T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIĞIR, KANATLI VE İNSANLARDAN İZOLE EDİLEN MİKOBAKTERİLERİN MOLEKÜLER TEKNİKLERLE TİPLENDİRİLMESİ

Yasin GÜLCÜ

DOKTORA TEZİ

MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. H. Hüseyin HADİMLİ

KONYA-2014

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIĞIR, KANATLI VE İNSANLARDAN İZOLE EDİLEN MİKOBAKTERİLERİN MOLEKÜLER TEKNİKLERLE TİPLENDİRİLMESİ

Yasin GÜLCÜ

DOKTORA TEZİ

MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. H. Hüseyin HADİMLİ

KONYA-2014

ÖNSÖZ

Mikobakteriler, çeşitli hayvan türleri ve insanlarda tüberküloz enfeksiyonunun etkenidir. Son yıllarda hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı direnç gelişimi ve immun sistemi baskılanan insanların hastalığa karşı duyarlılaşması tüberküloz vakalarında artışa yol açmıştır.

Mikobakterilerin üremeleri yavaştır ve uzun zaman almaktadır. Ayrıca izole edilen suşların identifikasyonunda kullanılan geleneksel metotların rutin olarak uygulanması güç, testlerin tekrarı ve değerlendirilmesi pratik olmayıp, her laboratuvarda uygulanmamaktadır.

Son zamanlarda yapılan moleküler düzeydeki genetik çalışmalar mikobakteri türlerinin DNA yapılarının büyük bir benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Mikobakteri türleri çok geniş bir konakçı dağılımına sahip olup, insanlar için patojen olan suşlar hayvanlarda, çeşitli hayvan türlerinde enfeksiyona neden olan suşlar da insanlarda tüberküloza sebep olmaktadır.

Ülkemizde mikobakteri türlerinin identifikasyonu konusunda yeterli çalışma olmayıp, özellikle sığırlarda enfeksiyona neden olan *Mycobacterium bovis*'in insanlarda görülen tüberkülozun ne kadarından sorumlu olduğu bilinmemektedir. Kanatlılarda enfeksiyon oluşturan *M. avium* ise son yıllarda immun sistemi baskılanmış insanlardan izole edilmektedir.

Bu çalışmada, hayvanlardan izole edilen mikobakteri suşlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile klinik materyalden doğrudan tespiti ve yöntemin rutin teşhiste kullanabilirliğinin araştırılması, sığır ve kanatlı mikobakterilerinin izolasyonu, insan izolatlarıyla birlikte moleküler teşhis metotları ile tiplendirilmesi ve orijinlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Doktora tez çalışmamda bilgi ve deneyimleriyle destek olan ilk danışmanım merhum Prof. Dr. Mehmet ATEŞ ve danışman hocam Prof. Dr. H. Hüseyin HADİMLİ'ye, bilgi ve tecrübeleri ile çalışmamıza yön veren Prof. Dr. Osman ERGANİŞ'e, yakın ilgi ve desteğini gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Zafer SAYIN'a, teknik destekleri için Dr. Nevin TUZCU'ya, insan suşlarını temini ve yardımları için Doç. Dr. Hülya ŞİMŞEK'e, katkılarından dolayı Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü yöneticilerine, yardımlarını gördüğüm mesai arkadaşlarım ve Prof. Dr. Leyla GÜLER'e, çalışmalarım boyunca hep yanımda hissettiğim eşime, anne ve babama teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER ..... **iii**
SİMGELER ve KISALTMALAR ..... **iv**
1. GİRİŞ 1
1. 1. Tanım 1
1. 2. Tarihçe 2
1. 3. Etiyoloji 4
1. 4. Epidemiyoloji 7
1. 5. Epizootiyoloji 8
1. 6. Bağışıklık 11
1. 6. 1. Tüberkülozda Doğal İmmünite 11
1. 6. 2. Fagositoz 11
1. 6. 3. Granülom Oluşumu 13
1. 6. 4. Tüberkülozda Kazanılan İmmünite 14
1. 6. 5. Gecikmiş Tip Aşırı Duyarlılık Reaksiyonu 15
1. 7. Tüberkülozda Aşılama 16
1. 8. Teşhis 17
1. 8. 1. Bakteriyoskopi ve Kültür 18
1. 8. 2. Hücresel Bağışıklığın Ölçülmesi 19
PPD tüberkülin deri testi 19
Gamma interferon (IFN-γ) testi 20
Lenfosit proliferasyon testi 21
1. 8. 3. Humoral Bağışıklığın Ölçülmesi 21
1. 8. 4. Moleküler Yöntemler 22
1. 8. 5. Deneme Hayvanı Testi 24
2. GEREÇ VE YÖNTEM 25
2. GEREÇ 25
2. 1. 1. Sığır, Kanatlı Organ ve Doku Materyali 25
2. 1. 2. İnsan Mikobakterium Suşları 25
2. 1. 3. Referans Mikobakterium suşları 25
2. 1. 4. Bakteriyoskopi 25
Fenollü karbol fuksin 26
Asit-alkol 26
Metilen mavisi 26

2. 1. 5. Kültür 26
Dekontaminasyon..... 26
Mikobakterilerin izolasyonu için besiyerleri 27
Sodyum piruvat..... 27
Gliserol 27
2. 1. 6. Moleküler Metotlar 27
DNA ekstraksiyonu 27
DNA amplifikasyonu 27
Taq polimeraz 27
Deoksi nükleotid trifosfat set 28
Marker..... 28
PZR pozitif kontroller..... 28
Primerler..... 28
Agaroz jel elektroforezi 30
Tris asetat (TBE) tamponu (X10) 30
Agaroz jel 30
Etidyum bromür stok solüsyonu 30
Yükleme tamponu 30
2. 1. 7. Restriksiyon Enzim Analizi (REA) 30
2. 2. YÖNTEM..... 31
2. 2. 1. Bakteriyoskopi 31
2. 2. 1. 1. Ziehl-Neelsen Boyama 31
2. 2. 2. Kültür 31
Lowenstein-Jensen besiyerinin hazırlanışı 31
Middlebrook 7H9 broth hazırlanması..... 31
Örneklerin dekontaminasyonu 32
Besiyerine ekim..... 32
2. 2. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)..... 32
DNA izolasyonu 32
Dokudan ve kültürden DNA izolasyonu 32
DNA ekstraktlarının absorbans tayini 32
DNA amplifikasyonu 33
M. tuberculosis kompleks DNA amplifikasyonu 33

M. tuberculosis DNA amplifikasyonu 34
Mycobacterium avium subsp. *avium* suşları 34
2. 2. 4. Restriksiyon enzim analizi (REA) 35
M. tuberculosis kompleks REA 35
2. 2. 5. MIRU-VNTR analizi 36
3. BULGULAR..... 38
3. 1. Bakteriyoskopi 38
3. 2. Kültür Sonuçları 40
3. 2. 1. Sığır Doku ve Organlarından İzolasyon 40
3. 2. 2. Kanatlı Doku ve Organlarından İzolasyon 40
3. 3. 3. PZR Sonuçları 41
4. TARTIŞMA 49
4. 1. Bakteriyoskopi..... 50
4. 2. Kültür 53
4. 3. Moleküler Metotlar 55
4. 3. 1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) 55
4. 3. 2. Restriksiyon Enzim Analizi (REA) 59
4. 3. 3. Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number Tandem Repeats (MIRU-VNTR) 61
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 65
6. ÖZET..... 67
7. SUMMARY..... 68
8. KAYNAKLAR 69
9. EKLER 82
EK-A: Etik Kurul Kararı..... 82
EK-B: Resimler 83
10. ÖZGEÇMİŞ 88

SİMGELER VE KISALTMALAR iv

ARB **:** Asido Resistant Bacil - Asite dirençli basil

BCG **:** Bacillus Calmette Guerin

CD4 **:** Cluster of Differentiation

EZN **:** Ehrlich Ziehl-Neelsen

HIV/AIDS **:** Human Immunodeficiency Virus infection / Acquire Immunodeficiency Syndrome

IL **:** Interleukin

INF *:* İnterferon

IS **:** Insertion Sequence

LAM **:** Lipoarabinomannan

LJ **:** Lowenstein-Jensen

MHC **:** Major Histocompatibility Complex

MIRU-VNTR : Mycobacterial Interspersed Repetitive Units

MTBC **:** *Mycobacterium tuberculosis* Complex

NK **:** Natural Killers

OT **:** Old Tüberkülin

PCR **:** Polymerase Chain Reaction

PZR **:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PPD **:** Purified Protein Derivative

PZA **:** Pirazinamid

REA **:** Restriksiyon Enzim Analizi

RFLP **:**Restriction Fragment Length Polymorphism

ROAM **:** Reaktif Oksijen Aracı Molekülleri

TCH **:** Thiopen-2-carboxylic acid hydrazine

TDM **:** α,α'trehalose dimycolates

TGF **:** Transforming Growth factor

TLR **:** Toll-Like Receptor

TMM **:** α,α'trehalose monomycolates

TNF **:** Tumor Necrosis Factor

TÜ **:** Tüberkülin Ünitesi

VNTR **:** Variable Number Tandem Repeat

1. GİRİŞ

1. 1. Tanım

Tüberküloz hem hayvanların hem de insanların sağlığını olumsuz etkileyen, akciğerler başta olmak üzere birçok organ yada dokuda kazeöz ve kazekalseröz karakterde tüberküllerin oluşması ile karakterize kronik, bulaşıcı ve zoonoz özellikte bakteriyel bir hastalıktır (Akay 1997, Yardımcı 2006).

Günümüzde de hala önemini koruyan hastalığa tarihsel süreçte farklı isimler verilmiştir. İnsanları zayıflatarak öldürdüğü için "Tüketim Hastalığı", hastaları soldurduğu için "Beyaz Ölüm" veya "Beyaz Veba" ve yüzyıllar boyunca birçok kişinin ölümüne sebep olduğu için de "Ölümün Kaptanı" olarak tanımlanmıştır. Romalılar hırıltılı nefes alıp verme ve öksürükle balgam atma anlamına gelen "**Phthisis**" adını vermişler, veremle ilgilenen doktorlara Ftizyolog denilmiştir. Türkçe'de ise "İnce Hastalık" en çok kullanılan tanımdır (Barış 2003). *Mycobacterium tuberculosis* insan, *M. bovis* sığır ve *M. avium* kanatlı kökenli tüberkülozun başlıca etkenleridir (Yardımcı 2006).

Birçok ülkede sığır ve evcil hayvanlar ile insanlarda mikobakterilerin neden olduğu tüberküloz (TB), en önemli enfeksiyöz hastalıklardan birisidir (Szewzyk ve ark 1995, Coetsier ve ark 2000). Pek çoğu gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere dünya nüfusunun yaklaşık üçte birinden fazlası *M. tuberculosis* ile enfektedir (Giocimini ve ark 2001).

Sığır tüberkülozunda, tüberküller (nodül, granülom) karakterize oluşumlardır. Genellkle kronik bir hastalık olarak bilinmesine rağmen, sığır TB'u zaman zaman akut, çabuk ilerleyici bir tablo gösterebilir. Lezyonlar genelde lenf nodülleri (özellikle baş ve thoraks), akciğerler, bağırsaklar, dalak, karaciğer, pleura ve peritoneum'da bulunur (Özbey ve ark 2008, OIE 2009). Dünya'da 50 milyondan fazla sığırın tüberkülozla enfekte olduğu ve yıllık kaybın 3 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir (Hewinson 2001). Özellikle çiftlik hayvanlarında kilo kaybı, süt üretimi ve üremenin azalmasına bağlı ağır ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Coetsier ve ark 2000).

M. tuberculosis, insanlarda en yaygın tüberküloz etkeni olmakla birlikte, hayvanlarda da (primatlar, köpek, domuz ve bazı egzotik hayvan türleri) hastalığa

neden olmaktadır. Sığır, tavşan ve kediler ise daha dirençli olup, insanlarla uzun süreli ve yakın temas eden hayvanlarda (kuş, köpek ve diğer memeliler) görülebilmektedir (Michalak ve ark 1998, Erwin ve ark 2004).

