

**ENFEKSİYÖZ NEKROTİK HEPATİTİSİN
TEŞHİSİNDE FLUORESANT ANTİKOR TEKNIĞİ
İLE DOKU EMÜLSİYONU İNOKÜLE EDİLEN
DENEY HAYVANLARINDAN ALINAN
SONUÇLARIN KARŞILAŞTIRMALI
OLARAK İNCELENMESİ**

Mehmet ÜNAL (*)

Muhsin BEKÂR (**)

GİRİŞ :

İnfeksiyöz nekrotik hepatitis lezyonlu karaciğer dokusunda teşekkül etmiş *Cl. oedematiens* toksinleriyle meydana getirilen koyunların ve bazende sığırların akut toksemik bir hastalığıdır. Saha şartları altında genellikle fascioliasis ve dicrocoeliasis ile beraber görülür. Hastalık karaciğer parazitleri ile ilgili olduğundan bu parazitlerin biyolojilerine uygun olarak mevsimsele bir seyir takip eder ve bu nedenle bilhassa yaz ve sonbahar aylarında en fazla görülür. Hastalığa 2-4 yaşlı iyi beslenmiş yetişkin koyunlar çok hassastırlar. Kuzu ve bir yaşlı koyunlar hastalığa fazla hassas olmamakla beraber 6 aylık kuzularda dahi rastlanmıştır. Hastalığın etkeni sindirim sisteminde daima mevcuttur. Jermlerin barsaktan karaciğere geçişi genç parazitlerin hareketleri ile olmaktadır. (10)

Bu hastalık ilk olarak Tasmanya'da Gilruth (1910) tarafından bildirilmiştir. Daha sonra Dodd (1918-1921) hastalığı incelemiş ve enfeksiyonun sporlu bir anaerob tarafından meydana geldiğini bildirmiştir. Bu araştırmacı hastalığın klinik tablosu, epidemiyolojisi ve patolojisi hakkında detaylı bilgi vermiş, hastalığın bakteri ve karaciğer distomlarının müşterek etkileriyle geliştiğini ve ölümlere akut bir tokseminin neden olduğunu ileri sürmüştür. Albiston (1927) sporlu bir mikroorganizma izole etmiş, Turner ve Davesne (1927) bu orga-

(*) Etilik Veteriner Kontrol ve Araş. Enstitüsü Teşhis Lâb. Şefi

(**) Etilik Veteriner Kontrol ve Araş. Enstitüsü Teşhis Lâb. Şefi.

nizmayı Institut Pasteur'de inceleyerek *Bacillus oedematiens* (cl. novyii) olarak idandifiye etmişlerdir. Avrupalı iki araştırmacı Zeissler ve Rassfeld (1929) bradzo vakalarından *Bacillus gigas* adını verdikleri bir mikroorganizm izole etmişler, sonradan bu etkenin *clostridium oedematiens* olduğu anlaşılmıştır. Enfeksiyöz nekrotik hepatitis Yeni Zelandada Hopkirk (1927), Almanya'da Miessner ve arkadaşları (1931), Romanya'da Cernaianu ve Mihailescu (1935), İskoçya'da Jamieson ve arkadaşları (1948), Orta Gal'de Williams (1962) tarafından incelenmiştir (8).

Bekir İyigören ve arkadaşları ilk defa 1965 yılında hastalığın yurdumuzda mevcut olduğunu tesbit etmişlerdir. Ankara'nın Çankaya, Haymana ve Balı ilçeleriyle daha sonra Ankara, Eskişehir ve Yozgat'ın birçok köylerinde hastalık epidemiyolojik, klinik, patolojik ve bakteriyolojik yönleriyle geniş olarak incelenmiştir (10). Daha sonraki çalışmalarda bu hastalığın yurdumuzun her bölgesinde görüldüğü ve oldukça yaygın olduğu anlaşılmıştır.

Hastalığın etkeni *Cl. oedematiens* tip B. dir. Bu anaerob 4-12 mikron boyunda 0,8-1 mikron eninde genellikle tek tek veya kısa zincirler halindedir. Karaciğerin nekrotik kısımlarından yapılan frotilerde çoğunluk saf kültür gibi çok sayıda tek tek veya ikili zincirler halinde vejetatif şekillerine rastlanmaktadır (8). Patolojik serozitelerde ve kültürlerde hareketlidir. Sporları hacimli (2-3 mikron) *clostridium* şeklinde subterminal olup, patolojik eksudatlarda ve çabuklukla bazı besiyerlerinde meydana gelirler. Gram pozitifdir. Bu karakterini çabuklukla kaybeden anaeroblardan biridir (10)

Cl. oedematiens derin jelozda atılmış pamuk gibi koloniler verir, hafif gaz yapar. Jeloz plaklarında ince, şeffaf, mavimtrak kenarları gayri muntazam koloniler halinde ürer. Glükozlu VF buyyonu, koyun karaciğerli buyyon, safralı buyyon ve serumlu buyyonda ürer. Peptonlu suda zayıf ürer. Kıymalı buyyonda eti hazmetmez, bu besiyerinde iyi spor verir. Sıvı besiyerlerinde 48 saat sonra dibe çöker. Besiyerinin üstteki kısmı berraklaşır.

