


## ***Brucella melitensis* ile Doğal Enfekte Koyun Abortuslarında CD3 ve Lambda Hafif Zincir İmmunglobulin Ekspresyonu <sup>[1]</sup>**

Mahmut SÖZMEN \*  Recai TUNCA \*\* Enver BEYTUT \* Abdurrahman GÜRBÜZ \*\*\*

[1] Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje No: 2005-VF-008) fonu tarafından desteklenmiştir

\* Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas, 36100 Kars - TURKEY

\*\* Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Adnan Menderes, 09100 Aydın - TURKEY

\*\*\* Atatürk Vocational Training School of Health Services, University of Kafkas, 36100 Kars - TURKEY

**Makale Kodu (Article Code): KVFD-2009-639**

### **Özet**

Bu çalışmada *Brucella melitensis* ile doğal olarak enfekte 49 koyun fötüsü üzerinde etkenin varlığı ve enfeksiyona bağlı olarak şekillenen değişiklikler morfolojik, bakteriyolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle incelendi. Bakteriyolojik olarak incelenen 28 fötüsün dokuzunda *B. melitensis* saptandı ve etken izole edilen bu olgular üzerinde immunohistokimyasal incelemeler yapıldı. İncelenen dokuz fötüsün akciğerlerinde bronkopnömoni, karaciğer ve dalakta lenfoid ve lenforetiküler hiperplazi dikkati çekti. Bakteriyolojik olarak *B. melitensis* ile enfekte olduğu belirlenen dokuz koyun fötüsünün hepsinin akciğerlerinde immunohistokimyasal olarak pozitif reaksiyon tespit edildi. Fakat incelenen timusların hiçbirinde *Brucella* antijeni tespit edilmedi. *Brucella* antijeninin başlıca makrofajlar, nötrofiller ve hepatositlerde intrasellüler olarak lokalize oldukları saptandı. CD3<sup>+</sup> T lenfosit infiltrasyonları atık koyun fötüslerinin karaciğer, akciğer, dalak, böbrek, kalp, beyin, bronşiyal lenf düğümü, ince bağırsak ve abomazumda değişen yoğunluklarda tespit edildi. Fötüslerde gelişen lokal humoral immun yanıtın dalak ve lenf düğümleri dışında iki fötüs akciğer ile bir fötüs abomazumunda tespit edilebilen az sayıdaki lambda hafif zincir immunglobulin ( $\lambda$ -Ig) pozitif hücreler ile sınırlı olduğu tespit edildi. Bakteriyolojik ve serolojik incelemelerin mümkün olmadığı, materyalin formaldehidde tespit edildiği ya da bakteriyolojik kültürün negatif olduğu şüpheli durumlarda *Brucella* etkenlerinin immunohistokimyasal olarak belirlenmesi bu yöntemin tamamlayıcı teşhis metodu olarak kullanılabileceğini göstermesi bakımından önem taşımaktadır. Ayrıca, bu çalışma ile koyun fötüslerinde meydana gelen abortusların yalnızca annede gelişen plasentitis nedeni ile değil aynı zamanda bruselloze karşı oluşan sınırlı humoral ve hücresel yanıt nedeni ile gelişebileceği belirlenmiştir.

**Anahtar sözcükler:** *Abortus, Brucella melitensis, CD3, İmmunohistokimya, Koyun, Lambda hafif zincir immunglobulin*


## **CD3 and Lambda Light Chain Immunglobulin Expressions in the Aborted Sheep Fetuses Naturally Infected with *Brucella melitensis***


### **Summary**

In the present study 49 sheep fetuses naturally infected with *Brucella melitensis* were morphologically and immunohistochemically evaluated in association with bacteriologic culture. *B. melitensis* was isolated from nine fetuses of the 28 cases of which bacteriological analysis was performed and further immunohistochemical investigations were performed to those *B. melitensis* positive cases. Histopathological changes of nine sheep fetuses were mainly bronchopneumonia in the lungs and lymphoreticular hyperplasia in the liver and spleen. Nine sheep fetal lungs microbiologically infected with *B. melitensis* were also immunohistochemically positive. However, the antigen was not detected in any of the thymus examined. Intracellular antigenic localization was identified mainly in macrophages, neutrophils and hepatocytes. CD3<sup>+</sup> T lymphocytes were determined with varying intensities in the liver, lungs, spleen, kidney, heart, bronchial lymph node, small intestines and abomasum of the aborted sheep fetuses. Local humoral response were limited and reflected as a few lambda light chain positive ( $\lambda$ -Ig) cells in only two lungs and one abomasum addition to spleens and lymph nodes of the aborted fetuses. In the present study determination of the *Brucella* causative agents with use of immunohistochemistry showed that this method could be useful as complementary method in cases where bacteriologic culture and serology is not available, in cases where sample fixed in formaldehyde or in suspicious cases where culture is negative. Furthermore, abortuses in sheep fetuses could occur not only as a result of plasentitis but also limited humoral and cellular response of the fetuses.

**Keywords:** *Abortus, Brucella melitensis, CD3, Immunohistochemistry, Sheep, Lambda light chain immunglobulin*

 **İletişim (Correspondence)**

 +90 474 2426800/1202

 msozmen@hotmail.com

## GİRİŞ

Türkiye’de hayvan yetiştiriciliğini olumsuz yönde etkileyen faktörler arasında abortusların önemli bir yer tuttuğu bilinmektedir. Evcil hayvanlarda non-enfeksiyöz ve enfeksiyöz etkenler abortuslara neden olmakla birlikte, enfeksiyöz hastalıklar abortus sebepleri arasında başta gelmektedir. Koyun abortuslarında da enfeksiyöz hastalıklar önemli rol oynamakta ve bunlar arasında da brusellozis ilk sıralarda yer almaktadır<sup>1-3</sup>. Brusellozis, insan ve hayvanlarda Brucella cinsine ait mikroorganizmalar tarafından oluşturulan bulaşıcı, genellikle subakut ve kronik seyirli zoonotik karakterde bir enfeksiyondur<sup>1-3</sup>. *B. melitensis* koyun brusellozisinin başlıca etkenidir, ancak *B. abortus*’a bağlı doğal enfeksiyonlara da rastlanmaktadır<sup>4</sup>. *B. melitensis* ayrıca insanlarda Malta humması olarak bilinen hastalığın etkenidir. İlk kez 1950’li yıllarda identifiye edilen bir Brucella mutanlığı olan *B. ovis* ise koyun yetiştiriciliğinin yapıldığı birçok ülkede koçlarda epididimitis ve koyunlarda ise plasentitis ve abortusa neden olmaktadır<sup>4</sup>.

Ülkemizde yapılan araştırmalar, brusellozisin sığır ve koyun populasyonlarında yaygın olduğunu göstermekte olup, en sık olarak *B. melitensis* izole edilmiştir<sup>5</sup>. Kayseri yöresinde abortus yapan koyunlarda yapılan bir çalışmada Brucella seropozitifliği %12.96 olarak saptanmıştır<sup>6</sup>. Gürtürk ve ark.<sup>7</sup> Van ve yöresinde koyun ve sığırlarda brusellozis insidensi üzerine yaptıkları araştırmalarda abortus yapan koyunların %13.4’ünde Brucella spesifik antikorların varlığını tespit etmişlerdir. Kıran ve ark.<sup>8</sup> Konya yöresinde koyun abortusları üzerinde yaptıkları çalışmada bakteriyolojik yönden incelenen koyun fötüslerinin %31.1’inde *B. melitensis* izole etmişlerdir. Kars ilinde brusellozisin tespit ve sağaltım çalışmalarına rağmen insidansının %6.49 - %74 arasında olduğu bildirilmiştir<sup>9,10</sup>.

*Brucella spp.* fakültatif intrasellüler bir bakteri olup konakçıda humoral ve sellüler immun yanıt şekillenmesine neden olmaktadır<sup>11</sup>. Brucella gibi intrasellüler bakterilere karşı oluşacak olan bağışıklık, konakçı sellüler cevabının aktivasyonuna bağlıdır<sup>12</sup>. Bu nedenle de lenfosit proliferasyonu oldukça önemlidir. Brucella spp. proteinleri lenfositlerin proliferasyonunu uyarmaktadır. CD molekülleri olarak adlandırılan ayırıcı antijenler (CD, Cluster of differentiation), T ve B lenfositleri ile plazma hücreleri ve doğal katil hücrelerinin ayırımında kullanılabilir<sup>13</sup>.

T lenfositlerin brusellozis enfeksiyonlarındaki koruyucu rolleri bilinmektedir<sup>14</sup>. T lenfositler, *B. abortus*’un neden olduğu enfeksiyonlarda makrofajların hücre içi bakteri öldürme etkinliklerini arttıran gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) ve benzeri moleküler salgılanmasını sağlamaktadırlar<sup>15</sup>. T-hücre-aracılı bağışıklıkta etkili olan diğer bir

mekanizma ise enfekte hücrelerin spesifik sitotoksik T lenfositler ile eritilmeleridir<sup>16</sup>. Diğer yandan, spesifik anti-Brucella sitolitik aktivitesinin başlıca CD3<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> tarafından sağlandığı bildirilmiştir<sup>17</sup>.

