCR<sub>bc</sub> (%46,6 müspet) ve İSK<sub>bc</sub> (%10 müspet) vasıtasıyla doğrudan doğruya kanda etkenin varlığının ortaya konması hedeflenmiştir. Sonuç itibari ile IFN- $\gamma$  çalışmalarına kıyasla sunduğumuz bu çalışmada müspetlik düşük gibi görüne de doğrudan doğruya etkeni ortaya koyması bakımından diğer testler ile beraber destekleyici olarak kullanılabilir düşüncesi oluşmuştur.

Sığır tüberkülozunun tanısında nazal svab, süt gibi klinik örnekler üzerinde PCR yöntemi kullanılmıştır ve olumlu sonuçlar alınmıştır (46) ancak kanda, özellikle de lökosit katmanında tüberküloz tanısı yalnızca insanlarda denenmiştir (26, 29, 43). Sunulan bu çalışmamızda kandan hazırlanarak lökositler üzerinde yapılan PCR<sub>bc</sub>'de 14 vakada (%46,6), PCR<sub>doku</sub>'da ise 18 vakada (%60) pozitif sonuç elde edilmiş ise de İHK altın standart kabul edilerek yapılan Mc Nemar testinde İHK'ya göre bu testlerdeki pozitivite düşük bulunmuştur (P<0,05 Tablo-2). İnsanlarda yapılan benzer çalışmada dokuda %63, kanda ise %46 pozitivite saptanmıştır (25). Etkenin kanda saptanabilirliği gerçeği göz önüne alınacak olursa, çalışmamızın sonuçlarına göre PCR<sub>bc</sub> yönteminin İSK<sub>bc</sub>'ye göre kanda daha etkili olduğu söylenebilir (sırasıyla %46,6-%10). PCR ile yapılan klinik çalışmalarda PCR inhibitörlerinin varlığı ile birlikte bakteri hücre duvarının yapısı ve

impermeabilitesi PCR ile tespiti ve dolayısı ile tanıyı sınırlandırıcı bir faktör olarak bildirilmektedir. Bu durumda az basilin bulunduğu ortamlarda, etkenin PCR ile saptanmasında engel teşkil edebilmektedir (1). Ayrıca bu farkın ortaya çıkmasında antijen ve nükleik asit stabilitesindeki farkın da etkili olduğu düşünülmektedir(9).

Çalışmada kullanılan testler arasındaki uyumluluğu inceleyen Cohen kappa İHK katsayısı ile HE arasında çok iyi düzeyde uyum gözlenirken ( $p < 0,001$ ), İHK ile ZN arasında orta düzeyde uyum olduğu ( $p < 0,05$ ) belirlenmiştir. İHK'nın diğer testler (İSK, PCR<sub>doku</sub>, PCR<sub>bc</sub>) ile uyumunun ise oldukça düşük ve istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, etkeni demonstre eden ZN boyama ile yapılacak tüberküloz tanısının her zaman duyarlı olmadığı ve teşhiste diğer yöntemlere ihtiyaç gösterdiği; çalışmamızda referans yöntemi olarak kabul edilen İHK'nın PCR<sub>doku</sub>, PCR<sub>bc</sub> ve İSK<sub>bc</sub>'ye kıyasla sensitivitesinin istatistiki olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır ( $p < 0,05$ ). PCR<sub>bc</sub> ile etkene ait moleküllerin periferik kandaki varlığı ile sığır tüberkülozunun saptanmasında rolü olabileceği ortaya konmuştur. Bununla beraber sığırlarda tüberküloz hastalığının kesin teşhisinde, kullanılan tekniklerin üstünlüğü yerine birbirini tamamlayıcılığından ve bir arada kullanıldıkları zaman teşhisin hem daha hızlı hem de sensitivitesinin daha yüksek olduğu düşünülmüş; moleküler tekniklerin diğer yöntemlere kıyasla rutin olarak ne derecede tercih edilebileceğinin tespitinin ise daha fazla çalışmaya ihtiyaç gösterdiği sonucuna varılmıştır.

### Teşekkür

Bu proje Uludağ Üniversitesi BAPB-KUAP (V2012-45) ve TÜBİTAK- TOVAG tarafından 112 O 440 No'lu proje olarak desteklenmiştir. Makalenin yayınlanması için Gıda Tarım ve Ormanlık Bakanlığından 19.10.2017 tarih ve 55016929-605.99-E.2614548 yazı ile gerekli izin belgesi alınmıştır.