Cl. oedematiens tip B alfa, beta, zeta ve eta olmak üzere dört toksin fraksiyonuna sahiptir. Alfa toksini letal, nekrotik; beta toksini hemolitik, nekrotik, letal, lesitinolitik; Zeta toksini hemolitik ve Eta toksini tropomiyozinas aktivitelere sahiptir.

Hastalığın patogenesisi; parazitlerin karaciğere göçü doku bozukluğuna sebep olur. Bozulan karaciğer dokusunda anaerob şartlarda *Cl. oedematiens* latent sporlarının aktivasyonu ile organizmler çoğalır ve bunun sonucu üretilen toksinlerle karaciğerde lokal nekrozlar meydana gelir. Bu nekrotik sahalarda üreyen mikrobun imâl ettiği toksinlerin vücuda yayılması ile enfeksiyöz nekrotik hepatitisin klinik ve patolojik tablosu ortaya çıkar ve hastalık ani ölümle sonuçlanır. (10)

Hastalık ani olarak başlar ve klinik semptomlar göstermeden ölümler son bulur. Koyunlar ekseriya geceleyin ölürlür. Bazen ölümden çok kısa bir zaman evvel klinik semptomları görmek mümkün olur. Hasta hayvanların durgunlaştığı, sürünün arkasında kaldığı, yürütmek için zorlanırsa arka arkaya gittiği ve yere düştüğü görülür. Sathi ve süratli bir solunum vardır. Göğsü üzerine yatarlar ve bu durumda iken birkaç dakika içinde çırpınmaksızın ölürlür. (10)

Otopside; özellikle derinin kuru olması ve deri altı kan damarlarının şiddetli konjesyonu dikkatî çeker. Deri altı karakteristik siyahıtır. Bu görünümünden dolayı black disease adını almıştır. Karaciğer koyu kırmızı renkte olup, konjesyone durumdadır. Kapsulası altında küçük küçük hemorajik yırtıklar vardır. Bunlar genç parazitlerin hareketleri esnasında meydana gelmişlerdir. Karaciğerin üzerinde karakteristik 2-3 mm. çapında bazen çok daha büyük sarımsı renkte, bazen parlak konjestif bir halka ile çevrili birkaç nekrotik fuayye görülür. Nekrozlar fazla olarak karaciğerin diaframaya bakan yüzünde bulunur. Fakat derinde de olabilirler ve karaciğere dikkatlice kesit yapılmadıkça kolaylıkla görülmezler. Ergin parazitler genellikle görülmez. (10)

Perikardiumda jelatinöz eksudat, endokart altında peteşiler bulunur. Pleura ve periton boşluğunda fazla likit vardır. Böbreklerde küçük nekrotik fuayyeler görülür (10).

Enfeksiyöz nekrotik hepatitis hastalığı enstitümüze bağlı 11 yıldan gelen materyaller dikkate alındığında bölgemizde oldukça yaygındır. Bölgemizde 1 Mart 1982 ile 31 Aralık 1982 on aylık dönemde gelen 137 şüpheli materyalin 71 adedi enfeksiyöz nekrotik hepatitis müsbet ve 66 adedi de menfi çıkmıştır. Laboratuvarımıza gelen marazi madde çokluğu yönünden enfeksiyöz nekrotik hepatitis ilk sırayı almaktadır. Yaygın olan bu hastalığın teşhisini sağlama almak için

yukarıda açıklanan iki yöntemin beraberce kullanılmasında bilimsel yönden büyük yarar bulunmaktadır. Hastalığın kısa sürede tam teşhisi, gerekli önlemlerin bir an önce alınmasında işe yarayacak dolaşımıyla ekonomik kayıpların en aza indirilmesinde yardımcı olacaktır.