Brucella etkenlerine karşı gelişen bağışıklıkta antikorların da etkili olduğu, ayrıca IgG’nin komplement ile birlikte enfekte hücrenin yok edilmesinde rol oynadığı bilinmektedir<sup>18,19</sup>. Campero ve ark.<sup>11</sup>, boğalarda deneysel olarak oluşturdukları brusellozis enfeksiyonunda genital organlarda immunoglobulin içeren plazma hücrelerini immunohistokimyasal yöntemlerle tespit etmişlerdir. Bildirilen bu çalışmalara rağmen *Brucella spp.* pozitif atık fötüslerin enfekte doku ve organlarında şekillenen yangısal infiltrat içinde bulunan ve sellüler-humoral immun yanıt oluşumunda rol oynayan T lenfositler ile lambda hafif zincir immunoglobulin ( $\lambda$ -Ig) pozitif hücrelerin immunohistokimyasal yöntemlerle incelendiği bir çalışma tespit edilememiştir. Bu çalışmada brusellozis sonucu fötal dokularda gelişen bulguların şiddeti ve dağılımları ile Brucella antijeninin dağılımı arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlandı. Ayrıca, yangısal infiltrat içinde bulunan ve sellüler ve humoral immun yanıt oluşumunda rol oynayan CD3<sup>+</sup> T lenfositler ile  $\lambda$ -Ig sentezleyen hücrelerin dağılımı immunohistokimyasal yöntemlerle belirlenerek hastalığın patogeneziindeki rolleri incelendi.

## MATERYAL ve METOT

Çalışmanın materyalini Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalına Aralık 1999 - Mart 2008 tarihleri arasında getirilen koyun fötüsleri oluşturdu. Gelen fötüslerin rutin nekropsilerinin yapılmalarının ardından alınan doku ve organ örnekleri %10’luk formaldehid solüsyonunda (46 fötüs) ya da çinkolu fikzatifte (3 fötüs) tespit edilip, rutin işlemlerden geçirildi. Hazırlanan parafin bloklar 5 mikrona ayarlı mikrotomda kesilerek, hematoksilin-eozin (HE) boyama metoduyla boyandı. Hazırlanan preparatların histopatolojik yönden değerlendirmeleri ışık mikroskopunda yapıldı. İncelenen toplam 49 koyun fötüsünden 28’inde bakteriyolojik incelemeler yapılırken, 21’inde ise bakteriyolojik incelemeler yapılamadı. Bakteriyolojik incelemeler yapılabilen 28 fötüsün dokuzunda *B. melitensis* saptandı. Etken izole edilen bu olgular üzerinde immunohistokimyasal incelemeler yapıldı. İncelenen dokuz fötüsa ilişkin detaylı bilgiler *Tablo 1*’de verildi.

Bu çalışmada avidin-biotin peroksidaz metodu immunohistokimyasal yöntem olarak kullanıldı<sup>20</sup>. Immunohistokimyasal boyamalar için parafin bloklardan alınan 5 mikron kalınlığındaki kesitler aminopropyltriethoxylane (APES) ile kaplanmış lamalar üzerine alındı. Boyanacak kesitler

deparafinizasyon ve dehidrasyondan sonra endojen peroksit aktivitesini önlemek için hidrojen peroksit'in distile sudaki %3'lük çözeltisinde 20 dakika inkübe edildi. Çalışmada kullanılan tüm dokular, antijenik sitelerin açığa çıkarılması amacıyla, 0.1 M sitrat buffer (pH 6.0) solüsyonuna yerleştirildi. Ardından, mikrodalga fırında (800 watt) 10 dakika süreyle işleme tabi tutuldu. Kesitlerin PBS (Fosfatlı Buffer Solüsyonu) ile yıkanmalarının ardından dokular rabbit anti-Brucella, rabbit anti-human  $\lambda$ -Ig poliklonal antikorları ile *Tablo 2*'de belirtilen dilüsyon ve sürelerde inkübe edildi. Daha sonra kesitler biyotinlenmiş goat anti rabbit immunoglobulini (1/300) ile oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. Tüm kesitler, PBS ile yıkanmalarının ardından, peroksidaz bağlanmış streptavidin (1/300) ile 30 dakika inkübe edildi. Renk ortaya çıkarıcı substrat olarak, PBS'de %0.035 oranında hazırlanmış 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, DAKO) solüsyonu kesitlere 1 dakika süre ile uygulandı. Kesitler Harris Haematoxylin ile boyandı ve 5 dakika musluk suyunda yıkandı. Daha sonra immunmount ile kaplanarak ışık mikroskopunda incelendi.

**Tablo 1.** Koyun abortus zamanları, abortusların cinsiyeti ve atık yüzdeleri

**Table 1.** Sheep abortus times, sex of the aborted fetuses and percentages

Fötüs no.	Atık fötüs yaşı (ay)	Atığın cinsiyeti	Sürüdeki atık yüzdesi (%)
1	4.5	-	13
2	4.5	Dişi	40
3	4	Dişi	5
4	-	-	7
5	-	Erkek	10
6	-	Erkek	5
7	4.5	-	30
8	-	Erkek	9
9	-	-	14
<b>Toplam</b>	-	-	10

**Tablo 2.** Çalışmada kullanılan antikorların spesifite, dilüsyon oranları ve inkübasyon süreleri

**Table 2.** Antibody specificity, dilution rates and incubation times

Primer antikor	Dilüsyon	İnkübasyon	Firma (Katalog No., Klon)
Poliklonal rabbit anti-Brucella	1/1000	1 saat *	Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA (Cat. No. 240934)
Poliklonal rabbit anti-human CD3, T-cell	Kullanıma hazır	30 dak.	Dako, Glostrup, Denmark (Cat. No. N1580)
Poliklonal rabbit anti-human lambda light chain	1/2000	1 saat	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK (NCL-LAMP)

\* Tüm inkübasyonlar oda ısısında gerçekleştirilmiştir

Rabbit anti-human CD3 ile boyanacak kesitlere ise biyotinlenmiş link olarak anti-mouse ve anti-rabbit immunoglobulin (LSAB2TM system, Dako) ve Streptavidin HRP (LSAB2TM system, Dako) solüsyonları 15'er dakikalık sürelerle uygulandı. Negatif kontrollerde ise primer anti-kor yerine PBS ya da immun olmayan serum kullanıldı.

Histopatolojik bulgular meydana gelen lezyonun şiddeti dikkate alınarak, ışık mikroskopunda (Olympus BX51) yapılan semikantitatif değerlendirme sonuçlarına göre; - : lezyon yok; + : hafif; ++ : orta; +++ : şiddetli, şeklinde değerlendirildi. Yine, benzer bir şekilde, Brucella,  $\lambda$ -Ig ve CD3 immunohistokimyasal boyama sonuçları da dokuda tespit edilen antijen miktarları ve immunohistokimyasal boyanma derecelerine göre - : negatif; + : hafif; ++ : orta; +++ : yoğun, şeklinde derecelendirildi.

### Bakteriyolojik İncelemeler

Atık fötuslardan alınan doku örnekleri %7'lik kanlı ağar (Oxoid, CM 271) ve Brucella selektif suplement (Oxoid, SR209E) içeren Brucella Medyumunda (Oxoid, CM 169) kültüre edildi. Kültürler aerobik ve mikro-aerofilik (Microaerobic kit, Merck, Anaerocult C) olarak 37°C de 5-7 gün süreyle inkübe edildi. İnkübasyondan sonra izolasyonu yapılan Brucella kolonileri, boya ve CO<sub>2</sub> varlığında büyüme, oksidaz ve H<sub>2</sub>S, üreaz, katalaz üretimi, hareketlilik, kültür karakteristikleri ve Gram boyama morfolojisine göre tanımlanarak değerlendirildi.

## BULGULAR

Bu çalışmada, Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı'na Aralık 1999 - Mart 2008 yılları arasında getirilen toplam 49 koyun atık fötüsü incelendi. Çalışmada mikrobiyolojik ve immunohistokimyasal bulguları pozitif olan toplam dokuz olgu değerlendirildi.

### Makroskobik Bulgular

Enfekte olan bütün fötuslarda makroskobik lezyonlar saptandı. Bu lezyonların dağılımı ve karakteri açısından fötüsler arasında fark olmadığı görüldü. Enfekte olan fötüslerin çoğunun akciğer, abomazum içeriği ve lenf düğümlerinde patolojik değişiklikler saptandı. Bu fötuslarda subkutan dokunun ödemli olduğu, toraks ve abdominal boşluklarda açık kırmızı renkli bir sıvının bulunduğu görüldü.

Enfekte akciğer loplarda fokal ya da diffuz, sert, griden koyu kırmızıya kadar değişen alanlar görüldü. Bazı fötuslarda her iki kaudal lobun tamamıyla etkilendiği saptandı. Bu lobların gri ve sert kıvamda olduğu ve komşu kaburganın izler oluşturduğu belirlendi. Abomazumda

ise viskoz karakterde bulanık sarı-kahve renkli, fibrinli bir sıvı tespit edildi.

### Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik, immunohistokimyasal ve bakteriyolojik inceleme sonuçları *Tablo 3* ve *4'*te verildi. İncelenen tüm fötuslarda bronkopnömoni ve interstisyel pnömoni lezyonları görüldü. Akciğer bronşiyol lumenlerinde nötrofil lökosit ve alveolar makrofaj infiltrasyonu tespit edildi (*Şekil 1a*). Nadiren, interalveoler septada, multifokal olarak, ödem ile beraber seyreden makrofaj ve nötrofil infiltrasyonu görüldü. Şiddetli bronkopnömoni fötusların bronşiyol ve alveollerindeki eksudat içerisinde orta dereceden yaygın miktara kadar değişebilen derecelerde fibrin, bronşiyol ve alveol epitellerinden dejenerasyon ve

nükleer hücre infiltrasyonuna sınırlı miktarlarda nötrofil lökositlerin katıldığı tespit edildi. İncelenen tüm olgularda Remark kordonlarının dizilişinin bozulduğu görüldü (*Şekil 1b*). Ayrıca, sinusoidlerin genişlediği ve hiperemik oldukları dikkati çekti. Yine, incelenen fötusların tümünde portal bölgeler ile sinusoidlerde adacıklar halinde ya da yaygın bir şekilde bulunan ve hematopoiesisi vurgulayan eritropoietik serideki hücrelerin fokal hücre klonlarının bulunduğu görüldü (*Şekil 1b*). Bunlara ek olarak, dejenere ve nekroze olan safra kanal epitel hücrelerinin kısmen ya da tamamen lumene döküldükleri tespit edildi.