### Kaynaklar

1. **Ayele WL, Neill SD, Zinsstag J, et al.**(2004): *Bovine tuberculosis: An old disease but a new threat to Africa*. Int J Tuberc Lung Dis, **8**, 924-937.
2. **Boros DL**(2003): *Granulomatous infections and inflammations, cellular and molecular mechanisms*. 1-21. American Society for Microbiology Press, Washington DC.
3. **Brosch R, Gordon SV, Marmesse M, et al.** (2002): *A new evolutionary scenario for the mycobacterium tuberculosis complex*. Proc Natl Acad Sci, **99**, 3684-3689.
4. **Buchwalow IB, Böcker W** (2010): *Immunohistochemistry: Basics and methods*. 1-66. Springer Verlag, Heidelberg.
5. **Caminiti A, Pelone F, LaTorre G, et al.**(2016): Control and eradication of tuberculosis in cattle: a systematic review of economic evidence. Vet Rec, **179**, 70-75
6. **Cartun RW.** (2010): *Immunohistochemistry of infectious diseases*. J Histotechnol, **3**,195-202.
7. **Cassidy JP, Bryson DG, Pollock JM, et al.**(1999): *Lesions in cattle exposed to mycobacterium bovis-inoculated calves*. J Comp Pathol, **121**, 321-337.
8. **Caswell Jeff L, Williams Kurt J**(2016): *Respiratory System*.465-590. In: KVF Jubb, PC Kennedy, NC Palmer(Ed), Pathology of Domestic Animals, 6th edition, Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri.
9. **CondosR, McClune A, Rom WN, et al.** (1996): *Peripheral blood based PCR assay to identify patients with active pulmonary tuberculosis*.The Lancet, **347**, 1082-1085.
10. **Divangahi M**(2013): *The new paradigm of immunity to tuberculosis*. 238-239. Springer Science Business Media, New York.
11. **Gutierrez Cancela MM, Garcia Marin JF**(1993): *Comparison of Ziehl-Neelsen Staining and Immunohistochemistry for the Detection of Mycobacterium bovis in Bovine and Caprine Tuberculous Lesions*. J Comp Path, Vol. **109**,361-370.
12. **Hermans PW, Schuitema AR, Van Soolingen D, et al.** (1990): *Specific Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex Strains by Polymerase Chain Reaction*. J Clin Microbiol, **28**, 1204-1213.
13. **Hernandez-Pando R, Jeyanathan M, Mengistu G, et al.**(2000): *Persistence of DNA from Mycobacterium tuberculosis in superficially normal lung tissue during latent infection*. The Lancet, **356**, 2133-2138.
14. **Hirsch DC, Zee YC** (1999): *Veterinary Microbiology*,158-164. Blackwell Science, Massachusetts.
15. **Huard RC, Lazzarini LC, Butler WR, et al.** (2003): *PCR based method to differentiate the subspecies of the mycobacterium tuberculosis complex on the basis of genomic deletions*. J Clin Microbiol, **41**, 1637-1650.
16. **Hunter RL, Jagannath C, Actor JK** (2007): *Pathology of postprimary tuberculosis in humans and mice: contradiction of long-held beliefs*. Tuberculosis, **87**, 267-278.
17. **Jabbar A, Khan J, Ullah A, et al.** (2015): *Detection of mycobacterium tuberculosis and mycobacterium bovis from human sputum samples through multiplex PCR*. J Pak Pharm Sci, **28**,1275-1280.
18. **Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al.** (1997): *Simultaneous detection and strain differentiation of mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology*. J Clin Microbiol, **35**, 907-914.
19. **Kaufman S, Medzhitov R, Gordon S** (2004): *The innate immune response to infection*. 444-448. ASM Press, Washington.
20. **Kaufmann S, Walker BD** (2009): *AIDS and Tuberculosis*. 34-39. Infection Biology Handbook Series, Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
21. **Kaya A, İcen H, Tuzcu N, et al.** (2015): *Comparison of tuberculin skin test, IFN-γ assay, Real Time PCR and Lateral Flow Rapid Test in diagnosis of field outbreaks of bovine tuberculosis*. Kafkas Univ Vet Fak Derg, **21**,739-743.
22. **Kumararatne DS** (1997): *Tuberculosis and immunodeficiency-of mice and men*. Clin Exp Immunol, **107**, 11-14.
23. **Luna LG**(1968): *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*.32-46. Blakiston Division, McGraw-Hill; 3rd edition, New York.