M. bovis, başta sığırlar olmak üzere insan, primatlar, koyun, keçi, kedi, köpek, tavşan, domuzda hastalık yapmaktadır. *M. bovis* doğal hayatta geyik, fil, lama, mink, bufalo, porsuk, tilki, Afrika ceylanı, papağan, zürafa, tilki, vizon, porsuk, gelincik, antilop, gergedan, yer sincapı, su samuru, rakun, çakal, leopar, vaşak, aslanlar, kaplan ve bizon gibi birçok türden izole edilmiştir. *M. bovis* için en önemli rezervuar yabani hayvanlardır (O'Reilly ve Daborn 1995, Srivastava ve ark 2008, OIE 2009).

M. avium, bütün kanatlı türlerinde tüberküloza neden olabilmektedir. Enfeksiyon egzotik kafes kuşlarının önemli bir problemi olup, doğada serbest yaşayan kuşlar ve tavuklarda nadiren rastlanmaktadır. Özellikle hayvanat bahçelerinde kuşlar arasında yaygındır (Thoen 1998, Gümüşsoy ve ark 2006).

1. 2. Tarihçe

Tüberküloz, eski dönemlerden beri bilinen bir hastalıktır (Daniel 2006). Mozaik tabletlerinde, hayvan karkaslarındaki pleura ve akciğerler arasında yapışmaların olduğu yazılıdır. Mısır, Peru ve Naga mumyalarında tüberküloz etkenleri günümüzde moleküler teknikler ile tespit edilmiştir (Barış 2003, Zink ve ark 2003, Oğuz 2004, Daniel 2006). Filogenetik çalışmalara göre mikobakterilerin 3 milyon yıl öncesinde Doğu Afrika'da bulunduğu ve insanları enfekte ettikleri belirtilmiştir (Daniel 2006).

Mikobakterilerin atalarının sularda ve çevrede yaşayan mikobakteriler olduğu tahmin edilmektedir. Konak ve mikobakterilerin paralel evrimleştiğini iddia eden hipotez, 1950'lerdeki "çoklu tesadüfi giriş" kadar rağbet görmemiş ve günümüzde de olduğu gibi "*M. tuberculosis*'in *M. bovis*'ten türediği" görüşü kabul görmüştür. Brosch (2002) tarafından *M. tuberculosis*'in *M. bovis*'ten atasal suştan ayrımının yaklaşık olarak 15.000 yıl kadar önce yalnızca TbD1 mutasyonu ile olduğu bildirilmiştir. *M. bovis* daha küçük gen yapısına sahip olmasına rağmen çok sayıda mutasyona uğramıştır. Güncel veriler Doğu Afrika ilk insanla beraber *M. tuberculosis*'in evrimleştiğini ve buradan Afrika ve tüm dünyaya yayıldığı fikrini

doğrulamaktadır. M.Ö. 17.000' li yıllardan kalma bizon kemiklerinde *M. tuberculosis'*in tespiti, bakterinin insanlar dışında buzul döneminde mastodonlar ve sığırları da hasta etmiş olabileceğini göstermiştir (Peterson 2009, Zeytinli 2010).

Yakın dönemde ise tüberkulozlu insan sıvı materyalinin enjeksiyonla tavşanlara bulaşabileceği gösterilmiştir (Barnes 2000, Daniel 2006). Ayrıca, 1862 yılında Lyon'da yapılan çalışmada, enfekte materyal ile beslenen buzağılarda tüberküloz geliştiği bildirilmiştir (Barış 2003). Robert Koch, 1882 yılında tüberkülozdan ölen hastasının akciğerinde lezyonlarında basili göstermiş, izole etmiş ve üretilen basil ile deney hayvanlarında tüberkuloz oluşturmuştur (Barnes 2000).

Etken, 1896'da Lehmann ve Neumann tarafından "*Mycobacterium tuberculosis"* olarak isimlendirilmiştir (Yardımcı 2006). Sonrasında morfolojik, kültürel ve patolojik özelliklerine göre tüberküloz basilleri; insan, sığır ve kuş tipi olarak tanımlanmıştır (Keskin 1996). Ayrıca, bu türlerin yanı sıra canlının immun sistemi baskılandığında hastalık yapabilen saprofit mikobakterilerde (*M. kansasii, M. fortitum, M. chelonae, M. abscessus, M.gordonae, M. terrae, M. leprae, M. szulgae, M. scrofulaceum, M. ulcerans, M. simiae, M. marinum)* mevcuttur (Kasımoğlu 1989, Tell ve ark 2001).

Son yıllarda yaşanan sosyo-ekonomik problemler, kontrol programlarının ihmali ve özellikle de HIV/AIDS salgını ile tüberküloz vakalarında artış olmuş, kötü kontrol programları yüzünden ilaç direnci yaygınlaşarak "Çok İlaca Dirençli Tüberküloz" insan sağlığının önemli bir sorunu olmuştur (Kılıçarslan 2007).

M. bovis Bacillus Calmette Guerin (BCG) aşısı insanlarda ilk uygulanan canlı attenüe aşılardandır. Aşı, 1906-1916 yılları arasında geliştirilerek 1921'de canlı attenüe BCG aşısı olarak insanlarda kullanılmaya başlanmıştır (Özkınay ve Özkınay 2008).

ABD'de streptomisinin, İsveç'te Para-amino Salisilik Asit (PAS)'ın keşfi ile 1940'larda tüberküloz tarihinde yeni bir dönem başlamış ancak tek kullanılan bu ilaçlara kısa zaman içinde direnç gelişimi, yeni ilaç araştırmalarını zorunlu kılmıştır. Robizek ve Selikof tarafından izoniazid (INH)'in keşfi sonrası bu üç ilaçla 18-24 aylık kombine tedavi uygulanması ile tüberküloz tedavi edilebilir hale gelmiştir. Daha sonraki yıllarda tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlardan sırasıyla, 1954

yılında pirazinamid (PZA), 1962 yılında etambutol (EMB) ve 1966 yılında rifampisin (RIF) bulunmuştur (Karlıkaya 2012).

1. 3. Etiyoloji

Mikobakteriler; üreme hızı, sıcaklığı, koloni morfolojileri, pigment oluştumaları ve çeşitli biyokimyasal özelliklerine göre sınıflandırılırlar (Kasımoğlu 1989, Özşahin 1994). Bergey's Manual of Systemic Bacteriology'de (9. Baskı); Prokaryotes alemi, Firmicutes divizyonu, Actinomycetales takımı, Mycobacteriaceae familyası, Mycobacteriacea cinsi içerisinde gösterilmiştir (Köksal ve Yaman 2003, Özbey ve ark 2008).

M. tuberculosis kompleks ve *M. avium* kompleks hayvanlarda ve insanlarda patojen olan mikobakterilerin oluşturduğu iki gruptur (Inderlied ve ark 1993). *M. tuberculosis* kompleks içinde, insanlarda enfeksiyon oluşturan; *M. tuberculosis, M. africanum, M. canetti* ile, kemirgen ve insanlarda hastalık yapan; *M. microti,* sığırlarda hastalık etkeni olan; *M. bovis* subsp. *bovis* ve *M. bovis* subsp. *caprae* ve aşı suşu olarak kullanılan *M. bovis* BCG ve foklarda hastalığa yol açan M. pinnipedii yer almaktadır (Niemann ve ark 2000a, Joloba ve ark 2001, Cavanagh ve ark 2002, Abass ve ark 2010).

M. tuberculosis ve *M. bovis* ayrımında koloni formu, gliserol ihtiyacı, niasin üretimi, nitrat redüksiyonu, nicotinamidase ve pyrazinamide duyarlılığı gibi özellikler ön plandadır. *M. tuberculosis,* eugonic karakterde üreme gösterirken, niasin üretimi ve nitrat redüksüyonu pozitiftir. TCH (Thiopen-2-carboxylic acid hydrazine) ise dirençlidir. *M. bovis* ise dysgonic üreme özelliğinde, niasin üretimi ve nitrat redüksüyonu ise negatiftir. Ayrıca, nicotinamidase ve pyrazinamide dirençlidir (Niemann ve ark 2000a). Gliserol *M. tuberculosis'*in, piruvat *M. bovis'*in üremesini artırmaktadır (Quinn ve ark 1994, Akay 1997, Yardımcı 2006).

Fenotipik olarak *M. tuberculosis* ile *M. bovis* arasında yer alan *M. africanum'*un insanlarda hastalığa neden olduğu bildirilmiştir (Viana-Niero ve ark 2001). Biyokimyasal özelliklerine göre 2 alt türe (tip 1, Batı Afrika izolatları *M. bovis'* e, tip 2, Doğu Afrika izolatları ise *M. tuberculosis* ile benzerlik göstermekte) ayrılmıştır (Haas ve ark 1997, Niemann ve ark 2000a).

M. microti, tarla faresi gibi küçük kemirgenler, kaya tavşanı, dağ gelinciği, domuz ve lamada hastalık etkenidir (Cavanagh ve ark 2002). Uzun süre insanlar için patojen olup olmadığı tartışılmış moleküler tekniklerle insanlarda da tüberküloza neden olduğu gösterilmiştir (Abass ve ark 2010).

M. canetti, 2 yaşında lenfadenitisli bir hastadan izole edilmiş olup, biyokimyasal ve genetik özelliklerine göre *M. tuberculosis* kompleks grubundaki diğer suşlarla benzerlik göstermektedir. Ancak, smooth tarzda parlak koloni yapısı ve genotipik özelliklerinin farklılığı ile grup üyelerinden ayrılır (Van Soolingen 1997, Pfyffer ve ark 1998).

M. bovis BCG, *M. bovis*'in 13 yıl boyunca 230 kez pasajlanmasıyla elde edilmiştir. Ülkemizde ve dünyanın birçok ülkesinde tüberküloz aşısı olarak kullanılmaktadır. Konjenital veya kazanılmış bağışıklık yetmezliği olanlarda aşılama sonrasında, BCG-osis olarak tanımlanan lenf düğümleri, akciğerler, böbrek, dalak gibi organlarda tüberküloz lezyonları gelişebilmektedir (Çavuşoğlu ve ark 2007). *M. bovis* BCG fenotipik ve genotipik olarak *M. bovis* ve *M. tuberculosis* kompleksin diğer üyeleriyle benzerlik göstermektedir (Talbot ve ark 1997).

M. avium kompleks içinde *M. avium* ve *M. intracellulare* bulunur. *M. avium*'un ise 3 alt türü mevcuttur. *M. avium* subsp. *avium* ve *M. avium* subsp. *sylvaticum* kanatlılarda, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ruminantlarda ve diğer memeli türlerinde Johne's hastalığının etkenidir (OIE 2008, Turenne ve ark 2008).

M. avium subsp. *avium* ördek, kaz, kuğu, tavuskuşu, güvercin, hindi, devekuşu gibi kanatlı hayvanlar ile yabani kuşlarda hastalığın etkenidir. Tipik granülomlar karaciğer, dalak ve kemik iliğinde görülürken, etken çocuklarda submandibular adenopati ve yetişkinlerde ise fırsatçı patojen olarak solunum yolu hastalıkları neden olmaktadır. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda (AIDS gibi) ise, tüm vücuda yayılabilmektedir (Picardeau ve Vincent 1996, OIE 2008). Memelilerde hastalığa hamster, lama ve maymunlar daha duyarlı, köpek, fare, kobay ve ratlar ise daha dirençlidir. Sığırlarda enfeksiyon şekillense de lezyonlar lokalize olarak kalmaktadır (Thoen 1998). Domuz ve kedilerde ise lenf nodülü enfeksiyonlarına sebep olmaktadır (Picardeau ve Vincent 1996).