MATERYAL ve METOD :

Enstitümüze 1983 ve 1984 yılları içinde enfeksiyöz nekrotik hepatitisten şüpheli olarak gönderilen materyaller ile başka yönlerden muayene istemi ile gelen materyallerden enfeksiyöz nekrotik hepatit şüphesi gösterenlerden muayeneye alınan 57 adedi materyalimizi oluşturmuştur.

FA tekniği için Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde hazırlanan Cl. oedematiens konjugetinden yararlanılmıştır. FA tekniği ile muayene için karaciğerin nekrotik kısımlarından en az iki adet froti yapılarak usulüne uygun olarak Cl. oedematiens konjugeti ile boyanmak suretiyle Fluorecent mikroskopla incelenmiştir.

Karaciğerin nekrotik kısımlarından alınan doku parçaları steril havanda ezildikten sonra üzerine fizyolojik tuzlu su ilave edilmiş ve 3000 devirde santrifüje edilmiş, süpernatant sıvı süzgeç kağıdından süzülerek tekrar santrifüje edilip en az iki farenin arka bacağına kas içine verilmiştir.

Toksin nötralizasyon testi için Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde hazırlanan Cl. oedematiens tip spesifik nötralizan serum kullanılmış, bu maksatla nötralizasyon testinde kobaylardan yararlanılmıştır. Bunun için karaciğerin nekrotik kısımlarından alınan parçalar havanda steril kumla ezildikten sonra fizyolojik tuzlu suyla emilsiyon yapılarak 3000 devirde 20 dakika santrifüje edilip süzgeç kağıdından süzölmüş ve tekrar santrifüje edildikten sonra üstte kalan sıvıdan bir kobaya 0,5 cc. doğrudan periton içi ve bir kobaya baya da 0,5 cc. emilsiyon + 0,5 cc. Cl. oedematiens spesifik serumu karıştırılarak 45 dakika 37°C de nötralizasyona bırakılmış ve 1 cc. olarak periton içine verilmiştir.

BULGULAR :

Enstitümüz teşhis lâboratuvarında muayeneye alınan 57 nekrozlu karaciğerin nekrozlu kısımlarından yapılan frotiler Cl. oedematiens konjugeti ile boyanarak Floresant mikroskopta tetkik edilmiş ve

bunlardan 50 sinde *Cl. oedematiens* görülmüş, 7 adedinde de görülmemiştir.

Fluorecent mikroskobide *Cl. oedematiens* görülen ve görülmeyen yukarıdaki toplam 57 karaciğerin nekrotik kısımlarından alınan materyal; materyal ve metod kısmında belirtilen şekilde işleme tabi tutulmuş doğrudan birer kobaya periton içi ve ikişer fareye 0,3 kas içine inokule edilmiş, ayrıca antiserumla nötralize edilen süpernatant sıvı birer kobaya periton içine verilmiştir.

Doğrudan karaciğer emilsiyonu verilen (Fluorecent mikroskobide *Cl. oedematiens* görülen) 50 kobaydan 43'ü olmuş (% 86), 7 si sağ kalmıştır. (% 14). Aynı emilsiyondan verilen farelerin ise hepsi ölmüştür. Buna karşılık Fluorecent mikroskobide *Cl. oedematiens* görülmeyen karaciğer emilsiyonu verilen kobay ve farelerin hiçbirisi ölmemiştir.

Fluorecent mikroskopta mikrop görülen doku emilsiyonu verilen kobayların ölüm oranlarına göre, mikrop varlığı ile toksinin varlığı arasında % 86 oranında bir paralellik tesbit edilmiştir. Bu paralellikte % 14 lük bir açığın bulunması karaciğer dokusunda *Cl. oedematiens*in kobaylar için letal yeterli miktarda toksin salıvermemesine ilişkin olduğu kanısını vermektedir. Zira mikrop görülen bütün materyallerden yapılan fare inokulasyonlarında farelerin hepsinin ölmesi ve mikrop görülmeyen doku emilsiyonu verilen kobay ve farelerin hepsinin sağ kalması mikroskobik muayene ile deneme inokulasyonu arasında % 100 e yaklaşan bir uyumun varlığını ortaya çıkarmaktadır.

Bütün denemelerimizde anti serumla korunan materyal verilen kobayların hepsi sağ kalmıştır.

Bulgulara ait cetvel ilişikte sunulmuştur.

TARTIŞMA :

Karaciğerin nekrotik kısımlarından yapılan frotiler FA tekniği ile incelenmiş ve doku emilsiyonları yapılarak farelere doğrudan kas içi, kobaylara doğrudan ve antiserumla nötralize edilerek periton içi verilmiştir.