24. **Mazurek GH, Lobue PA, Daley CL, et al.** (2001): *Comparison of a whole-blood interferon  $\gamma$  assay with tuberculin skin testing for detecting latent mycobacterium tuberculosis infection.* JAMA, **286**, 1740-1747.
25. **Mirza S, Restrepo BI, McCormik JB, et al.** (2003): *Diagnosis of tuberculosis lymphadenitis using a polymerase chain reaction on peripheral blood mononuclear cells.* Am J Trop Med Hyg, **69**, 461-465.
26. **Moter A, Göbel UB** (2000): *Fluorescence in situ hybridisation for direct visualization of microorganism.* J Microbiol Methods, **41**, 85-112.
27. **O' Reilly LM, Daborn CJ** (1995): *The epidemiology of Mycobacterium bovis infections in animals and man: a review.* Tuber Lung Dis, **76**, 1-46.
28. **O'tole D, Li H, Miller D, Williams WR, et al.** (1997): *Chronic and recovered cases of sheep associated malignant catarrhal fever in cattle.* Vet Rec, **140**, 519-524.
29. **Parsons LM, Brosch R, Cole ST, et al.** (2002): *Rapid and simple approach for identification of mycobacterium tuberculosis complex isolates by pcr-based genomic deletion analysis.* J Clin Microbiol, **40**, 2339-2345.
30. **Pritchard DG** (1988): *A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy.* J Comp Pathol, **99**, 357-399.
31. **Purohit MR, Tehmina M, Wiker HG, et al.** (2007). *Immunohistochemical diagnosis of abdominal lymph node tuberculosis by detecting Mycobacterium tuberculosis complex specific antigen MPT64.* Diagn Pathol, **40**, 782-791.
32. **Russel DG** (2007): *Who puts the tubercle in tuberculosis.* Nat Rev Microbiol, **5**, 39-47.
33. **Ryan TJ, Buddle BM, De Lisle GW** (2000). *An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing.* Res Vet Sci, **69**, 57-61.
34. **Sachse K, Frey J** (2002): *PCR detection of microbial pathogens: Methods and protocols.* 201-221. Humana Pres, New Jersey.
35. **Schiller I, Oesch B, Vordermeier HM, et al.** (2010): *Bovine Tuberculosis: A Review of Current and Emerging Diagnostic Techniques in View of their Relevance for Disease Control and Eradication.* Transbound Emerg Dis, **57**, 205-220.
36. **Seiler P, Ulrichs T, Bandermann S, et al.** (2003): *Cell wall alterations as an attribute of mycobacterium tuberculosis in latent infection.* J Infect Dis, **188**, 1326-1331.
37. **Sheridan MP, Browne JA, Doyle MB, et al.** (2017): *IL-10 suppression of IFN- $\gamma$  responses in tuberculin-stimulated whole blood from Mycobacterium bovis infected cattle.* Vet Immunol Immunopathol, **189**, 36-42.
38. **Smith NH, Gordon SV, Rua-Domenech R, et al.** (2006): *Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of mycobacterium bovis.* Nature, **4**, 670-681.
39. **Stender H, Lund K, Petersen KH, et al.** (1999): *Fluorescence in situ hybridization assay using peptide nucleic acid probes for differentiation between tuberculous and nontuberculous mycobacterium species in smears of mycobacterium cultures.* Clin Microbiol Infect, **37**, 2760-2765.
40. **Sumi S, Radhakrishnan VV** (2009): *Evaluation of immunohistochemistry with a panel of antibodies against recombinant mycobacterial antigens for the diagnosis of tuberculous lymphadenitis.* Int. J. Med. Med. Sci, **1**, 215-219.
41. **Tehmina M, Wiker HG, Mfinanga SGM, et al.** (2006): *Immunohistochemistry using a Mycobacterium tuberculosis complex specific antibody for improved diagnosis of tuberculous lymphadenitis.* Mod Pathol, **19**, 1606-1614.
42. **Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, et al.** (1990): *IS6110, an IS-like element of Mycobacterium tuberculosis complex.* Nucleic Acids Res, **18**, 188.
43. **Tüzün-İnce A, Güneş P, Şenates E, et al.** (2011): *Can an immunohistochemistry method differentiate intestinal tuberculosis from crohn's disease in biopsy specimens?* Dig Dis Sci, **56**, 1165-1170.
44. **Whelan C, Shuralev E, O'keeffe G, et al.** (2008): *Multiplex immunoassay for serological diagnosis of mycobacterium bovis infection in cattle.* Clin Vaccine Immunol, **12**, 1834-1838.
45. **vanCrevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JWM** (2002): *Innate immunity to mycobacterium tuberculosis.* Clin Microbiol Rev, **15**, 294-309.
46. **Vitale F, Capra G, Maxia L, et al.** (1998): *Detection of Mycobacterium tuberculosis complex in cattle by pcr using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs.* J Clin Microbiol, **36**, 1050-1055.
47. **Zumarraga MJ, Meikle V, Bernardelli A, et al.** (2005): *Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of Mycobacterium bovis detection.* J Vet Diagn Invest, **17**, 232-238.

Geliş tarihi : 22.11.2017 / Kabul tarihi : 20.04.2018

**Yazışma adresi:**

Doç.Dr. M. Özgür ÖZYİĞİT  
 Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
 Patoloji Anabilim Dalı  
 16059 Görükle/Bursa/Türkiye  
 Tel: +90 2941305  
 Fax: +90 224 4428025  
 E-mail: ozyigit@uludag.edu.tr