M. avium'un genotiplendirme çalışmaları ile kuşları enfekte eden *M. avium* subsp. *avium* dışında insan ve domuzlarda enfeksiyon yapan *M. avium* subsp. *hominissuis* alt türü tespit edilmiştir (Mijs ve ark 2002). *M. avium* subsp. *sylvaticum,* özellikle kanatlılarda ve memelilerde hastalık oluşturmaktadır (Witmer ve ark 2003).

Mycobacterium genavense, AIDS'li hastalar (Coyle ve ark 1992), çeşitli kuş türleri (Hoop 1996) ve köpeklerden izole edilmiştir (Kiehn ve ark 1996).

Mikobakteriler değişik büyüklükte (0.2-0.6x 1.0-10 µm) uzun yada kısa çomak şeklinde, aerobik, sporsuz, hareketsiz, kapsülsüzdürler. Gram pozitif olmalarına rağmen hücre duvarlarındaki zengin lipid tabakasından dolayı normal boyaları almazlar (Durupınar 1996).

Mikobakterilerde hücre duvarında bulunan mikolik asitler tüm hücre duvarı kuru ağırlığının %50'si ve hücre lipidlerinin ise %60'ını oluşturlar. TDM (α,α'trehalose dimycolates), TMM (α,α'trehalose monomycolates) ve hücre duvarına nonkovalent olarak bağlı olan ve asimetrik dağılım gösteren lipid fraksiyonları birlikte hidrofobik bir bariyer oluşturur (Köksal ve Yaman 2003). Yağ asitleri hücre duvarının kalın ve etkenin aside dirençli olmasını sağlamakla birlikte, aynı zamanda bakteriyi çevresel etkilerden korur (Özşahin 1994, Nigou ve ark 2003). Mikobakterilerin hücre duvarındaki lipid tabakası anilin boyaları ile bağ oluşturarak asit-alkolden etkilenmedikleri için asid fast boyama yöntemi Ziehl-Neelsen ile boyanır. Boyama esnasında alttan hafifçe ısıtılarak hücre duvarlarının yumuşatılarak boyayı alması sağlanır. Boyama sonrası asit alkolle dekolorize edilemediklerinden asit alkole dirençli basil (AARB yada çoğu zaman ARB) olarakta adlandırılırlar (Quinn ve ark 1994, Durupınar 1996, Akay 1997, Yardımcı 2006). Hücre duvarının dış tabakasında virülensle ilişkilendirilen gliserol monomikolates, fosfolipidler ile sülfatidler, "kord faktörü" olan TMM ve TDM gibi trehalozlar bulunur. Kord faktörü toksik etkili olup, granülom oluşumuna neden olur. Bu etki ise, makrofajların kemotaksisi ve uyarısına bağlı olarak gelişirken, komplementi alternatif yoldan aktive ederek akut yangıya da neden olmaktadır (Durupınar 1996).

En dış tabakayı peptidoglikolipid olan ve "mycoside" olarak isimlendirilen yapılardan oluşturur. Lifsel yapıda ağ şeklinde olan mycosideler, bazı mikobakterilerin (*M. avium* ile *M. lepra*) çevresini kapsül gibi sararak saydam bir alanın görülmesine yol açar (Özşahin 1994). Polisakkarit ve proteinler ile az

miktarda da lipid içeren kapsül, özellikle enfekte makrofajlardan hazırlanan preparatlarda bulunmaktadır. Bu yapı alfa-1,4 glukan, bir arabinomannan ve mannan içeren içeren lipomannan (LM) ve lipoarabinomannan (LAM) gibi kapsüler polisakkaritlerden oluşmaktadır. Ayrıca hücre duvarında gram negatif bakterilerde olduğu gibi porin proteinleri de mevcuttur (Köksal ve Yaman 2003).

Toprak ve dışkıda aylarca canlı kalabilen mikobakteriler fiziksel etkilere karşı oldukça dirençlidir (Quinn ve ark 1994). Basilin çevre koşullarına olan direnç epidemiyolojik ve klinik açıdan önemlidir. Kurumaya karşı da çok dirençli olan mikobakteriler, besiyerinde 37 ^{o}C'de 12 yıl canlı ve patojen kalırken, kuru balgamda 6-8 aya kadar canlılıklarını devam ettirebilirler. Sporsuz bakterilere göre sodyum hipoklorit, %70'lik alkol, %5 fenol, povidon-iyodin gibi dezenfektanlara daha dirençlidirler. Ortamda bulunan organik maddeler dezenfektanların etkisini azaltıcı etkileri vardır Mikobakteriler direk güneş ışığı, ultraviole, pastörizasyon ve basınçlı buharla sterilizasyona duyarlı olup, 60 ^{o}C'de 15-20 dakikada ölürler. Balgam, kirli çamaşırlar ve kaplardaki bulunan etkenlerin inavtivasyonu için 5 dakika kaynatma yeterlidir. Pastörizasyon, sütteki mikobakterilerin ölmesi için yeterlidir. Direkt güneş ışığı kültür bakterilerini 2 saatte, balgamdaki basilleri 20-30 saatte öldürürken, basiller yumurtalı besiyerinde karanlık ortamlarda yıllarca canlı kalabilirler. Dirençli olduğu malaşit yeşili gibi boyalar, besiyerlerine katılarak selektif besiyerleri elde edilir (Durupınar 1996).

1. 4. Epidemiyoloji

Dünya nüfusunun 1/3'ünün tüberküloz basili ile enfekte olduğu, her yıl yaklaşık 8 milyon yeni tüberküloz olgusu ve 3 milyon tüberküloza bağlı ölüm olduğu tahmin edilmektedir (Özkara ve ark 2003). 2013 yılı Global Tüberküloz Raporunda, 2012 yılında TB yeni vaka sayısının 8,6 milyon olduğu, dünyada vakaların çoğunluğunun Güney-Doğu Asya (%29), Afrika (%27) ve Batı Pasifik (%19) bölgelerinde görüldüğü, Hindistan (%26) ve Çin (%12)'deki tüberküloz hastalarının dünyadaki hastaların %38'ini oluşturduğu bildirilmiştir. Mortalite ise, 2003 yılında 1.8 milyon, 2010'da 1.4 milyon, 2013' te 320 bini HIV pozitif olmak üzere 1,3 milyon olarak belirtilmiştir (Türk Tabipler Birliği 2012, WHO 2013).

Osmanlı İmparatorluğunda 19. yüzyılın sonlarında tüberküloz salgını büyük bir halk sağlığı sorunu olmuş, Balkan Savaşları ve 1. Dünya Savaşındaki yoksullukla

Anadolu'ya yayılmaya başlayan hastalık, 1940'ların sonunda en yüksek düzeyine ulaşarak bu dönemde en sık görülen ölüm nedeni olmuştur (Barış 2003).

Özkara ve ark (2003), 1953-1959 yılları arasında nüfusun %56'sının, 1980-1982 yılları arasında ise %25'nin enfekte olduğunu bildirmişlerdir. Prevalans, 2006-2009 yılları arasında yüz binde 24 olarak tespit edilmiştir (Türk Tabipler Birliği 2012).

Türkiye'de vahşi hayvanlarda tüberkülozun prevalansı ile evcil hayvanlar ve insanlarla olan ilişkilerine ait veriler oldukça sınırlıdır. Yaylacılık sırasında vahşi domuz ve geyiklerden kalan enfekte materyallerle bulaşık otlaklar hastalığın evcil hayvanlara bulaşmasında en önemli kaynaktır (Özbey ve ark 2008).

Ülkemizde 1980-1985 yılları arasında 161.022 baş hayvana tüberkülin testi uygulanmış ve 50 mihrakta toplam 82 hayvanda tüberküloz müspet bulunmuştur. 1986'da Türkiye Tüberküloz Mücadele Projesi başlatılmış ve ülke 5 bölgeye ayrılarak 1. bölgeden başlamak üzere ilk yıl hayvan mevcudunun %20'si, 2. ve 3. yıl %40'ı mücadele kapsamına alınmıştır. Bu projeye göre 1986 yılında 250.000 adet sığıra tüberkülin uygulanmış 153 mihrakta toplam 1983 hayvanda tüberküloz müspet bulunmuştur. Ancak bu hastalığın tazminatlı bir hastalık olması nedeniyle finansal sorunlar baş göstermiş ve 1987 yılında programda 591.000 sığıra tüberkülin uygulanması planlanmışken 64.000 sığıra tüberkülin uygulanmış, 96 mihrakta toplam 252 hayvan müspet bulunmuştur (Akçay 2011).

GTHB Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü (2013) verilerine göre, 2011 yılında PPD ile test edilen 77.497 sığırdan 4.605'i, 2012 yılında 124.431 sığırdan 18.086'sı, 2013 yılında ise 134.602 sığırdan 19.463'ü pozitif bulunmuştur. OIE 2012'ye göre Konya'da 6 işletmede 33 sığırda tüberküloz vakası tespit edilmiştir.

Bugün gelişmiş ülkelerin çoğunda sığır TB'u eradike edilmiş veya kontrol altına almış durumdadır. Bu ülkelerde TB'un prevalansına bakıldığında, ülkemizde etkili bir eradikasyon çalışmasının yapılmasının gerekliliği ortaya çıkmaktadır (Özbey ve ark 2008).

1. 5. Epizootiyoloji

Mikobakterilerin hayvanlarda hastalık yapabilmesi etkenin dozu, konağın doğuştan gelen direnci ve mikobakterilerin virülensine bağlıdır. Makrofajları yüksek

mikrobisidal etkiye sahip olan veya düşük virülent bir mikobakteri ile enfekte bireyde hastalığın oluşması için gereken doz miktarı yüksektir (Piessens ve Nardell 2000). Enfeksiyonun başlaması, etkenin makrofajı yok ederek canlı kalması ve konakçı makrofajında çoğalması ile olur (Piessens ve Nardell 2000, Özbal 2006). Patogeneziste birkaç komponentin katılımı ve kümülatif etkileri zorunludur (Gyles ve Thoen 1993, Thoen ve ark 2006).

Palmer ve Waters 2006, aerosol bulaşma için $4x10^5$, oral bulaşma için ise bu sayının 1000 katı kadar basil gerektiğini ancak oral yolla alınan 5000 CFU mikobakterinin hastalık oluşması için yeterli olduğunu iddia etmişlerdir. Solunumla alınan mikobakteriler ilk olarak üst solunum yollarında mukus ve epitel kirpikler tarafından oluşturulan mukosiliyer bariyer karşılaşır. Ancak toz ve su damlacıkları ile etken mukosiliyer bariyere takılmadan terminal bronşiollere ve alveollere kadar taşınabilir (Thoen ve ark 2006). Mikobakteriler girdikleri organlarda (akciğer, bağırsak) ilk lezyonları (*primer efekt, ghon odağı)* oluşturur. Fagosite edilen mikobakteriler, lenf düğümleri ve akciğerin parankimine yerleşir ve özellikle lenf yumrularında yangı, dejenerasyon ve şişlikler oluşturur. Etkenlerin ilk girdiği yerdeki organ veya dokular ile lenf yumrularında oluşturduğu bozukluklar gelişerek *primer kompleks* oluşturur. Lezyonlar konak direncine bağlı olarak iyileşebilir yada hiç belli olmayabilir (*tam olmayan primer kompleks)*. Vücut direnci kırılıdığında tespit edilemeyen bu lezyonlardaki canlı basiller yeniden üreyebilir. Kana karışan basiller vücutta değişik organ ve dokulara yayılarak generalizasyona neden olurlar *(erken generalizasyon).* Sonuç olarak bazı doku ve organlarda yeni tüberküloz lezyonları meydana gelir *(generalize milier tüberküloz)*. Odakların merkezinde yer alan kazeifiye veya kalsifiye alanlar büyüyüp genişleyerek açılırsa, mikobakteri barındıran eksudat bronş ve bronşiyollere açılarak boşalır. Öksürük ve tıksırıkla atılan eksudat kontaminasyona yol açar *(açık tüberküloz)*. Vücudunda primer kompleks olan birey yeniden mikobakteri ile karşılaştığında tekrar hasta olursa *reenfeksiyon* ve bu durum ise *kronik organ tüberkülozudur*. Buradan orijin alan generalizasyon ise *geç generalizasyon* olup, vücudu zayıf ve duyarlı olanlarda fazlaca rastlanır (Arda 1982, Akay 1997, Hazıroğlu 1998).