İncelenen fötusların çoğunda dalakta herhangi bir reaksiyon görülmedi. Etkilenen fötuslarda oluşan lezyonlar genel olarak bir benzerlik taşımaktaydı. Etkilenen

**Tablo 3.** Fötüs parankim organlarında yapılan bakteriyolojik, histopatolojik ve immunohistokimyasal inceleme sonuçları

**Table 3.** Bacteriological, histopathological and immunohistochemical investigation results of the fetal parenchymal organs

Fötüs no.	Brucella Kültür	Histopatolojik lezyonlar *						İmmunohistokimya **					
		Karaciğer		Akciğer		Dalak	Böbrek	Kalp	Karaciğer	Akciğer	Dalak	Böbrek	Kalp
		PPLI	HD	BIP									
1	+	+	+	+++	-	+	-	-	+++	-	-	-	
2	+	-	-	+++	++	++	-	-	+++	+++	-	-	
3	+	+	-	+++	++	++	-	+++	+++	+++	++	++	
4	+	+	+	+++	ND	++	+	-	+	ND	-	-	
5	+	+	+	+	ND	++	+	-	+	ND	-	-	
6	+	+	-	++	++	++	+	-	+++	++	-	-	
7	+	+	-	++	ND	+++	++	-	+++	ND	-	-	
8	+	+	+	++	++	ND	+	-	+	+++	ND	-	
9	+	ND	ND	+++	ND	ND	ND	ND	+++	ND	ND	ND	
<b>Toplam (%)</b>	<b>10/10</b>	<b>8/9</b>	<b>4/8</b>	<b>10/10</b>	<b>4/5</b>	<b>8/8</b>	<b>5/8</b>	<b>1/8</b>	<b>9/9</b>	<b>4/5</b>	<b>1/7</b>	<b>1/8</b>	
	100	88	50	100	80	100	63	13	100	80	14	13	

\* - Lezyon yok, + hafif, ++ orta, +++ şiddetli, \*\* Antijen miktarı; - negatif, + hafif, ++ orta, +++ yoğun ND- Yapılmadı,

PPLI- Periportal lökosit infiltrasyonu, HD- Hidropik dejenerasyon, BIP- Bronkointerstisyel pnömoni, KC- Karaciğer, AC- Akciğer

deskuamasyon, nekrotik hücre kalıntıları, makrofaj ve nötrofil infiltrasyonları belirlendi. Küçük çaplı havayollarının makrofaj ve hücreyel döküntüler sonucu tıkanıp görüldü. Diğer mikroskobik bulgular arasında makrofaj ve nötrofillerin perivasküler birikimi bulunmaktaydı. Ayrıca, interlobuler septal dokuda nötrofil lökositler ile makrofajlardan oluşan yangısal infiltrasyon ve ödem sonucu genişleme dikkati çekti. Diğer enfekte fötusların havayollarında ise orta şiddette makrofaj ve nötrofil infiltrasyonu ile birlikte alveol duvarlarında hafiften ortaya kadar değişebilen derecelerde kalınlaşma tespit edildi. Etkilenen fötuslarda, sıklıkla, bitişik lobulus ya da tüm akciğer lobunu etkileyen diffuz yangısal reaksiyon görüldü.

İncelenen fötusların hepsinde hepatik lezyonların bulunduğu görüldü. Tüm olgularda portal bölgelerde, damarlar ve safra kanalları etrafında mononükleer hücrelerden oluşan çok hafif bir yangısal hücre infiltrasyonunun bulunduğu görüldü. Yalnızca bir olguda mono-

**Tablo 4.** Diğer fetal organlardaki histopatolojik ve immunohistokimyasal inceleme sonuçları

**Table 4.** Histopathological and immunohistochemical investigation results of the other fetal organs

Fötüs no.	Histopatolojik lezyonlar *					İmmunohistokimya **				
	B	BLN	T	SI	A	B	BLN	T	SI	A
1	-	ND	ND	+	ND	-	ND	ND	++	ND
2	+++	++	+	ND	ND	+++	++	-	++	ND
3	ND	ND	ND	ND	++	ND	ND	ND	ND	+++
4	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	+	+	++	ND	ND	-	+	++
6	+	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND
7	+	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND
<b>Toplam (%)</b>	<b>4/5</b>	<b>1/1</b>	<b>2/2</b>	<b>2/2</b>	<b>2/2</b>	<b>3/5</b>	<b>1/1</b>	<b>0/2</b>	<b>3/3</b>	<b>2/2</b>
	100	100	100	100	100	60	100	0	100	100

\* - Lezyon yok; + hafif; ++ orta; +++ şiddetli

\*\* Antijen miktarı; - negatif; + hafif; ++ orta; +++ yoğun

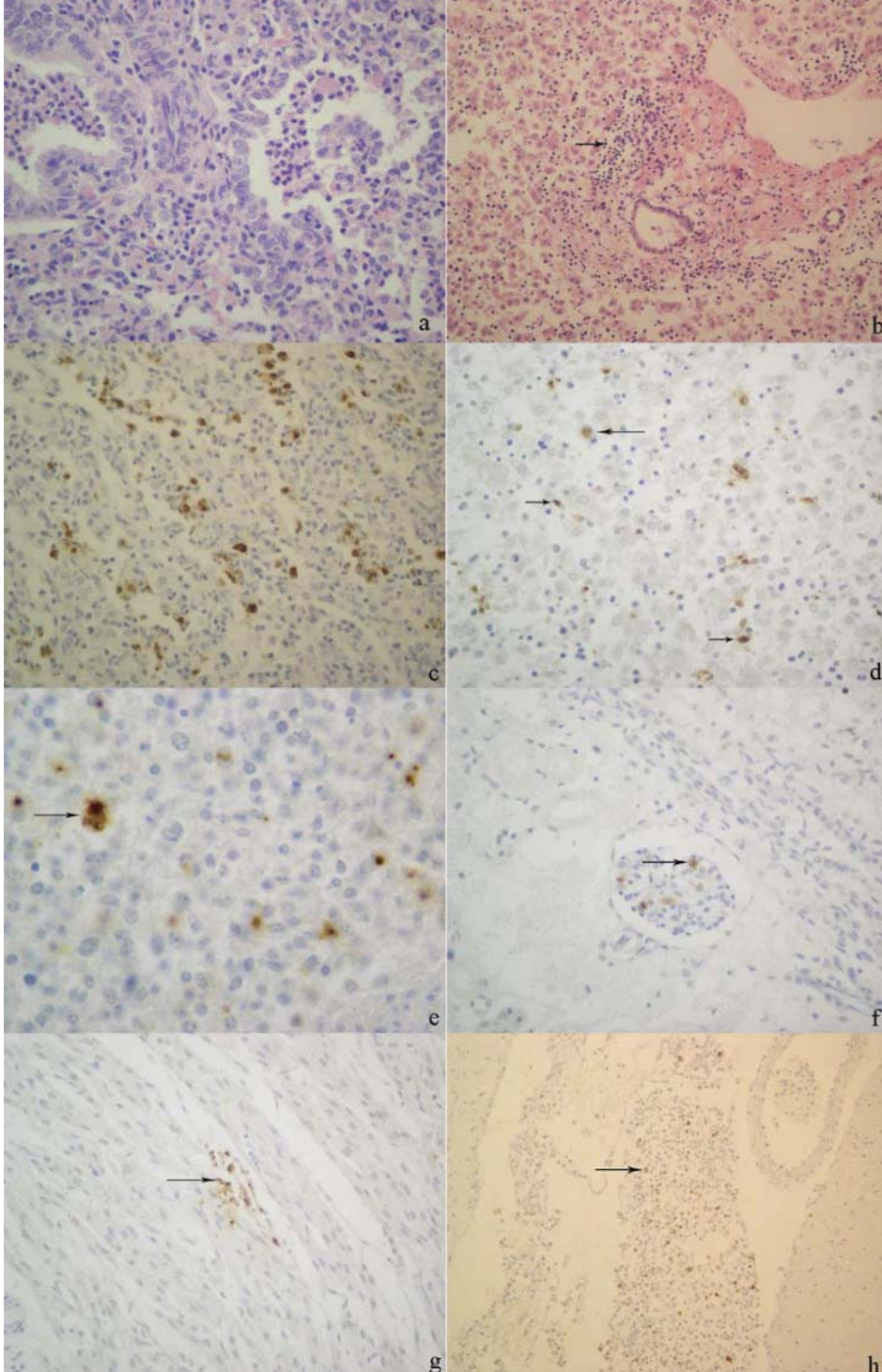
ND- Yapılmadı, B-Beyin, BLN- Bronşiyal lenf düğümü, T- Timus, SI- İnce bağırsak, A- Abomazum

dört fötusta tespit edilen başlıca bulgular arasında beyaz pulpadaki lenfositik odaklarda küçülme, kırmızı pulpada görülen mononükleer infiltrasyon ve sinusoidlerde dilatasyon bulunmaktaydı. Bir fötusta ise intra ve subkap-süler mononükleer lökosit infiltrasyonu görüldü.