Alınan sonuçlarda FA tekniğinin deneme inokulasyonuna yakın çağırda olduğu anlaşılmış bulunduğundan FA tekniği ile hastalığın

teşhisinde diğer teşhis metodlarıyla aynı değerde olduğu ve tek başına kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

ÖZET :

1983 - 1984 yılları esnasında komşu illerden enstitümüze hepatit nekrozisli 57 materyal gönderildi. Hastalık yapıcı ajanın Cl. oedematiensin demonstrasyonu için FA tekniğini kullandık. Bu teknik kullanılarak 50 nekrozlu karaciğerde Cl. oedematiensi saptadık (50-57). 7 materyalde sonuç negatif idi.

Cl. oedematiens görülen materyal süspansiyonları kobaylara ve farelere inokule edildi. 50 karaciğer nekrotik doku emilsiyonu 43 kobayı öldürdü (43-50) ve 7 kobay canlı kaldı. Bu emilsiyonlarla inokule edilmiş bütün fareler öldü (50-50).

Toksin nötralizasyon testlerinin sonucu pozitif idi.

Bu çalışmada koyunlarda enfeksiyöz nekrotik hepatitisin teşhisi için FA tekniği ile laboratuvar hayvanlarına nekrotik karaciğer doku emilsiyonunun deneysel inokulasyonu arasında bir uyum vardır.

SUMMARY :

During the years of 1983-1984, 57 diseased materials with hepatic necrosis have sent to our Institute from neighbour provinces. We have used FA technique for the demonstration of causative agent, Cl. oedematiens. In 50 livers with necrosis we have fixed Cl. oedematiens using FA. technique in 7 materials the result were negative.

The materials suspensions in which Cl. oedematiens have been seen, were inoculated into guinea pigs and mouse.

50 hepatic necrotic tissue emulsion killed 43 guinea pigs (43-50) and 7 guinea pigs were alive. All the mouse inoculated with these emulsions have died (50-50).

The result of toxin neutralization tests were positive.

In this study, for the diagnosis of infectious necrotic hepatitis in sheep, there was an accord between FA technique and experimental inoculation of hepatic necrotic tissue emulsion to laboratory animals.

L İ T E R A T Ü R

- 1 — Blod D.C., Henderson J.A., 1963 Infectious Necrotic Hepatis. Veterinary Medicine pp. 436-438.
- 2 — Prévot, A.R. 1951 Bacteries anaerobies pathogenes. Bacteriologie Medicale pp. 657-663.
- 3 — İyigören B, Ünlü M. Alpar S. 1967 Enfeksiyöz Hepatit Necrozant aşısı üzerinde denemeler. Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 1. pp. 14-16.
- 4 — Katitch, R.V. 1965. Hepatite Necrozante. Les maladies des animaux domestique Causées parles microbes anaérobies pp. 153-163.
- 5 — Katitch, R.V., Cvetkovitch, L.J., Tomanovitch, B, Voukitchevitch, 2 1964 Réceil de Médecine Vétérinaire Tomee CXL, 10 pp 871-876.
- 6 — Katitch R.V., Djoukitch D. Dimitrijevitch V, Voukitchevitch 2, Chetkovitch, Let Matitch, C. 1969. Résultats de recherches sur l'étiologie de L'hépatite Nécrosante du outon. Réceil de Médecine Vétérinaire. Tome CXLV, 6 pp. 543-556
- 7 — Güven, S., Worrall, E.E; Nada, S., Elverdi. R., Roberts, R.S. : Genç koyun normal karaciğerlerinde Cl. oedematiens suçlarının izolasyonu ve tip tayinleri, 1970. Pendik Vet. Kont. ve Araşt. Enst. Derg. 3,, 1, 73-87.
- 8 — İyigören. B., Durukan, Ş., Kılıçoğlu G. : Enfeksiyöz Hepatite Nekrozant, Ankara, Eskişehir ve Yozgat illerinde görülen vak'alar üzerindeki müşahadeliler 1966. Etilik Vet. Kont. ve Araşt. Enst. Derg. 3 : S : 1, 2, 14, 16.
- 9 — Güven S, 1972 İst. Anaerob mikroorganizmalar ve Bakteriyolojik Muayene Metodları, Pendik Vet. Kont. ve Araşt. Enst. Yay. No : 4.
- 10 — Koyun hastalıkları, 1971. Pendik Vet. Kont. ve Araşt. Enst. Yayınları No : 3 123-133.