Sığırlar arasında hastalığın yayılışı farklı yollarla olmaktadır. Horizontal olarak direkt inhalasyon yoluyla bulaşma olabileceği gibi, enfekte materyalin yenmesi ve indirekt olarakta kontamine otlaklar, su veya etkenle bulaşık

materyallerle olmaktadır. Generalize tüberkülozun gelişmiş ülkelerde görülme sıklığının azalmasının en önemli nedeni idrar, süt ve gaita ile atılımın kontrol altına alınmasıdır (Neill ve ark 2001). Ayrıca, hem sığır hem de insanlarda hastalığın görülme sıklığını önemli ölçüde azalmasında sütün pastörizasyonu büyük rol oynamıştır (Cosivi ve ark 1998). Vertikal bulaşma mümkün olmakla birlikte nadiren görülmektedir (Neill ve ark 2001).

M. bovis' in insanlara bulaşmasında solunum, pastörize edilmemiş sütler ve enfekte sığır etlerinin tüketimi, immun sistemin baskılanmış olması ile mukoz membranlar ve yaralı deriyle temas rol oynamaktadır (Cosivi ve ark 1998). Mezbahada çalışan kişilerde solunum yoluyla bulaşma sıklıkla görülmektedir. HIV ile enfekte bireylerde *M. bovis* özellikle enfeksiyona fırsatçı patojen olarak yol açmaktadır (Sunder ve ark 2009).

Sığırlarda lezyonların öncelikle solunum yolu ile ilişkili lenf yumrularında şekillendiği yıllardan beri bilinmektedir (Pollock ve ark 2006, Thoen ve ark 2006). En sık olarak mediastinal, bronşiyal ve baş bölgesi lenf yumrularında lezyonlara rastlanmaktadır. Etkenle enfekte süt ile beslenen genç hayvanlarda lezyonlar özellikle mezenteriyel lenf düğümlerinde oluşmaktadır Generalize tüberkülozda karakteristik lezyonlar akciğer, karaciğer, dalak ve vücut boşlukları, böbrek ve memede yada meningsler ile seröz boşluklarda görülür (Neill ve ark 2001, Thoen ve ark 2006).

Kanatlılar için patojen olan mikobakteriler çevrede saprofit olarak fazlaca bulunmaktadır. Özellikle bataklık, göl, dere ve nehir yüzey suları, organik madde bakımından zengin veya hayvan dışkısı ile kirlenmiş topraklar enfeksiyon için ana kaynaktır. Ayrıca enfekte kanatlılar dışkılarıyla çevreyi kontamine ederek enfeksiyonun yayılmasında rol oynarlar (Tell ve ark 2001).

M. avium bütün kuşlarda enfeksiyona neden olmakla birlikte, hastalıktan daha çok yabani kuşlar, konuşan kafes kuşları ile evcil kümes hayvanlarını etkilenmektedir. Ayrıca güvercin, hindi, kaz, kuğu, ördek, tavus kuşu ile kafes ve yabani kuşlarda da tüberküloza neden olmaktadır. Serçe, karga, baykuş, bazı şahin türleri, karatavuk, sığırcıktan izole edilmiştir. Papağan ve kanaryalarda ise hastalık nadiren görülür. (Thoen 1998). Mevcut bilgilere göre insanlarda *M. avium'* un ilk

giriş yolu bağırsaklar, ikincil olarak solunum yolu görülmektedir (Inderlied ve ark 1993.

1. 6. Bağışıklık

Mikobakteriler, yeterli immün cevap şekillenen sağlıklı bireylerin %90'ında enfeksiyon oluşturmamaktadır (Öztürk 2003, Özbal 2006, Hernández-Pando ve ark 2007). Ancak, enfeksiyonun gelişme riski immun sistemin baskılandığı durumlarda (AIDS gibi) artmakta ve BCG aşısı da tüberküloza karşı bağışıklık sağlamamaktadır (Hernández-Pando ve ark 2007).

1. 6. 1. Tüberkülozda Doğal İmmünite

Mikobakterilere vücuda girdiğinde doğal savunmada; üst solunum yolları ve bronşlardaki anatomik oluşumlar, öksürük, mukosiliyer engel, IgA, alveollerde ise alveoler makrofajlar, fagositoz, fagositik hücrelerin reaktif nitrojen ve oksijen ürünleri, yangı hücreleri ve sitokinleri, alveoler makrofajların kimyasal yapısını değiştirmesi, apoptoz ve genetik faktörler, hücresel ve humoral immünite yer almaktadır (Fokkens ve Scheeren 2000, Uçar ve ark 2002, Özbal 2006).

1. 6. 2. Fagositoz

Mikobakterilerin ilk karşılaştıkları savunma hücreleri alveolar makrofajlardır (van Crevel ve ark 2002, Pollock ve ark 2006). Basilin fagosite edilmesi bakterinin makrofaj mannoz ve/veya kompleman reseptörleri ile etkileşmesi ile başlamaktadır (Soysal 2009). Canlı mikobakteriler 10'a yakın TLR (Toll-Like Receptor) içinden TLR2 ve TLR4 reseptörlerini aktive edebilirler (Schluger 2005). Mikobakterilerin yapısında bulunan 19 kDa lipoproteini ve lipoarabinomannan (LAM) TLR2'ye bağlanarak intrasellüler sinyal iletimini ve sitokin üretimini başlatarak, makrofaj aktivasyonunu sağlar. Alveol yüzeyindeki sürfaktan protein A, basilin mannoz reseptörlerine bağlanmasını artırır (Hernández-Pando ve ark 2007, Soysal 2009).

Tüberküloz basilleri, makrofaja Fc reseptörleri gibi oksidatif ürünlerin salınımına sebep olmayan CR1 ve CR3 kompleman reseptörlerini kullanarak bağlanır ve toksik ortamdan korunmuş olurlar. Yine mikobakterilerde bulunan 19 kDa lipoproteini ManLAM zayıf aktiviteli makrofaj cevabının ve nitrojen ara ürünlerinin üretiminin inhibisyonu ile intrasellüler ortamda canlı kalabilirler (Öztürk

2003, Çalışır 2004, Özbal 2006). Tüm patojenik mikobakterilerde her zaman rastlanan bir molekül olan Lipoarabinomannan (LAM) ile ManLAM bazı immun sistem hücrelerinin sitokin üretimini inhibe ederek makrofajların içinde bulunan basilin hayatta kalmasına yardımcı olur (Nigou ve ark 2003).

Partiküllerin makrofaj adezyonu ve içeri alınmalarıyla fagositoz gerçekleşir. Ig ve komplemanın makrofaj yüzeyine bağlanmasıyla nonspesifik adezyon dışında opsonin bağımlı fagositoz olur. Makrofajlar, Fc reseptörü ile Ag- Ab kompleksine bağlanabilir. Ardından yüzey membranın içe doğru invajinasyonuyla "Fagozom" vakuolleri oluşur. Fagozomların lizozomlarla birleşmesiyle "fagolizozom" şekillenir (Giacomini 2001, Uçar ve ark 2002). Böylece hücre içi öldürme mekanizmaları olan asit pH, reaktif oksijen aracı molekülleri (ROAM), lizozomal enzimler ve toksik peptidlerle karşılaşan mikobakterilerin makrofaj içinde ölümü gerçekleşir (Smith 2003, Hernández-Pando ve ark 2007).

Ayrıca uyarılan makrofajlar IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF-α ve INF-γ gibi sitokinleri salgılanır. IL-1, monosit, makrofaj ve dendritik hücrelerin üretiminde rol oynarken, tüberküloz basilinin antijeni ile karşılaşan T-lenfositleri IL-2 salgılayarak, CD4+ hücrelerinin çoğalmalarını sağlar. IL-6 ise, fagoitoz hızını artırırken, mikobakteriyel enfeksiyonlarda IL-1 ve TNF-α üretimini azaltıcı etkisi ile zararlı olabileceği, eksikliğinde ise enfeksiyona olan duyarlılığın arttığına dair bulgular mevcuttur. Mikobakterilerin fagositozu için gerekli olan IL-12'nin ise, INF-γ üretimini artırıcı etkisi vardır (van Crevel ve ark 2002). Enfekte makrofajların apoptozisini artıran TNF-α, dendritik hücre olgunlaşması ve monosit/lenfosit göçünün aktivasyonuyla tüberküloza karşı savunmada rol alır. Ayrıca monosit ve antijen spesifik T lenfositlerinin enfeksiyon bölgesine toplanmasında görev alırken, IL-12 ve IL-18 ile NK hücrelerinin aktivasyonunu sağlar (Ertürk 2009). INF-γ, fagositoz hızını ve makrofajlardan IL-12 ve TNF-α sentezini artırmaktadır. Makrofajlarda çoğalan basiller ya fagositleri parçalar yada latent olarak kalırlar. Makrofajlardan çıkan mikobakteriler alveol boşluklarında çoğalır, komşu lenf bezlerine ve lenfo-hematojen yolla tüm vücuda yayılarak, yeni enfeksiyon odakları oluştururlar (Özbal 2006).

Apoptozis, mikobakterilerin enfekte hücre içinde canlı kalmasını sınırlayarak enfeksiyonun yayılmasını önlemektedir. Aktive olan makrofaj ve dendritik

hücrelerden salınan TNF-α, programlı hücre ölümüne neden olur. Sitokin oluşumundan bağımsız olarak LAM, Ca2+ bağımlı mekanizma ile basille enfekte hücrelerin in vitro apoptozunu önleyebilir. Sitotoksik hücreler ile birlikte katkı Fas ligandın enfekte makrofajlarda ekspresyonunun artması makrofaj apoptozuna sağlayabilir. Granulozin, mikobakterilerin membran bütünlüğünü doğrudan etkileyen ve bu şekilde basilleri öldüren bir molekül olup, sitotoksik T ve NK hücrelerinde bulunmaktadır (Öztürk 2003, Özbal 2006). Patojen mikobakteriler çoğu zaman enfekte alveoler makrofajların apoptozundan kurtulabilmektedir (Keane ve ark 2000, Özbal 2006).

1. 6. 3. Granülom Oluşumu

Aktive makrofajlar, T- lenfositleri, fibroblastlar ve epiteloid hücrelerce mikobakterilerin granülom içinde sınırlanması gerekmektedir. Klasik olarak gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonlarını karakterize eden granülomlar, aynı zamanda granülomatoz bir yangı odağıdır. Vücutta mikobakterilere özgü oluşan granülomlar, epiteloid görünümlü aktive olmuş makrofajların dokularda maydana getirdiği kronik yangısal bir immün yanıtıdır (Daniel ve ark 2000, Kobayashi ve ark 2001, Schluger 2005). Enfeksiyonun başlamasından sonraki 2-6 hafta içinde mikobakterilere karşı oluşan hücresel immün yanıt ile lezyon bölgesindeki aktif alveoler makrofajlar, epiteloid histiositler, çok çekirdekli dev hücreler ile lenfositler (CD4 +TH ve CD8 +Tc) toplanarak granülom oluşturur (Kobayashi ve ark 2001, Tahaoğlu 2007). Granülomlar ile fagosite edilen ve yok edilemeyen mikobakterilerin çoğalmaları ve enfeksiyonun ilerlemesi ve yayılması sınırlandırılır (Yaman 1999, Tahaoğlu 2007).