Etkilenen fötusların böbreklerinde yaygın konjesyon, hemoraji ve ödem, glomerular kapiller tuftlarda ise dilatasyon ve hiperemi görüldü. Ayrıca, tubuluslarda yaygın dejenerasyon ve nekroz tespit edildi. Yalnızca bir

olguda medullar bölgede mononükleer yangısal hücre infiltrasyonu görüldü.

Kalpde genelde bir lezyon şekillenmediği ya da lezyonların oldukça sınırlı olduğu ve bunlarında perivas-küler ve interfibriller mononükleer lökosit infiltrasyonuna eşlik eden az sayıdaki nötrofillerle karakterize olduğu tespit edildi. Ayrıca, ödemin myokardiyal kas demetleri arasında yaygın bir şekilde olduğu dikkati çekti.



**Şekil 1.** a- Akciğer bronşiyol lumenlerinde nötrofil lökosit ve alveolar makrofaj infiltrasyonu, Fötüs no. 1, HEx200, b- Portal bölgede eritropoiezis (ok). Karaciğer parankimindeki Remark kordonlarında bozulma ve dissiyie hepatositler, Fötüs no. 3, HEx200, c- Föetal akciğerlerdeki alveol epitel hücrelerinde ve makrofajlarda Brucella-spesifik antijenik boyanma, Fötüs no. 1, ABCx400, d- Föetal karaciğer hepatosit (uzun ok) ve Kupffer hücrelerinde (kısa oklar) Brucella-spesifik intrasitoplazmik boyanma, Fötüs no. 3, ABCx400, e- Föetal dalakta, kırmızı pulpada bulunan fagositlerde Brucella-spesifik antijenik boyanma (ok), Fötüs no. 8, ABCx1.000, f- Föetal böbrek glomerulus epitel hücre sitoplazmalarında Brucella-spesifik antijenik boyanma, Fötüs no. 3, ABCx400, g- Myokardiyal kas demetlerinde Brucella-spesifik antijenik boyanma (ok), Fötüs no. 3, ABCx400, h- Beyin lateral ventrikuluslarındaki yangısal infiltrasyonda bulunan mononükleer hücre sitoplazmalarında Brucella-spesifik antijenler (ok), Fötüs no. 2, ABCx200

**Fig 1.** a- Neutrophil leucocyte and macrophages in the lung bronchial lumens, Fetus no. 1. HEx200, b- Erythropoiesis in the portal area (arrow). Dissociated hepatocytes in the liver parenchyma, Fetus no. 3, HEx200, c- Brucella specific intracytoplasmic reaction are present in the alveolar epithelial cells and macrophages, Fetus no. 1, ABCx400, d- Brucella specific intracytoplasmic reaction are seen in the fetal liver hepatocytes (long arrow) and Kupffer cells (short arrows), Fetus no. 3, ABCx400, e- Phagocytes in the red pulp of spleen are positive for Brucella (arrow), Fetus no. 8, ABCx1.000, f- Brucella specific intracytoplasmic staining are seen in the fetal kidney glomerular epithelial cells, Fetus no. 3, ABCx400, g- Brucella positive reaction are present in the myocardial muscle cells (arrow), Fetus no. 3, ABCx400, h- Mononuclear cells in the cerebral ventricles are positive for the Brucella polyclonal anti-body (arrow), Fetus no. 2, ABCx200

İncelenen beş koyun fötüsünün dördünde granülatöz meninjitisi görüldü. Meninjitisi fötüslerde başlıca lenfosit ve makrofajlar ve buna eşlik eden eşit miktarda nötrofillerden oluşan sellüler bir infiltrasyon bulunduğu tespit edildi. Etkilenen alanlardaki yangı hücreleri genelde arter ve venüllerin etrafını çevreleyen bir tarzdaydı. Yangının olduğu sahalardaki koroid pleksuslarda çoğunlukla damar lumenlerinde olmak üzere belirgin nötrofil infiltrasyonuna eşlik eden makrofaj ve lenfositler şeklinde olduğu görüldü.

İncelenen tek fötüsün bronşiyal lenf nodülünde meduller sinusların, infiltre olan nötrofil ve makrofajlar nedeni ile genişlediği görüldü. İncelenen timuslarda hafif bir konjesyon dışında herhangi bir lezyon tespit edilmedi. Abomazum ve ince bağırsakların lamina propriyalarında hafiften orta dereceye kadar değişen makrofaj ve lenfositlere eşlik eden az sayıda nötrofil infiltrasyonu belirlendi. Ayrıca, bağırsak ve abomazum serozalarının da şekillenen ödem nedeni ile genişledikleri görüldü. Genişleyen serozada nötrofil lökositler ile makrofajlara eşlik eden sınırlı miktarda lenfosit infiltrasyonu tespit edildi.

### İmmunohistokimyasal Bulgular

#### - Brucella Spesifik Antijen Tespiti

İmmunohistokimyasal ve bakteriyolojik analiz sonuçları toplu olarak **Tablo 3** ve **4**'te sunuldu. Brucella spesifik boyanma incelenen dokuz fötüsün akciğerlerinde görüldü. Fötüslerin diğer doku ve organlarında ise daha sınırlı miktarda antijen spesifik reaksiyon tespit edildi.

Brucella spesifik reaksiyon kahverengi ve küçük granüller şeklinde olmak üzere başlıca eksudatlardaki makrofaj ve nötrofillerin sitoplazmalarında tespit edildi. Makrofajların sitoplazmalarının koyu boyanmış, amorf görünüşteki antijen ile dolu oldukları görüldü (**Şekil 1c**). Alveol ve bronşiyollerde bulunan sellüler debride de yoğun bir reaksiyon tespit edildi. Genel olarak yangısal odaklardaki hücrelerde, izole makrofaj ve nötrofillere göre daha yoğun bir reaksiyon mevcuttu.

Karaciğerdeki immunolojik reaksiyon yalnızca 3 no'lu olguda tespit edildi. Hücre içinde lokalize olduğu tespit edilen antijenin hepatosit ve Kupffer hücrelerinin sitoplazmalarını doldurduğu ve çekirdeğin genellikle antijenik reaksiyon tarafından örtüldüğü tespit edildi (**Şekil 1d**). Ayrıca, serbest antijenin sinusoidlerde de bulunduğu görüldü. Safra kanalı epitellerinde herhangi bir reaksiyon tespit edilmedi.

Brucella spesifik antijen incelenen beş olgunun dördünde dalak sinusoidleri ile kırmızı pulpasındaki histiyositler ve makrofajların sitoplazmalarında (**Şekil 1e**), ayrıca serbest halde görüldü. Böbreklerde antijenik reaksiyon

yalnızca 3. no'lu olguda görüldü. Brucella spesifik reaksiyon korteks ve medullada fokal alanlar halinde ya da kortikal bölgede bulunan glomerulus (**Şekil 1f**) ve tubulus epitellerinin sitoplazmalarında saptandı. Kalpte antijenik reaksiyona yalnızca bir olguda rastlandı. Brucella spesifik reaksiyonun yer yer, fokal alanlar halinde myokardiyal fibriller hücre sitoplazmalarında (**Şekil 1g**) bulunduğu tespit edildi. İncelenen beş koyun fötüs beyininin üçünde Brucella spesifik reaksiyonun başlıca damar lumenleri ile lateral ventrikuluslardaki yangısal infiltrasyonda bulunan mononükleer hücrelerin sitoplazmalarında (**Şekil 1h**) bulunduğu görüldü. Brucella spesifik antijen reaksiyonu incelenen iki abomazum (**Şekil 2a**) ve üç ince bağırsağın serozalarında bulunan yangısal infiltrasyondaki fagositlerin sitoplazmalarında görüldü. Ayrıca, ince bağırsaklarda lamina propriyadaki epitel hücreleri ve yangısal hücrelerde de pozitif reaksiyonun bulunduğu dikkati çekti.

**Tablo 5.** Fötüs parankim organlarında yapılan CD3 ve λ-Ig immunohistokimyasal boyama analiz sonuçları

**Table 5.** CD3 and λ-Ig immunohistochemical staining analysis results of fetal parenchymal organs

Fötüs no.	CD3 *					λ-Ig *				
	KC	AC	D	B	K	KC	AC	D	B	K
1	+	++	+++	-	-	-	-	++	-	-
2	-	+	+++	-	-	-	ND	+	-	-
3	+	+	+++	+	+	-	-	++	-	-
4	-	+	ND	+	-	-	-	ND	-	-
5	-	+	ND	+	-	-	-	ND	-	-
6	+	-	++	-	-	-	-	+	-	-
7	ND	+	ND	+	-	-	+	ND	-	-
8	-	+++	+++	-	-	-	-	+	-	-
9	ND	+++	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND
<b>Toplam (%)</b>	<b>3/7</b>	<b>8/9</b>	<b>5/5</b>	<b>4/8</b>	<b>1/8</b>	<b>0/8</b>	<b>2/8</b>	<b>5/5</b>	<b>0/8</b>	<b>0/8</b>
	43	89	100	50	13	0	25	100	0	0