Sıra No.	Materyalin Geldiği Yer	Lâboratuvara Geliş Tarihi	Otopsi Bulgusu	Nekrotik KC.den yapılan frotilerin FAT ile muayenesi	Nekrotik KC. emilsiyonu doğrudan verilen				KC. emilsiyonu + Cl. ced. A anti serumu verilen 1 adet kobay
					Kobay		B. Fare		
					Adet	Sonuç	Adet	Sonuç	
25	Haymana İlçesi Karasüleymanlı Köyü	29.11.1983	KC.de nekroz	Cl.oed görüldü.	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
26	Elmadağ İlçesi Süleymanlı Köyü	8.12.1983	» »	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
27	Haymana İlçesi M. Medrese Mah.	12.12.1983	» »	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
28	Kırıkkale İlçesi Karalı Köyü	15.12.1983	» »	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
29	Orta İlçesi Kalfat Köyü	19.12.1983	» »	Cl.oed görülmedi.	1	Ölmedi	2	Ölmedi	Ölmedi
30	Keskin İlçesi Armutluk Köyü	26.12.1983	» »	Cl.oed görüldü.	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
31	Balâ İlçesi Kesikköprü Köyü	6.1.1984	» »	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
32	Yenimahalle İlçesi Yenikent Bucağı	4.2.1984	» »	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
33	Polatlı İlçesi Çanakçı Köyü	16.4.1994	» »	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
34	Çubuk İlçesi Gürdarbık Köyü	3.7.1984	» »	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
35	Çubuk İlçesi Ballıhisar Köyü	28.8.1984	» »	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
36	Orta İlçesi Özlükuyuk Köyü	31.8.1984	» »	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
37	Balâ İlçesi Akkoşan Köyü	31.8.1984	» »	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi

Sıra No.	Materyalin Geldiği Yer	Lâboratuvara Geliş Tarihi	Otopsi Bulgusu	Nekrotik KC.den yapılan frotilerin FAT ile muayenesi	Nekrotik KC. emilsiyonu doğrudan verilen				KC emilsiyonu + Cl. ced. A anti serumu verilen 1 adet kobay
					Kobay		B. Fare		
					Adet	Sonuç	Adet	Sonuç	
38	Gölbaşı İlçesi Hacı Muratlı Köyü	3.9.1984	KC.de nekroz	Cl.oed görülmedi,	1	Ölmedi	2	Ölmedi	Ölmedi
39	Orta İlçesi Gökçeöten Köyü	4.9.1984	» »	Cl.oed görüldü.	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
40	Haymana İlçesi Culuk Köyü	19.9.1984	» »	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
41	Kalecik İlçesi Elecik Köyü	25.9.1984	» »	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
42	Haymana İlçesi Kavak Köyü	3.10.1984	» »	Cl.oed görülmedi,	1	Ölmedi	2	Ölmedi	Ölmedi
43	Yenimahalle İlçesi Alacaatlı Köyü	5.10.1984	» »	Cl.oed görüldü.	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
44	Mamak İlçesi Kutludüğün Köyü	15.10.1984	» »	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
45	Haymana İlçesi Yenice Köyü	22.10.1984	» »	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
46	Çubuk İlçesi Y. Emirler Köyü	26.10.1984	» »	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
47	Çubuk İlçesi Sirkeli Köyü	31.10.1984	» »	» »	1	Ölmedi	2	Öldü	Ölmedi
48	Haymana İlçesi B. Yağcı Köyü	30.10.1984	» »	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
49	Yerköyü İlçesi Aydıngöz Köyü	7.11.1984	» »	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi

Sıra No.	Materyalin Geldiği Yer	Lâboratuvara Geliş Tarihi	Otopsi Bulgusu	Nekrotik KC.den yapılan frotilerin FAT ile muayenesi	Nekrotik KC. emilsiyonu doğrudan verilen				KC emilsiyonu + Cl. ced. A anti serumu verilen 1 adet kobay
					Kobay		B. Fare		
					Adet	Sonuç	Adet	Sonuç	
50	Orta İlçesi Büğürören Köyü	8.11.1984	KC.de nekroz	Cl.oed görüldü.	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
51	Keskin İlçesi Halilidede Köyü	13.11.1984	« «	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
52	Yenimahalle İlçesi Yuva Köyü	15.11.1984	« «	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
53	Gölbaşı İlçesi Yurtbey Köyü	22.11.1984	« «	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
54	Balâ İlçesi Akkoşan Köyü	29.11.1984	« «	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
55	Polatlı İlçesi Beyobası Köyü	3.12.1984	« «	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
56	Ş. Koçhisar İlçesi Akseki Mah.	18.12.1984	« «	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi
57	Balâ İlçesi Abazlı Köyü	21.12.1984	« «	» »	1	Öldü	2	Öldü	Ölmedi