Kazeöz nekroz ile sonuçlanan granülomun kazeöz odağında mikobakteriler yaşayabilir ancak çoğalamaz. Hücresel immünite ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu mikobakterilerin vücuda girişinden üç-sekiz hafta sonra şekillenir. Ancak HIV pozitif bireyler, yaşlılar ve immün sistemi henüz gelişmemiş infantlar enfeksiyonu bu aşamada sınırlayamaz ve primer enfeksiyonu izleyen haftalarda hastalık gelişir. Uzun yıllar kazeöz odaklar içinde varlığını sürdüren basiller reaktivasyonun nedeni olabilirler (Özbal 2006, Tahaoğlu 2007).

Tüberkülozda doğal dirençte rol oynayan asıl hücreler olan makrofajlar ve dendritik hücrelerin kazanılmış direncin başlatılmasında da çok önemli görevleri vardır (Öztürk 2003). Humoral cevaptan ziyade hücresel immun cevabın daha etkin olduğu tüberkülozda, özellikle hastalığın ilk evrelerinde antikorlar tek başına yada uygun sitokinlerle mukozal yüzeylerde bakteri girişini önleyici etkiye sahiptir (Hernández-Pando ve ark 2007). Spesifik antikorların *M. bovis* BCG'nin nötrofil yada makrofajların içine alınmasını ve öldürülmesini artırdığı, antikorla kaplı BCG basilinin dendritik hücrelerce CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin stimülasyonu için daha etkili işlendiğini ve sunulduğu bildirilmiştir (de Valliere ve ark 2005). Hücresel immün cevapla enfeksiyon kontrol altına alınabilir veya az sayıda basil durağan hale geçebilir. Primer enfeksiyondan yıllar sonra etkenler çoğalarak sekonder tüberküloza neden olabilirler (Manabe ve Bishai 2000, Hernández-Pando ve ark 2007).

1. 6. 4. Tüberkülozda Kazanılan İmmünite

Antijen sunumu, kostimülasyon ve sitokin oluşumu kazanılmış bağışıklığın safhalarını oluşturur. Makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından antijen sunumu farklı mekanizmaları kapsar. İlk olarak, MHC II molekülleri mikobakteriyel proteinleri CD4+T hücrelerine sunarken, antijenler profesyonel antijen sunan hücrelerin fagolizozomal bölümlerde işlenir. Bütün çekirdekli hücrelerde eksprese edilen MHC sınıf I molekülleri, mikobakteriyel proteinleri antijene spesifik olan CD8+T hücrelerine sunabilir. Bu şekilde bazı mikobakteriyel antijenlerin fagozomdan bir yolunu bulup kaçabilmelerinden dolayı önemli sitozolik antijenlerin sunumuna imkan sağlar (Öztürk 2003).

MHC'den bağımsız olarak gamma-delta T lenfositler basilleri tanıyabilmektedir. Antijen sunumunun ise ancak özel ortak sinyallerin varlığında T hücre uyarısına yol açtığı bilinmektedir. Makrofajlar ve dendritik hücrelerde eksprese edilen ve T hücreler üzerindeki CD28 ve CTLA-4'e bağlanan CD80 ve CD86, T hücre uyarılması için en iyi bilinen ortak sinyalleridir. Antijen sunumu uygun ortak sinyallerin yokluğunda T hücrelerin artmış apoptozuna yol açabilir. T lenfositlerin uyarılması için aktif makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından değişik sitokinlerin salgılanması esastır. IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, TNF-α, IL-1, IL-6 ve TGF-β gibi sitokinler makrofajlar ve dendritik hücrelerce salgılanan sitokinlerdir (Daniel ve ark 2000).

IL-2 ve TNF-α, NK hücrelerini aktive edici, TNF-β ve IL-12 immün koruyucu, TGF-β ve IL-10 immün süpresif sitokinlerdir. TNF-α ile IL-12, CD4+TH [CD4+T helper (yardımcı T lenfosit)] lenfositleri Th1'e farklılaştırır. Th 1 lenfositleri IL 2, TNF-α ve IFN-γ salgılar. IFN-γ; makrofajları aktivasyonu, IL-12 ve TNF-α sentezini aynı zamanda fagositoz hızını artırmaktadır. IL-2 ve TNF-α'nın aktive ettiği NK ve CD8+Tc lenfositleri hücre içinde bulunan mikobakteriyle birlikte enfekte makrofajlarıda yok ederek basil sayısını azaltılmasına katkıda bulunur. Makrofajlar veya dendritik hücreler tarafından mikobakterilere ait antijenler CD4+TH veya CD8+Tc lenfositlerine sunumuyla hücresel immünite ile birlikte tüberkülin testiyle belirlenebilen gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu da şekillenir. Granülom ve kazeöz nekroz oluşumu gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonunun sonucudur. Tüberkülin testinin pozitif olması, canlının tüberküloz basiliyle karşılaşmış veya BCG ile aşılanmış olduğunu göstergesidir (Öztürk 2003, Özbal 2006).

1. 6. 5. Gecikmiş Tip Aşırı Duyarlılık Reaksiyonu

Gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu, hücresel düzeydeki bağışıklık olaylarını kapsayan ve yavaş gelişen reaksiyonlardır. Diğer aşırı duyarlılık reaksiyonlarından farkı antikorların hiçbir rolünün olmayışıdır (Diker 1998). Hayvanar arasında serumla transfer mümkün olmayıp ancak koruyucu bağışıklıkla ilgili olan yüzey reseptörlerinin (örn. Farelerde Ly1 veya Ly1,2.3 reseptörleri) bulunduran T (T-delayed type hipersensitivity, T_{DTH}) lenfositleriyle aktarılabilirler (Erganiş 1994). Reaksiyon antijen sunan hücreler, T lenfositleri, yangı hücreleri ve sitokinler tarafından yürütülür (Diker 1998).

Tüberkülozda konağın gecikmiş tip aşırı duyarlılık cevabı akciğer hasarına yol açar. Şekillenen hücresel bağışıklık ile gecikmiş tip aşırı duyarlılık cevabı, tüberküloz basillerinin çoğalmasını eşit düzeylerde baskılar. Hücresel immün yanıt fagosite edilen mikobakterileri öldürmeleri için makrofajları aktive ederken, gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtı ise basil bulunan fakat aktive olmamış makrofajlarla, çevre dokuları harap edip etkenlerin üremesi için uygun hücre içi ortamı bozar. Aktive olan lokal makrofajlar fagosite ettikleri basilleri elimine eder ancak aktive olmamış olanlarda basiller tekrar çoğalmaya başlar. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtı tekrarlanarak, çoğalmayı önlemek için kazeöz nekroz alanlarını

genişletecektir. Tüberkülozda doku nekrozu ve kavern oluşması geç tip aşırı duyarlılıkla ilgilidir (Özbal 2006).

Tüberkülozun teşhisinde tüberkülin testi, tip 4 gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtı olup, antijeniyse tüberküloz basili kültür infiltratından purifiye edilen protein derivesi (PPD)'dir. (Soysal 2009). PPD antijen içeriğinin büyük bölümünü 10.000 Da molekül ağırlığındaki proteinler oluşturur. Ayrıca bazı polisakkarit ve lipidler de bulunabilir (Özbal 2006, Kılıçaslan 2007). Lenfositlerin aktivasyonuyla salınan lenfokin ve kemotaktik faktörlerin etkisiyle yangı hücreleri toplanarak doku hasarı ve nekroz gelişir (Vordermeier 1995).

1. 7. Tüberküloz'da Aşılama

Tüberkülozise karşı immünoprofilakside günümüzde insanlarda kullanılan tek ve canlı attenüe aşı *M. bovis* BCG'dir (Vordermeier ve ark 2002, Albay 2009). BCG, adenit ve osteit gibi nadir görülen yan etkilerine rağmen, uzun yıllar deri içi uygulanan, güvenli ve ucuz bir aşıdır (Colditz ve ark 1995, Yaramış 2003). Aşıyı Calmette ve Guérin, 1908 ile 1921 yılları arasında Paris'te Pasteur Enstitüsü'nde geliştirmiştir. *M. bovis*, sığır sütünden izole edilen virülent suş olup, safralı besiyerinde kültüre edilerek, her üç haftada bir 13 yıl boyunca Sauton Medium'da toplam 231 kez pasajlanarak attenüe edilmiştir. Attenüasyon sorası patatesli Sauton Buyyon, patatesli-safralı Sauton buyyon, patatesli-gliserinli-sığır etli buyyonda pasajlanmaya devam edilmiştir. İnsanlarda ilk olarak 1921 yılında canlı attenüe BCG aşısı olarak kullanılmaya başlanmıştır (Çelik 1994, Talbot ve ark 1997, Fine 2000, Yaramış 2003, Çavuşoğlu ve ark 2007, Özkınay ve Özkınay 2008, Albay 2009). 1932 yılından beri patatesli-safralı ve patatesli-safralı-sığır etli buyyonda pasajlar kullanılmamaktadır (Talbot ve ark 1997). Genetik çalışmalar, BCG genomunun delesyon ile 100'den fazla geni kaybettiğini göstermiştir (Yaramış 2003).

BCG oral olarak uygulandığında yüksek oranda servikal lenfadenopatiye sebep olduğundan (Fine 2000), deri içi uygulanmaktadır (T.C. Sağlık Bakanlığı 2003). Türkiye'de BGC Russia aşısı kullanılmaktadır. Farklı suşlardan üretilmiş olan aşıların koruyuculuğunun farklı olduğu ifade edilmiştir (Özkınay ve Özkınay 2008).

BCG aşısı, deri içine (intradermal) 0-12 aylık bebeklere 1/2 dizyem, daha yüksek yaş gruplarına 1 dizyem (0,1 ml.) uygulanır. 5-15 yıl süre ile %50-60

oranında tüberküloz enfeksiyonuna karşı koruma sağlamaktadır. (T.C. Sağlık Bakanlığı 2003). Sığırlarda BCG aşı uygulaması, tüberkülin deri testi ile pozitif reaksiyona neden olmakta, PPD pozitif olan sığırların kesime gönderilmesinden dolayıda aşı uygulanmamaktadır. Ayrıca, uzun süreli bir koruma sağlamamaktadır.

Sonuç olarak mevcut BCG aşısının etkinliği ve güvenilirliği ile ilgili endişeler yeni bir aşının gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Yapılan çalışmalarda rekombinant, attenüe, subunit ve DNA aşılarını kapsayan yaklaşık 200 aşı adayı içinde sadece rekombinant bir aşının etkinliğinin BCG aşısından daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Yaramış 2003, Buddle ve ark 2003).

1. 8. Teşhis

Robert Koch 1882 yılında ilk kez tüberküloz basilini mikroskobik olarak göstermiş, saf kültür olarak izole etmiş, laboratuar hayvanlarında hastalığı oluşturarak etken hasta ilişkisini ortaya koymuştur (Gedikoğlu 2003). O tarihten bu yana hastalığın hızlı, hassas ve doğru teşhisine yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Rishi ve ark 2007, WHO 2009).

Günümüzde insan ve sığırlarda tüberkülozun teşhisinde in vivo ve in vitro; asido-rezistans boyama (ARB), kültür, radyoloji, histopataloji, antijen tespit testleri, antikor tespiti, INF-γ testi, nükleik asit amplifikasyon testi, faja dayalı test yöntemleri kullanılmaktadır (OIE 2009, WHO 2009).

OIE tarafından sığırlarda tüberküloz enfeksiyonunun antemortem teşhisinde tüberkülin deri testi, alternatif olarak gamma interferon testi, posmortem teşhisinde; bakteriyoskopi (Ziehl–Neelsen, Floresans boyama, İmmunperoksidaz), histopatolojik muayene, kültür ve moleküler metotlar önerilmektedir (OIE 2009).

Ülkemizde, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Sığır Bovine Tüberkülozu Yönetmeliği'ne göre teşhis amaçlı PPD test kullanılmakta olup, bir sürüde ya da bölgede enfekte ve hasta hayvanların maksimum sayısının tespitini mümkün kılmak amacı ile tüberkülin testine ek olarak Bakanlık Diyagnostik Testler ve aşılar için standartlara ilişkin OIE Kılavuzu'nda, sığır tüberkülozu için belirtilen INF-γ testinin uygulanmasına izin vermektedir (Resmi Gazete 2009).