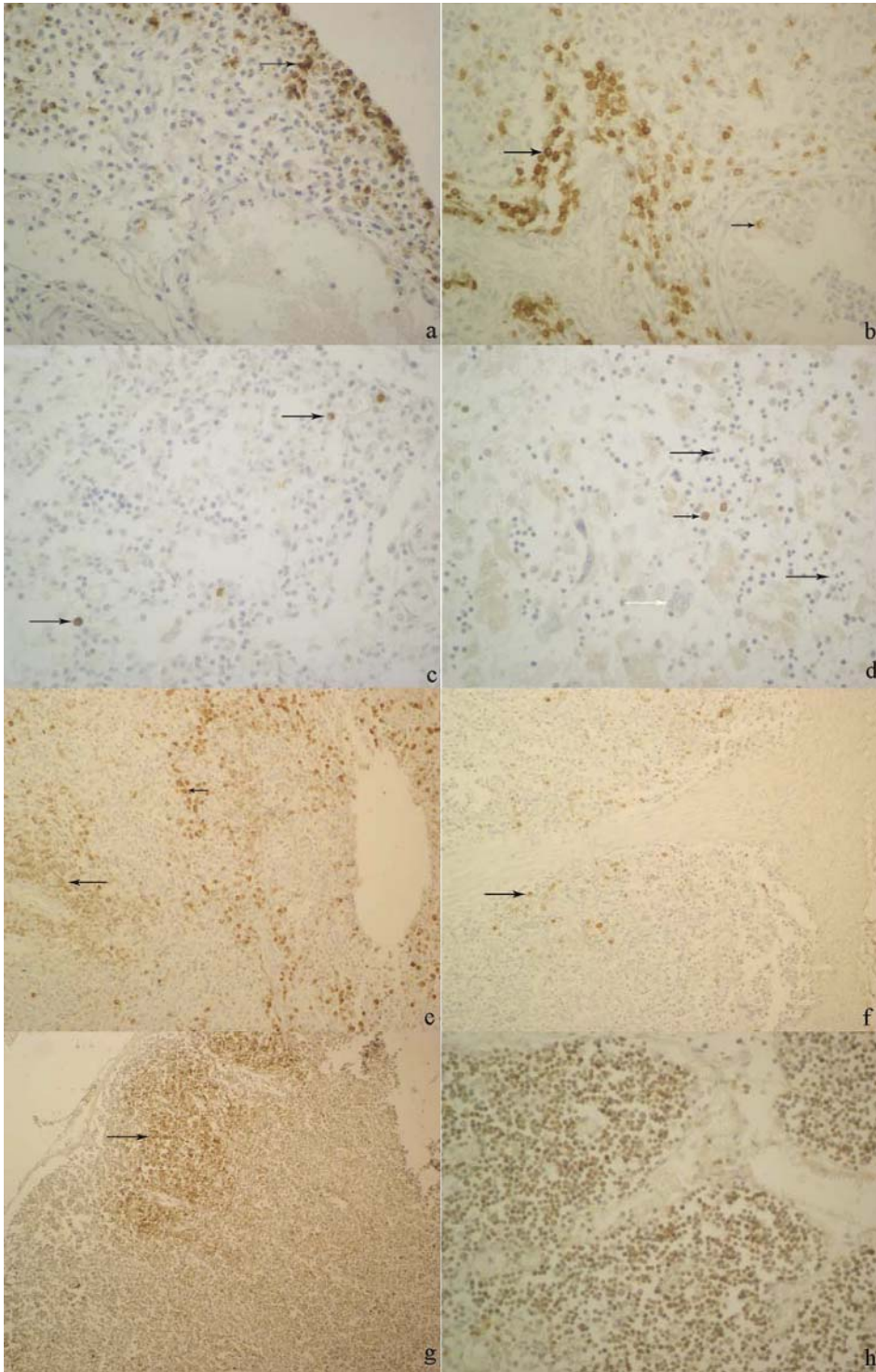
\* İmmunohistokimyasal reaksiyon skoru: - : negatif; + : hafif; ++ : orta; +++ : yoğun, **ND**: Yapılmadı; **B**: Böbrek; **D**: Dalak; **K**: Kalp; **KC**: Karaciğer; **AC**: Akciğer

**Tablo 6.** Diğer fetal organlardaki CD3 ve λ-Ig immunohistokimyasal boyama analiz sonuçları

**Table 6.** CD3 and λ-Ig immunohistochemical staining analysis results of other fetal organs

Fötüs no.	CD3 *					λ-Ig *				
	B	BLN	T	SI	A	B	BLN	T	SI	A
1	-	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND
2	++	+++	+++	ND	ND	-	+	-	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	-	-
4	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	++	+	ND	ND	ND	-	-	-
6	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	+
<b>Toplam (%)</b>	<b>3/4</b>	<b>1/1</b>	<b>2/2</b>	<b>1/1</b>	<b>2/2</b>	<b>0/4</b>	<b>1/1</b>	<b>0/2</b>	<b>0/2</b>	<b>1/3</b>
	75	100	100	100	100	0	100	0	0	33

\* İmmunohistokimyasal reaksiyon skoru: - : negatif; + : hafif; ++ : orta; +++ : yoğun, **ND**: Yapılmadı; **B**: Beyin; **BLN**: Bronşiyal lenf düğümü; **T**: Timus; **SI**: İnce bağırsak; **A**: Abomazum



**Şekil 2.** a- Abomazum serozasında bulunan yangısal infiltrasyonda tespit edilen yoğun *Brucella* spesifik boyanma (ok), Fötüs no. 5, ABCx400, b- Föetal akciğerlerdeki damarlar etrafında bulunan lenfositlerde CD3<sup>+</sup> reaksiyon (uzun ok). Bronşiyol epitelinde göç eden CD3<sup>+</sup> T lenfositler (kısa ok), Fötüs no. 9, ABCx400, c- Akciğer alveollerindeki sınırlı sayıda hücrede λ-Ig<sup>+</sup> boyanma (oklar), Fötüs no. 7, ABC x400, d- Karaciğer parankiminde bulunan az sayıda hücrede CD3<sup>+</sup> reaksiyon (kısa ok). Eritroid seriden hücreler (eritropoiezis) (uzun oklar) ile megakaryositler (beyaz ok) negatif, Fötüs no. 3, ABCx400, e- Sentral arteriyollerin etrafını kuşatan CD3<sup>+</sup> T lenfositlerde hafif reaksiyon (uzun ok). Dalak parankiminde bulunan diğer hücrelerde ise daha yoğun boyanma (kısa ok), Fötüs no. 1, ABC x200, f- Dalak subkapsüler bölgesi ile trabekül etrafında λ-Ig<sup>+</sup> hücreler (ok), Fötüs no. 1, ABCx200, g- Lenf düğümü kortikal bölgesinde CD3<sup>+</sup> T lenfositler (ok), Fötüs no. 2, ABCx100, h- Timusda yaygın CD3<sup>+</sup> T lenfositler, Fötüs no. 2, ABCx400

**Fig 2.** a- Inflammatory cells present in the abomasum serosa are intensely stained for the *Brucella* antigens (arrow), Fetus no. 5, ABCx400, b- CD3<sup>+</sup> lymphocytes surrounding fetal lung vessels (long arrow). CD3<sup>+</sup> T lymphocytes migrating through bronchial epithelial cells (short arrow), Fetus no. 9, ABCx400, c- A few cells in the lungs are positive for λ-Ig (arrows), Fetus no. 7, ABCx400, d- Limited number of CD3<sup>+</sup> cells are seen in the liver parenchyma (short arrow). Erythroid cells (erythropoiesis) (long arrow) and megakaryocytes (white arrow) are negative, Fetus no. 3, ABCx400, e- CD3<sup>+</sup> T lymphocytes surrounding central arterioles are weakly positive (long arrow). Other cells present in the spleen parenchyma are intensely stained (short arrow), Fetus no. 1, ABCx200, f- λ-Ig<sup>+</sup> cells are present in the splenic subcapsular area and trabecules (arrow), Fetus no. 1, ABCx200, g- CD3<sup>+</sup> T lymphocytes are seen in the cortical area of a lymph node (arrow), Fetus no. 2, ABCx100, h- CD3<sup>+</sup> T lymphocytes in the thymus, Fetus no. 2, ABCx400

#### - CD3, λ-Ig İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçları

CD3 ve λ-Ig ile yapılan immunohistokimyasal boyama ve inceleme sonuçları *Tablo 5* ve *6*'da sunuldu. Enfekte akciğer damarları ile alveollerdeki yangısal infiltrasyon içinde, akciğer interstisyumunda, bronşiyol epitelyumundan geçerek göç eden lenfositlerde, ayrıca bronş etrafındaki lenf folliküllerinde çok sayıda CD3<sup>+</sup> T lenfo-

sitlerin bulunduğu görüldü (*Şekil 2b*). Normal akciğerlerde T hücrelerinin yalnızca peribronşiyoler folliküler hücrelerde bulunduğu tespit edildi. Yalnızca 7 ile 9 no'lu olgularda akciğer alveollerindeki sınırlı sayıda hücrede λ-Ig<sup>+</sup> reaksiyon tespit edildi (*Şekil 2c*).

Karaciğer parankiminde, Kiernan aralıklarında ve vena sentralis etrafındaki az sayıda küçük lenfositik yapı-

daki hücrelerin CD3<sup>+</sup> olduğu görüldü (*Şekil 2d*).

Dalak sentral arteriyollerin etrafındaki lenfositlerin yanısıra bunların hemen etrafındaki hücreler ile subkapsüler bölgede, ayrıca beyaz pulpada ve trabeküllerin etrafında yoğun bir CD3<sup>+</sup> T lenfositik reaktivite dikkati çekti (*Şekil 2e*). λ-Ig<sup>+</sup> hücreler ise özellikle beyaz pulpada ve subkapsüler bölgelerde görüldü (*Şekil 2f*).