1. 8. 1. Bakteriyoskopi ve Kültür

Hücre duvarlarındaki yüksek lipid miktarından dolayı mikobakterilerin adi laboratuvar boyaları ile boyanmaları mümkün değildir. Bu nedenle bakteri içine boyanın girebilmesi için suda eriyen bir organik madde içinde eritilmesi ve boyama işlemi sırasında basillerin ısıtılmaları gerekir. Tüberküloz etkeni basil arilmetan, fuksin gibi aromatik metan halkasına sahip boyalar veya florokrom teknikler (rodamin, oramin) ile boyanabilir. Bu bakterilerin tespitinde boyama metodu Ziehl-Neelsen yönteminde boya olarak bazik fuksinin fenol içindeki eriyiği olan karbol-fuksin kullanılır. Hücre duvarında bulunan mikolik asit ile fuksin boyası birleşerek, miko-lat-fuksin kompleksini oluşturur. Bakteri, asit-alkol ile yapılan dekolarizasyona rağmen boyayı bırakmamayarak, mikroskopik olarak parlak kırmızı renkte görünür (Durupınar 1996, Sarıgüzel 2003).

Direk mikroskopik muayene, tüberkülozun laboratuvar tanısında hızlı, basit ve ucuz yöntemdir. Tüberküloz basilinin ikiye bölünme süresi ortalama 18 saat olduğundan, kültüre edilmesi ve izolasyonu uzun zaman almaktadır (Gedikoğlu 2003, Özkınay ve Özkınay 2008). Mikobakterilerin bu teknik ile tespiti, ilk kez 1882 yılında Ehrlich ve Ziehl tarafından önerilen ve 1883 yılında Ziehl tarafından modifiye edilen EZN (Ehrlich Ziehl-Neelsen) yada Aside Dirençli Boyama (ARB, Asido-Rezistant Bakteri, AARB; Asit-Alkole Rezistant Bakteri) ile mümkün olabilmektedir (Foulds ve Brien 1998, Ceyhan ve ark. 2010).

Ancak bakteriyoskopi ile etkenin görülebilmesi için örnekte ~5.000-10,000 basil/ml olması gerekmektedir. Mikroskopi ile basiller MTBC (*M. tuberculosis* complex) olarak tespit edilmesine rağmen tür olarak ayrım mümkün olmamaktadır. Ayrım için, in vitro şartlarda türe özgü nükleik asit bölgesinin çoğaltılması ile tespitini sağlayan nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) geliştirilmiştir (Saniç 2007).

Moleküler testlerdeki gelişmeler hızlı tanı için umut vermesine rağmen tüberkülozun teşhisinde altın standart kültürdür. Kültür için en sık kullanılan besiyerlerinden biri Lowenstein-Jensen (LJ), ucuz ve güvenilir bir besiyeridir. Ancak izolasyon yaklaşık 4-6 haftalık bir süre gerektirmektedir. Bu nedenle, BACTEC yöntemi ile daha erken sonuç alınabildiği için birçok ülkede LJ kültürü ile birlikte kullanılmaktadır (Palaci ve ark 1996, Pfyffer ve ark 1998). BACTEC yönteminde

radyoaktivite kullanımı, radyoaktif atık sorunu ve ileri teknoloji gerektirmektedir (Heifets ve ark 2000, Somoskovi ve ark 2000).

1. 8. 2. Hücresel Bağışıklığın Ölçülmesi

PPD tüberkülin deri testi

Tüberkülin testi, tüberküloz enfeksiyonunu teşhisinde en önemli tanı metotlarından biridir (Oğuz 2004). Test, mikobakteri ile enfekte canlıda, bakteri hücre duvarındaki kültür ekstreleri olan "tüberkülin"e karşı gelişen gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonunu gösterir (Ursavaş ve ark 2004). Günümüzde Old tüberkülin (OT) ve PPD (Purifiye edilmiş protein derivesi) olmak üzere 2 çeşit tüberkülin bulunmaktadır: OT ilk olarak 1890 yılında Koch tarafından gliserinli et suyunda tüberküloz basillerinin 100^{o}C'de öldürmesiyle hazırlanmış, tedavi ve tanı amaçlı kullanmayı denemiştir. Seibert ve Munday PPD (**P**urified **P**rotein **D**erivative =Saflaştırılmış Protein Türevi)'yi geliştirmiş, daha sonra 1941 yılında ise bugün yaygın olarak kullanılan standart PPD (PPD-S) geliştirilmiştir (Oğuz 2004, Ursavaş ve ark 2004).

Dünya Sağlık Örgütü tarafından kabul edilen tüm PPD preparatları için standart tüberkülin PPD lot numarası 49608 veya PPD-S'tir. Tüm tüberkülin preparatlarının gücü "tüberkülin ünitesi (TÜ)" olarak belirtilir ve 1-TÜ=0.00002 mg PPD-S içeren birim olarak tanımlanmıştır (0.1 ml'lik solusyonda 5-TÜ dozundaki 0.0001 mg PPD-S bulunmaktadır (Hueloner 1993, Oğuz 2004).

İntradermal PPD enjeksiyonunu takiben antijen, derideki dendritik hücreler (Langerhans hücreleri) tarafından alınarak bölgesel lenf düğümlerine taşınır. Lenf düğümlerindeki ve dolaşımdaki duyarlı Th1 hücreleri antijeni tanıyarak aktive olur ve enjeksiyon bölgesinde toplanır. Bölgeye toplanan T-lenfositleri tarafından IFN-γ, IL-2, IL-8, seratonin, lenfotaktin gibi maddeler salgılanır. Bu sitokinler nedeniyle bazofil ve makrofaj göçü artar ve hücresel düzeyde yangıya neden olur. Aşırı duyarlılık reaksiyonun sonucu olarak, 2-3 gün içinde enjeksiyon bölgesinde kızarıklık, ısı artışı ve şişkinlik meydana gelmektedir. Doku tahribinin en önemli nedeni ise, makrofajlar tarafından salınan serbest radikaller ve enzimlerdir (Bilgehan 1999, Erganiş ve İstanbulluoğlu 1999).

PPD insanlar için *M. tuberculosis*'den hazırlanmakta ve Dünya Sağlık Örgütü yada Amerikan Toraks Derneği (ATS) direktifine göre uygulanmaktadır. Tüberküloz basili ile enfekte olan kişide 4-16 hafta içerisinde gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşur. İntradermal PPD enjeksiyonunu takiben 48-72 saat içerisinde oluşan endurasyonun çapı değerlendirilir (Oğuz 2004).

Sığırlarda kullanılan PPD, *M. bovis* AN5 suşundan hazırlanmaktadır. Sığırlarda deri içi uygulanan Mamalian ve Avian PPD'nin dozu 2000 IU'den daha az olmamalıdır (OIE 2008, Resmi Gazete 2009). Tüberkülin testi ya boynun yan orta kısmından (*cervical fold skin test*) veya sadece Amerika'da olduğu gibi kuyruk kökünden (*caudal fold skin test*) deri içi uygulanabilmektedir. Avian ve Bovine PPD'nin uygulandığı karşılaştırmalı tüberkülin testiyle, hayvanların *M. bovis* ile enfeksiyonunu ya da *M. avium*, *M. avium* subsp. *paratüberkülozis* ve çevresel mikobakteriumlar ile duyarlı hale gelip-gelmediği ayırımı yapılabilmektedir. Enfekte sığırlar enfeksiyon başlangıcından 6-9 hafta sonra PPD enjeksiyonuna cevap verebilmektedir (Sayın 2010).

Gamma interferon (IFN-γ) testi

Tüberküloz enfeksiyonunda, insan ve hayvanlarda etkene karşı gelişen hücresel bağışıklığı in vitro ortaya koymak için kandaki IFN-γ düzeyi ölçülebilmektedir (Pollock ve Andersen 1997). Test, antijenlerle uyarılan T hücrelerinin salgıladığı IFN-γ seviyesinin (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) yöntemi ile belirlenmesi esasına dayanır (Taşbakan ve Sayıner 2008). IFN-γ testi, 1980 yılında Avusturalya'da sığır tüberkülozunun teşhisi amacıyla geliştirilen bir testtir. Testte, PPD Avian (A) ve Bovine (B) ya da diğer mikobakteriyel antijenler ile uyarılan tam kan ya da mononükleer hücre kültüründe, IFN-γ miktarı sandwich ELISA ile belirlenmektedir. Sığırlarda, *M. bovis* ile enfeksiyonundan 1-4 hafta sonra, tam kan hücre kültüründeki T-lenfositleri PPD Bovine ile uyarıldığında yüksek düzeyde IFN-γ salınımı şekillenmektedir. IFN-γ test kiti olan BOVIGAM, sığırlar dışında, koyun ve keçilerde de kullanılabilmektedir. Ancak kitin diğer memeli hayvanlar ve insanlarda kullanımı yoktur (Sayın 2010).

1994 yılında insanlarda *M. tuberculosis* ve *M. avium* enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılmaya başlanan IFN-γ testinin, ilk versiyonu olan Quantiferon-TB

testinde tam kan PPD ile *in vitro* olarak inkübe edilmekteyken, daha sonra geliştirilen Quantiferon-TB Gold testinde, spesifik antijenler olan ESAT-6 ve CFP-10 ile inkübe edilen tam kan süpernatantında, 24 saat sonra T hücrelerinin salgıladığı IFN-γ konsantrasyonu ölçülmektedir. Son yıllarda üçüncü bir antijen (TB 7.7) eklenerek Quantiferon- TB Gold In-Tube testi geliştirilmiştir (Taşbakan ve Sayıner 2008).

Ülkemizde Sığır Bovine Tüberkülozu Yönetmeliği (2009)' ne göre bir sürüde ya da bölgede enfekte ve hasta hayvanların maksimum sayısının tespitini mümkün kılmak amacı ile tüberkülin testine ek olarak, Bakanlık tarafından Diagnostik Testler ve aşılar için standartlara ilişkin OIE Kılavuzu'nda, sığır tüberkülozu için belirtilen IFN-γ testinin uygulanmasına izin verilebileceği belirtilmiştir.

Lenfosit poliferasyon testi

PPD Bovine ve PPD Avian antijenlerinef karşı lenfositlerin vermiş olduğu invitro hücresel bağışıklık reaksiyonu karşılaştırıldığı testin, sensitivite ve spesifitesi yüksektir. Çevresel mikobakterilerden kaynaklanan çapraz antijenlere karşı lenfositlerin cevabının ortadan kaldırılarak spesifitenin artırılıdğı test, tam kan ya da purifiye lenfositler ile gerçekleştirilmektedir (OIE 2009).

Test için alınan kan örnekleri kısa süre içerisinde laboratuara ulaştırılması ve özel laboratuar ekipmanı gerekmektedir. Ayrıca inkübasyon periyodunun uzun olması, radyoaktif nükleotidlerin kullanılması ve laboratuarlar arası standardizasyonun sağlanamaması gibi nedenler dolayısıyla rutin kullanımı olmayıp sadece bilimsel çalışmalarda kullanılmaktadır (OIE 2009).

1. 8. 3. Humoral Bağışıklığın Ölçülmesi

Tüberkülozun seyri sırasında mikobakteriyel antijenlere karşı humoral bağışıklığında oluştuğu ve IgG, IgA ile IgM antikorlarında artış olduğu bildirilmiştir (Eriş ve ark 2000). Tüberkülozun serolojik teşhisinde, aglütinasyon testleri, Kompleman Fikzasyon (CFT), pasif hemaglütinasyon ve jel presipitasyon testleri ile immunelektroforez ve immunfloresan gibi yöntemler tanımlanmıştır. Ancak, testlerin duyarlılık ve özellikle de özgüllüklerinde yetersizlikle karşılaşılmıştır (Bengisun ve ark 1997). Bunun en önemli nedeni, çevrede yaygın mikobakterilerin çapraz

reaksiyonu ve henüz hangi antijen veya antijenlerin daha doğru sonuç verdiğinin kesinlik kazanmamış olmasındandır (Eriş ve ark 2000).