Böbrek kortikal bölgelerinde bulunan glomerulus epitel hücreleri arası ile kortikal ve medullar bölgedeki interstisyel alanda bulunan hücrelerde CD3<sup>+</sup> reaksiyon saptandı.

Kalpte yapılan immunohistokimyasal boyamalarda yalnızca 3 no'lu olguda, interstisyumda sınırlı sayıda CD3<sup>+</sup> T lenfositler tespit edildi.

Meninjitisin hafif olduğu durumlarda meningeal damarların lumenlerindeki az sayıda lenfositik yapıda hücrenin CD3<sup>+</sup> olduğu görüldü. Beyin stromasında CD3<sup>+</sup> hücre belirlenmedi. Diğer yandan şiddetli meninjitis olgularında ise özellikle koroid pleksuslarda şekillenen yangısal infiltrasyonun belirgin olduğu sahalarda ve damar lumenlerinde bulunan lenfositik yapıdaki hücrelerde belirgin bir CD3<sup>+</sup> reaksiyonunun bulunduğu görüldü.

Bronşiyal lenf nodüllerinin kortikal ve parakortikal bölgelerinde yoğun, medullar sinuslarda ise daha sınırlı bir CD3<sup>+</sup> reaksiyonu görüldü (*Şekil 2g*). Yine, Brucella enfeksiyonunun nispeten şiddetli olduğu olgularda ise özellikle parakortikal bölgedeki diffuz lenfatik dokuda belirgin bir reaksiyon dikkati çekti.

Lenf nodüllerinin kortikal bölgeleri ile medullar sinuslar ile medullar kordlardaki oldukça az sayıdaki hücrede λ-Ig<sup>+</sup> reaksiyon tespit edildi.

Timusun kortikal ve medullar alanlarında CD3<sup>+</sup> T lenfositlerin diffuz olarak bulunduğu tespit edildi (*Şekil 2h*).

İnce bağırsakların lamina propriyasında bulunan lenf folliküllerinde sınırlı sayıda lenfositin CD3<sup>+</sup> olduğu belirlendi. Ayrıca, villus epitel hücreleri arasında az sayıda CD3<sup>+</sup> T lenfositler ile λ-Ig<sup>+</sup> hücreler saptandı.

Abomazum lamina propriya ve submukozasındaki az sayıda lenfositte CD3<sup>+</sup> reaksiyon tespit edildi. Yalnızca 7 no'lu olguda λ-Ig<sup>+</sup> hücreler tespit edilebildi.

### **Bakteriyolojik Bulgular**

Bakteriyolojik incelemeleri yapılan 28 fötusun 15'inden alınan doku örnekleri ile abomazum içeriklerinden yapılan ekimler sonucu besi yerlerinde gelişen kültürler, koloni morfolojileri ve mikroskopik özelliklerine göre *B.*

*melitensis* izole edildi (*Tablo 3*). Bakteriyolojik incelemeleri yapılan diğer fötuslardan birinden *E. coli*, diğerinden ise *Staphylococcus spp.* izole ve identifiye edildi. Fötusların 11'inden herhangi bir etken izole edilemedi.

## **TARTIŞMA ve SONUÇ**

Bu çalışmada, *B. melitensis* pozitif koyun fötuslarında şekillenen histopatolojik bulgular koyun <sup>21,22</sup>, sığır <sup>1,23,24</sup> ve bizonlarda <sup>25</sup> doğal ya da deneysel olarak oluşturulan enfeksiyonlara ait bildirilen bulgularla benzerdi. Diğer yandan anormal abomazum içeriği, fibrinöz plöritis, vaskulitis ve menenjit gibi lezyonlar ise sığırlarda olduğu gibi <sup>29</sup> koyunlarda da az görülmektedir <sup>21,22</sup>. *B. melitensis* ile enfekte koyun fötuslarının vücut boşluklarında ve kaslarda serohemorajik lezyonlar ve pnömoni gibi bir seri patolojik değişiklikler meydana geldiği bildirilmiştir <sup>8,22,26-28</sup>.

Pnömoni atık fötuslarda en sık şekillenen lezyon olup *Brucella* enfeksiyonları için diagnostik olarak kabul edilmektedir <sup>1,24,30,31</sup>. Bu çalışmada, *B. melitensis* ile enfekte koyun fötuslarında en sık gözlenen lezyon diğer çalışmalarda bildirildiği gibi bronkopnömoni ve interstisyel pnömoniydi <sup>8,22,26-28</sup>. Benzer tip lezyonlar sığır fötuslarında da bildirilmiştir <sup>24,30,31</sup>. Diğer çalışmalarda bildirilen bronşiyal nekrozis <sup>24,30</sup> ve yangısal infiltrasyonda görülen çok çekirdekli dev hücreleri <sup>1,26</sup> gibi lezyonlar bu çalışmada tespit edilemedi. Diğer yandan, fötusların, nadiren akciğerlerinde olmak üzere özellikle karaciğer ile dalaklarında normal bir özellik olan ve yaygın olarak bulunabilen hematopoietik odaklar ile bu odaklarda dev hücrelerine benzer özellikler taşıyan megakaryositler ve megakaryoblastlar dikkati çekti. Bu çalışmada, fötuslarda önemli bir bulaşma yolu olarak nitelenen aspire edilmiş amniyotik sıvı görülmedi <sup>30</sup>. Fakat, enfekte fötusların akciğerlerinde interlobuler septal ödem ve yangısal hücre infiltrasyonu gibi lezyonlar sıklıkla tespit edildi. Diğer yandan, *B. suis*'in yol açtığı enfeksiyon ile *Brucella spp.*'lerin yol açtıkları diğer enfeksiyonlar karşılaştırıldığında *B. suis*'in hedef organlarda daha yüksek bir oranda apse oluşturduğu bildirilmiştir <sup>32</sup>. *Brucella* enfeksiyonu sonucu gelişen yangısal yanıtlarda tespit edilen farklılıkların değişik *Brucella spp.*'lerden kaynaklanabilmesi bu çalışma ile diğer çalışmalarda tespit edilen lezyon farklılıklarına kaynak oluşturabileceği sonucuna varıldı. Diğer yandan, perivasküler yangı hücrelerinin ilk olarak interlobuler septada lokalizasyonu ve bu safhada, koyun fötuslarındaki hava yolları ve potansiyel hava boşluklarının normal olması koyunlarda da enfeksiyonun sığırlardakine benzer bir şekilde yayıldıklarını gösterir nitelikteydi <sup>1</sup>.

İnsan <sup>33</sup> ve hayvanlarda <sup>34</sup> kronik brusellozis sonucu oluşan patolojik bulgular arasında hepatitis de bulun-



maktadır. Yapılan bu çalışmada da karaciğer ve dalakta görülen lezyonlar arasında yaygın retiküloendotelial hipertrofi ile buna eşlik eden sınırlı bir periportal ve sinusoidal mononükleer lökosit infiltrasyonu bulunmaktaydı. Tespit edilen bu lezyonların koyun <sup>8,22,26-28</sup> ve sığırlarda <sup>1,24</sup> görülenler ile benzerlikler taşıdığı görüldü.

Bu çalışmada dalak arterlerinin etrafında hafiften orta şiddete kadar değişebilen lenfositik hiperplazi tespit edilmesine rağmen keçilerde <sup>35</sup> ve koyunlarda <sup>22</sup> olduğu gibi fokal nekroza rastlanmadı. Diğer yandan, sığır fötüslerinde bahsi geçen lezyonlar bildirilmiştir <sup>29</sup>. Timuslarda görülen kortikal lenfositlerdeki küçülme sığır fötüslerinde bildirilmesine rağmen <sup>36</sup> koyunlarda bu tip bir lezyon bildirilmemiştir <sup>22</sup>. Benzer bir şekilde bu çalışmada da incelenen timuslarda böyle bir bulguya rastlanmadı. Bununla birlikte, timik kortikal küçülme yalnız Brucellaya özgü olmayıp diğer konjenital sığır enfeksiyonlarında da bildirilmiştir <sup>37</sup>. Diğer yandan, *B. abortus* ile enfekte koyun fötüslerinin timuslarında perivasküler mast hücreleri ile eozinofil infiltrasyonları bildirilmiştir <sup>21</sup>. Bu çalışmada lenf düğümleri, beyin, kalp, böbrek ve ince barsaklarda kaydedilen bulguların diğer çalışmalarla <sup>8,22,26-28</sup> paralel nitelikler taşıdığı tespit edildi.

Enfekte koyunlarda *Brucella* antijeninin immunohistokimyasal yöntem ile tespitinde yüksek oranda spesifite ve sensitivite bildirilmiştir <sup>22,28</sup>. Sığır <sup>24,38</sup> ve koyunlarda <sup>22,28</sup> yapılan benzer nitelikteki diğer çalışmaların da, bu araştırmada elde edilen verileri destekler nitelikler taşıdığı belirlendi. Bu çalışmada anti-*B. abortus* serumu için spesifik granüler immunohistokimyasal boyanmanın başlıca makrofajların sitoplazmasında olmak üzere nötrofillerde, hepatositlerde, kalp kası hücrelerinde, böbrek tubulus epitellerinde ve hücresele döküntülerde bulunduğu tespit edildi. Antijenik reaksiyonun özellikle yağışal odaklardaki hücrelerde yoğunlaştığı kaydedildi. Diğer yandan, bazı izole yangı hücrelerindeki reaksiyonun zayıf ya da negatif olduğu dikkati çekti.

Yapılan diğer çalışmalara benzer şekilde bu çalışmada da akciğerlerin enfekte fötüslerde en fazla etkilenen organ olduğu tespit edildi. Ayrıca, bu çalışmada incelenen enfekte fötüslerin, bildirilen diğer doğal *Brucella* enfeksiyonlarına <sup>22,24,28</sup> benzer şekilde, dalak, kalp, böbrek ve karaciğerlerindeki yangışal odaklarda akciğerlere göre daha düşük seviyelerde *Brucella* anijeni tespit edildi. Bu bulgunun sebepleri arasında *Brucella* antijeninin immunohistokimyasal yöntemlerle tespit edilebilecek eşik seviyesinin altında olması ya da organlarda düşük sayıda olan bakterilerin hızlı bir şekilde uzaklaştırılması sayılabilir <sup>24,38</sup>. Periton makrofajlarının *in vitro* olarak kullanıldığı bir çalışmada bunların *B. melitensis* ile inokulasyonlarından 48 saat sonra hücre duvarlarının parçalandığı ve bakterilerin eksternal medyum içinde serbest kaldığı gösteril-

miştir <sup>39</sup>. Bu çalışmadaki aborte fötüslerin organlarında tespit edilen antijen düzeylerindeki farklılıkların nedenleri arasında bu bulgu da sayılabilir. Ayrıca, bakteriyel antijenin organlara göre dağılımında tespit edilen farklılıklarının nedenleri arasında bölgesel immun yanıt derecesinin de bulunabileceği dikkate alınmalıdır.

Yapılan bir çalışmada *B. abortus* izole edilen 14 keçi fötüsünün yalnızca dokuzunda immunohistokimyasal yöntem pozitif sonuç vererek bakteriyel kültürün immunohistokimyasal yöntemden daha duyarlı olduğu gösterilmiştir <sup>38</sup>. ABC immunohistokimyasal yöntemi kullanılarak pozitif sonuç elde edilebilmesi için bir gram dokudaki gerekli olan en az *B. abortus* bakteri sayısının  $10^6$  olduğu bildirilmiştir <sup>38</sup>. Bununla birlikte, yapılan diğer bir çalışmada duyarlılık açısından immunohistokimyasal yöntem ile bakteriyel kültür arasında herhangi bir fark tespit edilmemiştir <sup>24</sup>. Bu çalışmada bakteriyolojik kültür ile immunohistokimyasal yöntem arasında spesifite ve sensitivite bakımından bir farklılık tespit edilmedi. *Brucella* antikorlarının serolojik olarak koyunlarda tespiti brusellozisin teşhisinde en duyarlı metod olarak nitelendirilmektedir, çünkü annelerde *Brucella* karşı antikorlar olmasına ve fötüslerde enfeksiyon oluşmamasına rağmen şekillenen plasentitis fötüste herhangi bir enfeksiyona yol açmadan abortusa neden olabilmektedir.

*B. abortus* gibi hücre içi organizmalara karşı şekillenen yanıtta T-hücre-aracılı hücresele bağışıklığın büyük önem taşıdığı bilinmektedir <sup>40</sup>. RB-51 ile immunize edilen fare dalak T-hücrelerinin *Brucella* ile enfekte olan makrofajları lize ettikleri gösterilmiştir <sup>17</sup>. Ayrıca, IFN- $\gamma$ 'nın büyük bir kısmının CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T hücreler tarafından salgılandığı bildirilmiştir <sup>17</sup>.

Rev-1 ile intrakonjunktival olarak aşılanan koç lenf düğümlerinde belirlenen T-hücre hiperplazisinin deri altı yol ile aşılanan hayvanlara göre daha fazla olduğu bildirilmiştir <sup>41</sup>. Yine, brusella ile enfekte keçilerin lenf düğümlerinde T-hücre hiperplazisinin şekillendiği bilinmektedir <sup>35,42</sup>. BALB/c farelere *Brucella* ribozomal geni ile yapılan aşılamalarda T-helper-1 hücresele yanıtı sonucu etkin bir sellüler ve humoral yanıtın geliştiği ve dalak lenfositlerinin yüksek miktarda interferon gamma ürettiği bildirilmiştir <sup>40</sup>.

Fötal kuzuların ise bakteriyel antijenlere karşı gebeliğin 93-137. günleri arasında hücresele immun yanıt verdikleri bildirilmiştir <sup>43</sup>. Fötal kuzular ile erişkin koçlarda *B. ovis* için gelişen hücresele yanıtın zamanlaması bakımından bir fark olmadığı bildirilmiştir <sup>44</sup>. Benzer bir şekilde *B. ovis* ile enfekte edilen fötal kuzular ile 4-5 aylık kuzular arasında immun yeterlilik bakımından bir fark olmadığı görülmüştür <sup>43</sup>. Diğer yandan, geç fötal hayvanlar ile genç hayvanlar arasında immun yeterlilik bakımından

belirgin bir fark bildirilmemesine rağmen normal doğum tarihinden 13 gün önce doğan buzağuların Peyzer plaklarındaki T-lenfositlerin normal-term buzağulara göre daha az sayıda oldukları bildirilmiştir <sup>45</sup>.

Bu çalışmada Brucella enfeksiyonuna karşı gelişen lokal hücresel immün yanıt pan T-lenfosit belirteci olan CD3 ile belirlendi. CD3<sup>+</sup> T-lenfosit infiltrasyonları atık koyun fötüslerinin karaciğer, akciğer, dalak, böbrek, kalp, beyin, bronşiyal lenf düğümü, ince bağırsak ve abomazumda değişen yoğunluklarda tespit edildi. Özellikle fetal akciğerler ile karaciğer, böbrek, kalp, beyin ve abomazum da tespit edilen CD3<sup>+</sup> T-lenfositler fötüslerde gelişen lokal hücresel yanıtı gösterir niteliktedir.

Koyun fötüslerinde B-lenfositler gebeliğin son 1/3 periyodunda hızla gelişmekte ve yayılmakta ve B lenfosit gelişimi dalaktan Peyzer plaklarına yönelmektedir <sup>46</sup>. Son yıllarda yapılan bir çalışmada 5-9 aylık buzağı fötüslerindeki ileal ve jejunal peyer plaklarında IgM<sup>+</sup> hücrelerin yoğun olmasına karşın sınırlı miktarda CD3<sup>+</sup> ve IgG<sup>+</sup> hücreler tespit edilmiştir <sup>47</sup>. Bu çalışmada atık koyun fötüslerinde şekillenen humoral yanıtın oldukça sınırlı olduğu dikkati çekti. Fötüslerde gelişen lokal humoral immün yanıtın dalak ve lenf düğümleri dışında yalnızca iki fetal akciğer ile bir fötüs abomazumunda tespit edilebilen az sayıdaki λ-Ig<sup>+</sup> hücreler ile sınırlı olduğu görüldü. Bu bulgular Yasuda ve ark.<sup>47</sup> elde ettikleri bulguları destekler niteliktedir. Diğer yandan, genç ve erişkin hayvanlarda hücre içi bakterilere karşı gelişen reaksiyon daha farklı şekilde gelişmektedir. *Mycobacterium bovis* ve *B. abortus*'a karşı kombine DNA aşısı ile aşıl原因an buzağılarda antijen-spesifik IgG düzeylerinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir <sup>48</sup>. Ayrıca, *B. melitensis* ile enfekte edilen koyunların lokal, periferik ve mezenterik lenf düğümlerinde IgG<sup>+</sup> hücre sayısının önemli miktarda arttığı gösterilmiştir <sup>49</sup>.

Sonuç olarak, bakteriyoloji ve serolojinin mümkün olmadığı, materyalin formaldehidde tespit edildiği ya da bakteriyolojik kültürün negatif olduğu şüpheli durumlarda Brucella etkenlerinin immunohistokimyasal olarak belirlenmesi bu yöntemin tamamlayıcı teşhis metodu olarak kullanılabileceğini göstermesi bakımından önem taşımaktadır. Ayrıca, bu çalışma ile koyun fötüslerinde meydana gelen abortusların yalnızca annede gelişen plasentitis nedeni ile değil aynı zamanda brusellozise karşı oluşan sınırlı humoral ve hücresel yanıt nedeni ile gelişebileceği belirlenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Enright FM, Walker JV, Jeffers G, Deyoe BL: Cellular and humoral responses of *Brucella abortus*-infected bovine fetuses. *Am J Vet Res*, 45, 424-430, 1984.
2. Corner LA, Alton GG, Iyer H: Distribution of *Brucella*

*abortus* in infected cattle. *Aust Vet J*, 64, 241-244, 1987.