Son 15 yılda değişik antijenler kullanılarak ELISA kitleri geliştirilmesine rağmen, rutin kullanıma geçirecek duyarlılık ve özgüllük elde edilememiştir (Eriş ve ark 2000). Bununla birlikte, işletmelerin kan almak için sadece bir kez ziyaret edilmesi, toplanan serum örneklerinin farklı hastalıkların teşhisi içinde kullanılabilecek olması ve dondurularak uzun süreler saklanabilmesi, hayvanlara herhangi bir ajan enjekte edilmediği için immün sistemin etkilenmemesi ve testin tekrar uygulanabilmesi, ucuz ve basit olması gibi avantajları bulunmaktadır (Sayın 2010).

1. 8. 4. Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemler, geleneksel yöntemlerle tanısı zaman alıcı ve zahmetli olan yavaş üreyen patojenlerin (mikobakteriler gibi) erken tanı ve tedavilerinde güvenilir ve hızlı sonuçlar veren testlerdir. Mikobakterilerin klinik örnekten teşhisi, tür düzeyinde ayrımı, ilaç dirençliliğinin tespiti ve epidemiyolojik araştırmalarda kullanılmaktadır. Nükleik asit tabanlı yöntemler standardizasyon gerektirmesi ve bir kısmınında yüksek maliyet ve/veya deneyimli personele ihtiyaç duyulması nedeniyle kullanımları kısıtlıdır (Esen 2003, Raqib ve ark 2003).

Kültürde üreyen mikobakterilerin kısa sürede tür düzeyinde tanımlanmasını sağlamak amacıyla çeşitli moleküler tanı sistemleri geliştirilmiştir. 16S rRNA, 23S rRNA, hsp65, 16S-23S rRNA ara bölgesi, IS 6110 gibi gen bölgeleri amplifikasyon yöntemleri ile çoğaltma sonrası; prob hibridizasyon, DNA dizi analizi, DNA Microarray, RFLP (Restriction fragment length polymorphism), spoligotyping yöntemleri ile mikobakteriler cins ve tür düzeyinde tanımlanabilmektedir (Karabulut 2008). 16S rDNA dizilendirme ve hsp65 PCR-REA yöntemleri tüberküloz laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Ayrıca sadece patojen olan mikobakteri türlerini identifiye edebilmeyi sağlayan ticari DNA hibridizasyon kitleri, rutini yoğun olan laboratuvarlara maliyeti yüksek fakat daha kolay bir alternatif sunmaktadır (Köksalan 2010).

M. avium kompleks üyelerinin tür düzeyinde ayırımı için farklı moleküler metotlar bulunmaktadır. *M. avium* ve *M. intracellulare* kültürleri arasındaki ayrım,

ticari nükleik asit hibridizasyon probları ile yapılabilmekte, ayrıca *M. genavense'* nin de bu testler ile ayrımı mümkün olmaktadır. *M. avium* kompleksinde dahil olduğu mikobakteriyel kültürlerin çeşitli in-house moleküler yöntemlerle yapılabildiği bildirilmiştir (OIE 2008).

Kanatlıların tüberküloz vakalarından izole edilen *M. avium* subsp. *avium* suşlarında tekrarlayan kopyalar halinde bulunan IS901 sekansı aynı zamanda patojenite ile de ilişkilendirilmektedir. IS901, *M. avium'* un sadece 3 serotipinde (serotip 1, 2 ve 3) tespit edilmiş, bu serotiplerin kanatlılar için daha patojenik olabileceği bildirilmiştir (OIE 2008).

Erganiş ve ark (2010) Türkiye'de ilk defa yaban koyunlarının bağırsaklarından izole edilen 3 *M. avium* subsp. *paratuberculosis* suşu ile referans suşun PZR analizlerinde, tür spesifik primerler ile farklı bandlar oluşturması saha ile referans suşlar arasında moleküler farklılıklar olduğunu, referans suşların aynı suşlar olmasına rağmen farklı besiyerlerinde yada pasajlama sonrasında moleküler olarak farklılaşabildiğini bildirmişlerdir.

Mycobacterium tuberculosis kompleks ve diğer mikobakteri türlerinin ayırımında, tüm mikobakteri türlerinde bulunan ısı şok proteinini kodlayan gen (*hsp65*) bölgesinin analizi sıklıkla kullanılmaktadır. *M.tuberculosis* kompleks türlerinin tanımlanmasında, mikobakteri DNA' sının süper sarmal reaksiyonunu ATP varlığında katalizleyen DNA giraz enziminin bir alt ünitesi olan "*gyr*B" proteinini kodlayan gen bölgesinin belirlenmesi önemlidir (Ağaçayak ve ark 2007).

Mikobakteri suşlarının dağılım farklılıklarının/benzerliklerini ortaya koymak için standart ve tek bir yöntemin kullanılmasına 1993'te başlanmıştır. IS*6110* yöntemi fazla sayıda suşun tiplendirmesi gereken durumlarda yetersiz kalmaktadır. Aynı zamanda yoğun emek gerektiren bir yöntemdir. Buna karşılık PZR bazlı iki yöntem olan spoligotyping ve MIRU-VNTR (Variable Number Tandem Repeats of Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Mikobakterilerdeki tekrarlayan ünitelerin değişken sayıda tekrarları) PZR analizi fazla sayıda suş bulunan çalışmalar için iyi bir alternatif olup, IS*6110*-RFLP yöntemine göre çok daha hızlı sonuç vermektedir (Köksalan 2010).

Mycobacterium tuberculosis kompleks izolatlarının hızlı ve yüksek çözünürlüklü genotiplendirme yöntemi olan Variable Number Tandem Repeat

(VNTR) dizileri, genetik olarak yüksek homojeniteye sahip farklı patojenlerle (*Bacillus anthracis, Yersinia pestis* ve MTBC gibi) yapılan moleküler epidemiyolojik araştırmalarda kullanılmaktadır. *M. tuberculosis* kompleks üyelerinin genomlarında, büyüklükleri 50-100 bp arasında değişen 41 farklı VNTR bölgesi MIRU olarak adlandırılmıştır. MIRU bölgelerini kapsayan ve komşu bölgeleri tanıyan primerler kullanılarak tespit edilen band büyüklükleri MIRU lokusunun tekrar sayısının belirlenmesini sağlar. Daha sonra, elde edilen kopya sayıları kullanılarak oluşturulan sayısal kodlamayla her suşun kendine özgü VNTR profili ortaya çıkar. Epidemiyolojik araştırmalarda önceleri 12 lokus MIRU primerleri kullanılırken, daha sonra geliştirilen 15 ve 24 lokustan oluşan MIRU setleriyle çalışmalar yapılmıştır (Supply ve ark 2006, Boniotti 2009).

1. 8. 5. Deneme Hayvanı Testi

Deneme hayvanlarından enfekte materyal veya şüpheli kolonilerden etken izolasyonu ve identifikasyonu için yararlanılmaktadır. Bunun için daha çok kobaylar kullanılmaktadır. İnguinal lenf yumruları yakınına deri altı olarak marazi maddelerden hazırlanan inokulum verilen kobayların, 6-8 hafta sonra otopsisi yapılarak iliakal ve subiliakal lenf düğümlerinden bakteriyoskopi ve kültür yapılmaktadır (Akay 1997, Koneman 2006, Yardımcı 2006).

Bu çalışmada, insan ve hayvanlardan izole edilen mikobakteri suşlarının PZR yöntemi ile klinik materyalden doğrudan tespiti ve rutin teşhiste kullanabilirliğinin araştırılması, sığır, insan ve kanatlı mikobakterilerin izolasyonu ve moleküler teşhis metotları ile tiplendirilmesi ve orijinlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2. 1. GEREÇ

2. 1. 1. Sığır, Kanatlı Organ ve Doku Materyali

Bu çalışmada, Konya'daki mezbahalar ile teşhis amacıyla Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne gönderilen tüberküloz şüpheli toplam 81 sığıra ait 33 granülom ve 65 mediastinal lenf yumrusu örnekleri kullanıldı.

Konya İlinde bulunan güvercin pazarları, arka bahçe kümesçiliği yapan kişilerden ve Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne tüberküloz şüpheli getirilen 9'u güvercin, 2'si tavuk, 1'i hindi ve 1'i devekuşu olmak üzere 13 kanatlıdan 13 karaciğer, 5 bağırsak ve 11 dalak alındı.

2. 1. 2. İnsan Mikobakterium Suşları

Ankara Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Tüberküloz Laboratuvarında insanlardan izole edilen ve kültür koleksiyonlarında bulunan 50 adet mikobakterium suşu tiplendirme amacıyla çalışmada kullanıldı. Mikobakteri izolatları Middlebrook ADC Enrichment (Difco, 212352, USA) katılarak zenginleştirilen Middlebrook 7H9 broth (Difco, 271130, USA)'da saklandı.

2. 1. 3. Referens Mikobakterium suşları

M. tuberculosis H 37Rv, *M. bovis* EMKVE ve *M. avium* ATCC 2529 suşları çalışmada referens suşlar olarak kullandı. *M. tuberculosis* H 37Rv ve *M.avium* ATCC 2529 suşları Türkiye Halk Sağlığı Kurumundan, *M. bovis* EMKVE suşu Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından temin edildi.

2. 1. 4. Bakteriyoskopi

Dekontamine işleminden elde edilen süspansiyondan direkt mikroskopi için preparat hazırlandı ve Ziehl-Neelsen metodu ile boyandı.

Fenollü karbol fuksin

Bazik fuksin 3 gr
Etanol (%95) 100 ml
Fenol 5 gr
Distile su 100 ml

Bazik fuksin havan içinde, üzerine alkol ilave edilerek ezildi (Solüsyon 1). Fenol kristal halde olduğu için 45–50 ºC'ye ısıtılarak eritildi ve üzerine distile su eklenerek homojen bir karışım elde edildi (Solüsyon 2). 10 ml solüsyon 1, 90 ml solüsyon 2 ile karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlandı. Boya solüsyonu hazırlandıktan sonra koyu renkli kapaklı şişelere aktarıldı, 24 saat bekletilerek, filtre edildikten sonra kullanıldı.

Asit-alkol (%3 w/v)

HCl (%37,5) 3 ml
Etanol (%95) 97 ml

Metilen mavisi

Metilen mavisi 0,3 gr
Distile su 100 ml
Metilen mavisi havanda ezildikten sonra distile su eklenerek eritildi. Boya solüsyonu süzüldükten sonra koyu renkli şişelere aktarıldı.

2. 1. 5. Kültür

Dekontaminasyon

Tüberküloz şüpheli örnekler stomacher'de (IUL Instruments, Spain) parçalanarak, kontaminant bakterilerin inaktivasyonu amacıyla %1,5 HPC (Hexadecylpyridinium Chloride- Sigma 52340, Germany) ile dekontaminasyona tabi tutuldu (Corner ve Trajstman 1988, Ambrosio ve ark 2008).

Mikobakterilerin izolasyonu için besiyerleri

Mikobakteriumların izolasyonu amacı ile gliserinli ve piruvatlı Lowenstein-Jensen besiyeri (Merck VM049700, Germany), üretilen suşların stoklanması ve fazla miktarda üretilmesi için, Middlebrook ADC Enrichment (Difco, 212352, USA) ile zenginleştirilen, Middlebrook 7H9 broth (Difco 271310, USA) kullanıldı.

Sodyum piruvat

*M. bovis'*i kültüre etmek için Lowenstein-Jensen besiyerine ilave edildi (Sigma, P2256 Germany).

Gliserol

M. avium ve *M. tuberculosis'*i kültüre etmek için Lowenstein-Jensen besiyerine ilave edildi (Merck 1040942500, Germany).