3. Crawford RP: Animal brucellosis. In, Nielsen K, Duncan JR (Eds): *Animal Brucellosis*. 1st ed. pp. 131-151, CRC Press, Boca Raton, FL, 1990.
4. Milli ÜH: Dişi genital sistem. In, Hazıroğlu R, Milli ÜH (Eds): *Veteriner Patoloji*. II. Cilt. 1st ed. s. 477-483, Tamer Matbaacılık, Ankara, 1998.
5. Yazıcıoğlu O, Hazıroğlu R: Pathological and immunoperoxidase studies of the placental lesions of ovine brucellosis. *Israel J Vet Med*, 55, 2000.
6. İnci A, Aydın N, Babür C, Çam Y, Akdoğan C, Kuzan Ş: Kayseri yöresinde sığır ve koyunlarda Toksoplazmozis ve Brusellozis üzerine seroepidemiolojik araştırmalar. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg*, 30, 41-46, 1999.
7. Gürtürk K, Alan M, Boynukara B, Solmaz H: Van ve yöresinde koyun ve sığır Brucellozis'inin insidensi üzerinde sero-epidemiolojik araştırmalar. *YYÜ Vet Fak Derg*, 5, 121-125, 1994.
8. Kıran MM, Baysal T, Gözün H, Güler L, Gündüz K, Kuyucuoğlu Ö, Küçükayan U: Konya yöresinde koyun abortusları üzerinde patolojik, bakteriyolojik ve serolojik çalışmalar. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 9, 109-127, 1997.
9. Demiröz K, Çelik M, İyisan AS: Kars illinde brucellosis hastalığının sero epidemiyolojisi. I. *Ulusal Mikrobiyoloji Kongresi*, s. 48, 1994.
10. Şeyda T, Aydın F, Genç O, Güler MA, Baz E: Sığır serumlarında mikroaglutinasyon testi (MAT) ile *Brucella* antikorlarının araştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 3, 7-11, 1997.
11. Campero CM, Ladds PW, Hoffmann D, Duffield D, Watson D, Fordyce G: Immunopathology of experimental *Brucella abortus* strain 19 infection of the genitalia of bulls. *Vet Immunol Immunopathol*, 24, 235-246, 1990.
12. Hahn H, Kaufmann SHE: Cell-mediated immunity in bacterial infections. *Rev Infect Dis*, 3, 1221-1250, 1981.
13. Arda M: İmmün sistemin hücreleri. In, Arda M, Minbay A, Aydın N, Akay Ö, İzgür M, Diker S (Eds): *İmmunoloji*. s. 127-176, Medisan Yayınevi, Ankara, 1998.
14. Araya LN, Winter AJ: Comparative protection of mice against virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* by passive transfer of immune T cells or serum. *Infect Immun*, 58, 254-256, 1990.
15. Jiang X, CL Baldwin: Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. *Infect Immun*, 61, 124-134, 1993.
16. Oliveira SC, Splitter GA: CD8<sup>+</sup> Type I CD44hi CD45 Rblo T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice. *Eur J Immunol*, 25, 2551-2557, 1995.
17. He Y, Vemulapalli R, Zeytun A, Schurig GG: Induction of specific cytotoxic lymphocytes in mice vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Infect Immun*, 69, 5502-5508, 2001.
18. Walker RL: *Brucella*. In, Hirsh DC, Zee YC (Eds): *Veterinary Microbiology*, 2nd ed., pp. 105-116, Blackwell Science Inc, Oxford, England, 1999.
19. Surraud V, Jacques I, Olivier M, Guilloteau LA: Acute infection by conjunctival route with *Brucella melitensis* induces IgG<sup>+</sup> cells and IFN-gamma producing cells in peripheral and mucosal lymph nodes in sheep. *Microbes*

*Infect*, 10, 1370-1378, 2008.

**20. Hsu SM, Raine L, Fanger H:** Use of avidin- biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 9, 577-580, 1981.

**21. Gorham SL, Enright FM, Snider III TG, Roberts ED:** Morphologic lesions in *Brucella abortus* infected ovine fetuses. *Vet Pathol*, 23, 331-332, 1986.

**22. Yazıcıoğlu O:** Koyunlarda bruselloza bağlı abortuslarda fetal lezyonlar üzerinde patolojik ve immunoperoksidaz çalışmaları. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 44, 291-307, 1997.

**23. Palmer MV, Cheville NF, Jensen AE:** Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB51: Pathologic, bacteriologic and serologic findings. *Vet Pathol*, 33, 682-691, 1996.

**24. Pérez J, Quezada M, Lopez J, Casquet O, Sierra MA, Martín De Las Mulas J:** Immunohistochemical detection of *Brucella abortus* antigens in tissues from aborted bovine fetuses using commercially available polyclonal antibody. *J Vet Diagn Invest*, 10, 17-21, 1998.

**25. Rhyan JC, Gidlewski T, Roffe TJ, Aune K, Philo LM, Ewalt DR:** Pathology of brucellosis in bison from Yellowstone national park. *J Wildl Dis*, 37, 101-109, 2001.

**26. Muz A, Özer H, Eröksüz H, Ertaş HB, Öngör H, Gülcü HB, Dabak M, Başbuğ O, Kalender H:** Bacteriologic, serologic and pathologic studies on abortus cases of goats and sheep in Elazığ and It's vicinity. *Turk J Vet Anim Sci*, 23, 177-188, 1999.

**27. Sağlam YS, Turkutant SS, Tastan R, Bozoglu H, Otlu S:** Aetiological and pathological studies on bacterial abortion in sheep and cattle in the North-East Anatolian region. *Vet Bil Derg*, 14, 133-145, 1998.

**28. İlhan F, Yener Z:** Immunohistochemical detection of *Brucella melitensis* antigens in cases of naturally occurring abortions in sheep. *J Vet Diagn Invest*, 20, 803-806, 2008.

**29. Hong CB, Donahue JM, Giles RC, Poonacha KB, Tuttle PA, Cheville NF:** *Brucella abortus*-associated meningitis in aborted bovine fetuses. *Vet Pathol*, 28, 492-496, 1991.

**30. López A, Hitos F, Perez A, Navarro-Fierro RR:** Lung lesions in bovine fetuses aborted by *Brucella abortus*. *Can J Comp Med*, 48, 275-277, 1984.

**31. Meador VP, Deyoe BL, Cheville NF:** Pathogenesis of *Brucella abortus* infection of the mammary glands in goats. *Am J Vet Res*, 52, 886-890, 1989.

**32. Young EJ:** Comparison of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* infections of mice and their effect on acquired cellular resistance. *Infect Immun*, 26, 680-685, 1979.

**33. Aygen B:** Prostatitis and hepatitis due to *Brucella melitensis*: A case report. *J Infect*, 36, 111-112, 1998.

**34. Elzer PH, Edmonds MD, Hagius, SD:** Safety of *Brucella abortus* strain RB51 in bison. *J Wildl Dis*, 34, 825-829, 1998.

**35. Meador VP, Hagemoser WA, Deyoe BL:** Histopathologic findings in *Brucella abortus*-infected, pregnant goats. *Am J Vet Res*, 49, 274-280, 1988.

**36. Kennedy PC, Miller RB:** The female genital system. In, Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N (Eds): Pathology of Domestic Animals. 4th ed. pp. 396-402, Academic Press, San Diego, CA, 1993.

**37. Osburn BI:** The ontogeny of the ruminant immune system and its significance in the understanding of maternal-fetal-neonatal relationships. *Adv Exp Med Biol*, 137, 91-103, 1981.

**38. Meador VP, Tabatabai LB, Hagemoser WA, Deyoe BL:** Identification of *Brucella abortus* in formalin-fixed, paraffin embedded tissues of cows, goats and mice with avidin-biotin-peroxidase complex immunoenzymatic staining technique. *Am J Vet Res*, 47, 2147-2150, 1986.

**39. Pizarro-Cerda J, Desjardins M, Moreno E, Akira S, Gorvel JP:** Modulation of endocytosis in nuclear factor IL-6 (-/-) macrophages is responsible for a high susceptibility to intracellular bacterial infection. *J Immunol*, 162, 3519-3526, 1999.

**40. Abtahi H, Salmanian AH, Rafati S, Nejad GB, Saffari M, Ghazavi A, Mosayebi G:** The profile of cytokines and IgG subclasses in BALB/c mice after immunization with *Brucella* ribosomal gene. *Pak J Biol Sci*, 11, 2472-2477, 2008.

**41. Muñoz PM, de Miguel MJ, Grilló MJ, Marín CM, Barberán M, Blasco JM:** Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. *Vaccine*, 26, 2562-2569, 2008.

**42. Cheville NF, Olsen SC, Jensen AE, Stevens MG, Florance AM, Houg HSH, Drazek ES, Warren RL, Hadfield TL, Hoover DL:** Bacterial persistence and immunity in goats vaccinated with a pure deletion mutant or the parental 16m strain of *Brucella melitensis*. *Infect Immun*, 64, 2431-2439, 1996.

**43. Tierney TJ, Trevella W, Simpson-Morgan MW:** The cellular response of lambs to *Brucella ovis* before and after birth. *Vet Immunol Immunopathol*, 59, 369-373, 1997.

**44. Afzal M, Tengerdy RPU, Brodie SJ, D Emartini JC, Ellis RP, Jones RL, Kimberling CV:** Immune response in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Res Vet Sci*, 41, 85-89, 1986.

**45. David CW, Norman J, Hammon HM, Davis WC, Blum JW:** Cell proliferation, apoptosis, and B- and T-lymphocytes in Peyer's patches of the ileum, in thymus and in lymph nodes of preterm calves, and in full-term calves at birth and on day 5 of life. *J Dairy Sci*, 86, 3321-3329, 2003.

**46. Reynolds JD:** The genesis, tutelage and exodus of B cells in the ileal Peyer's patch of sheep. *Int Rev Immunol*, 15, 265-299, 1997.

**47. Yasuda M, Fujino M, Nau T, Murakami T:** Histological studies on the ontogeny of bovine gut-associated lymphoid tissue: Appearance of T cells and development of IgG<sup>+</sup> and IgA<sup>+</sup> cells in lymphoid follicles. *Dev Comp Immunol*, 28, 357-369, 2004.

**48. Hu XD, Yu DH, Chen ST, Li SX, Cai HA:** Combined DNA vaccine provides protective immunity against *Mycobacterium bovis* and *Brucella abortus* in cattle. *DNA Cell Biol*, 28, 191-199, 2009.