2. 1. 6. Moleküler Metotlar

Tüberküloz şüpheli doku ve organlar ile izolasyonu yapılan mikobakteriumlardan DNA ekstraksiyonu yapılarak PZR, REA (Restriksiyon Enzim Analiz) ve 12 lokus MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number Tandem Repeats) analizi yapıldı.

DNA ekstraksiyonu

Tüberküloz şüpheli doku ve organlar ile izolasyonu yapılan mikobakteriumlardan DNA ekstraksiyonu DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN-69506, Germany) kiti ile yapıldı. Ekstraksiyon aşamaları üretici firmanın belirttiği şekilde gerçekleştirildi.

DNA amplifikasyonu

Taq polimeraz

3X1 ml 10XKCl'lü, 3X1 ml 10X(NH4)2SO4'lü TaqBuffer, 3X1 ml 25 Mm MgCl2 içeren Taq DNA polimeraz (Fermantas 5 U/µl, EP0402) kullanıldı.

Deoksi nükleotid trifosfat set

dNTP set (Fermentas 4x10 µlmol, R0185), istenilen molaritede distile su ile sulandırılarak kullanıldı.

Marker

50 bp DNA ladder plus (Fermentas 50 µg SM0321) ve 100 bp DNA ladder (Bioron 50 µg 304005) kullanıldı.

PZR pozitif kontroller

M. bovis EMVKAE, *M. tuberculosis* H 37 Rv ve *M. avium* ATCC 2529, suşlarından hazırlanan DNA ekstraksiyonları kullanıldı.

Primerler

Mycobacterium tuberculosis complex suşlarının ayrımı için, *gyr*B gen bölgesinin tespiti için primerler seçildi;

***M. tuberculosis* kompleksin tespiti için;**

MTUB_C-gyrBf : 5'- TCG-GAC-GCG-TAT-GCG-ATA-TC-3'

MTUB_C-gyrBr : 5'-ACA-TAC-AGT-TCG-GAC-TTG-CG-3'

***M. tuberculosis* tespiti için spesifik 734 bp fragmentini kodlayan;**

MTUB-gyrB-756-Gf-5'- GAA GAC GGG GTC AAC GGT G-3'

MTUB-gyrB-1450-Cr-5' -CCT TGT TCA CAA CGA CTT T CGC-3'

primerleri kullanıldı (Kasai ve ark 2000, Chimara ve ark 2004).

***M. avium* suşlarında bulunan IS*901* gen bölgesini tespit için;**

P1-IS901 : 5′-GCA ACG GTT GTT GCT TGA AA-3′

P2-IS901 : 5′-TGA TAC GGC CGG AAT CGC GT-3′ (Kunze ve ark 1992, Pavlik ve ark 2000)

12 Lokus MIRU-VNTR metodu için (Skuce ve ark 2002, Smittipat 2005, Zeytinli 2010)

Hedef Bölge		**PZR primer (5' to 3')**
MIRU 2a	**:**	5’-TGG ACT TGC AGC AAT GGA CCA ACT-3’
MIRU 2b	**:**	5’-TAC TCG GAC GCC GGC TCA AAA T-3’
MIRU 4a	**:**	5’-GCG CGA GAG CCC GAA CTG C-3’
MIRU 4b	**:**	5’-GCG CAG CAG AAA CGT CAG C-3’
MIRU 10a	**:**	5’-GTT CTT GAC CAA CTG CAG TCG TCC-3’
MIRU 10b	**:**	5’-GCC ACC TTG GTG ATC AGC TAC CT-3’
MIRU 16a	**:**	5’-TCG GTG ATC GGG TCC AGT CCA AGT A-3’
MIRU 16b	**:**	5’-CCC GTC GTG CAG CCC TGG TAC-3’
MIRU 20a	**:**	5’-TCG GAG AGA TGC CCT TCG AGT TAG-3’
MIRU 20b	**:**	5’-GGA GAC CGC GAC CAG GTA CTT GTA-3’
MIRU 23a	**:**	5’-CAG CGA AAC GAA CTG TGC TAT CAC-3’
MIRU 23b	**:**	5’-CGT GTC CGA GCA GAA AAG GGT AT-3’
MIRU 24a	**:**	5’-CGA CCA AGA TGT GCA GGA ATA CAT-3’
MIRU 24b	**:**	5’-GGG CGA GTT GAG CTC ACA GAA-3’
MIRU 26a	**:**	5’-CCC GCC TTC GAA ACG TCG CT-3’
MIRU 26b	**:**	5’-TGG ACA TAG GCG ACC AGG CGA ATA-3’
MIRU 27a	**:**	5’-TCG AAA GCC TCT GCG TGC CAG TAA-3’
MIRU 27b	**:**	5’-GCG ATG TGA GCG TGC CAC TCA A-3’
MIRU 31a	**:**	5’-ACT gAT TGG CTT CAT ACG GCT TTA-3’
MIRU 31b	**:**	5’-GTG CCG ACG TGG TCT TGA T-3’
MIRU 39a	**:**	5’-CGC ATC GAC AAA CTG GAG CCA AAC-3’
MIRU 39b	**:**	5’-CGG AAA CGT CTA CGC CCC ACA CAT-3’
MIRU 40a	**:**	5’-GGG TTG CTG GAT GAC AAC GTG T-3’
MIRU 40b	**:**	5’-GGG TGA TCT CGG CGA AAT CAG ATA-3’

primerleri kullanıldı, oligonükleotid primeleri IDT DNA (USA) sentezlettirildi.

Agaroz jel elektroforez

Tris asetat (TBE) tamponu (10X)

Tris base 60,5 gr

Borik asit 30,85 gr

$Na_2EDTA.2H_2O$ 3,72 gr

Distile su ile 1000 ml tamamlandı.

Agaroz jel (% 1,5) (w/v)

Agaroz 3 gr

TBE 200 ml

Etidyum bromür stok solüsyonu (10 mg/ml)

Ethidyum bromür 20 mg

Distile su 1.98 ml

Karanlıkta muhafaza edilerek, agaroz jele 0,5 µg/ml oranında katıldı.

Yükleme tamponu

Çoğaltılan DNA'ların boyanması amacı ile, 6X loading dye solüsyonu (Sigma G 7654, USA) kullanıldı.

Örneklerin jele yüklenmesi için 18 göze sahip (20x0.1x8) taraklar ile agaroz jelde çukurlar açılarak, 1,4 µl (6x) yükleme tamponu ile 7 µl PZR ürünü karıştırılarak jele yüklendi.

2. 1. 7. Restriksiyon Endonüklez Analizi (REA)

M. tuberculosis ve *M. bovis* suşlarınn ayrımı için *M. tuberculosis* kompleks (1020 bp) pozitif bulunan insan ve sığır suşlarının PZR ürünleri **RsaI enzimi** (Fermentas 10 U/µl, ER1121 ve **SacII(Cfr421)** (Fermentas Fermentas 10 U/µl, ER0201) enzimleri ile kesildi.

2. 2. YÖNTEM

2. 2. 1. Bakteriyoskopi

Ziehl-Neelsen boyama

a) Hazırlanan preparatların 10 dakika Etil alkol ile tespiti yapıldı.

b) Lam üzerine 10 ml karbol fuksin konuldu. Alttan 4-5 dakika ısıtıldı.

c) Boya dökülerek asit-alkol ile 30 sn renksizleştirildi.

d) Su ile yıkandı.

e) Preparat üzerine metilen mavisi dökülerek 10-15 sn boyandı.

f) Preparat yıkanarak kurutuldu, mikroskopta (Olympus CH20 Bioküler ışık mikroskobu) immersiyon objektifte incelendi. Mikobakteriumlar pembe, diğer mikroorganizmalar ve zemin mavi renkte gözlendi (Arda 1997).

2. 2. 2. Kültür

Lowenstein-Jensen besiyerinin hazırlanışı

LJ toz besiyerinden, 37,5 gr 600 ml distile suda eritilerek otoklavlandı. Otoklavlama öncesi *M. avium* ve *M. tuberculosis*'in üremesini artırmak için besiyerine 12 ml gliserol, *M. bovis* için ise sodyum piruvat (4 g/L) eklendi. Günlük tavuk yumurtaları (1 litre) mikserde steril olarak homojenize edildi, 50 °C'ye soğutulan besiyerine ilave edildi. Steril vida kapaklı tüplere 10'ar ml besiyeri dağıtıldı, yumurtanın koaguleasyonu için yatık olarak 85-90 °C'de 45 dakika 24 saat ara ile iki kez tutuldu. Besiyerleri +4 °C'de muhafaza edildi.

Middlebrook 7H9 broth hazırlanması

Toz besiyerinden, 900 ml distile suda 4,7 g eritilip, otoklav edildi. 45°C'ye kadar soğutulan besiyerine 100 ml Middlebrook ADC Enrichment ilave edildi (pH 6,6). Gliserin ihtiyacı gösteren mikobakteriumların üretilmesi için besiyerine otoklavlama öncesi 2 ml gliserin, piruvat ihtiyacı için 4 g sodyum piruvat ilave edildi.

Örneklerin dekontaminasyonu

Dekontaminasyon için 3-5 g lezyonlu doku örneği alınarak, 10 ml. steril %0.85'lik Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) ile karıştırıldı. Elde edilen karışımdan 1 ml alınarak eşit miktarda %1,5 HPC (Hexadecylpyridinium Chloride- Sigma 52340 Belgium) ile 2 ml lik vida kapaklı steril tüplere aktarıldı. Oda ısısında 30 dakika muamele edilerek 2500 rpm'de 20 dakika santrifüj yapıldı. Üst sıvı atılarak 1 ml steril %0,85'lik FTS ilave edildi.

Besiyerine ekim

Dekontamine edilen örneklerden 100' er µl alınarak piruvatlı (Sigma P2256, Japan, *M. bovis* için) ve gliserollü (Merck 1040942500, Germany, *M. tuberculosis* ve *M. avium* için) Lowenstein-Jensen besiyerine ekimler yapıldı. Besiyerleri 37^{o}C'de 8 hafta etüvde inkubasyona bırakıldı. Ekim yapılan besiyeri tüplerinin haftada birkaç kez kapakları açılarak oksijen girişi sağlandı (Corner ve Trajstman 1988, Ambrosio ve ark 2008). Besiyerlerinde gözle görülür koloniler mikobakteriler yönünden şüpheli kabul edildi. Şüpheli izolatlar Middlebrook ADC Enrichment (Difco, 212352, USA) katılarak zenginleştirilen Middlebrook 7H9 broth (Difco, 271130, USA)'da saklandı

2. 2. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

DNA İzolasyonu

Dokudan ve Kültürden DNA İzolasyonu

Tüberküloz şüpheli doku ve organlar ile izolasyonu yapılan mikobakteriumlardan DNA ekstraksiyonu DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN-69506, Germany) kiti ile yapıldı. Ekstraksiyon aşamaları üretici firmanın belirttiği şekilde gerçekleştirildi.

DNA ekstraktlarının absorbans tayini

DNA örnekleri, 260 nm ve 280 nm dalga boylarında saflık ve miktar tayini için ekstraksiyon sonrası spektrofotometre (Eppendorf, Model 6131) ile optik dansiteleri (OD) ölçüldü. Distile su ile 50 µl DNA örneği 100 µl'ye tamamlandı. 260

nm (OD260) ve 280 nm (OD280) dalga boylarında ölçümler yapılarak, ng/ml cinsinden DNA örneklerinin konsantrasyonları belirlendi.

OD260 ve OD280 değerlerine göre hesaplanan DNA miktarları OD260/OD280 şeklinde oranlanarak, 1,8-2,0 arasında tespit edilenler PZR'da kullanılırken, DNA miktarı bu miktardan daha düşük olanların ekstraksiyon işlemi tekrarlandı.

DNA amplifikasyonu

***M. tuberculosis* kompleks DNA amplifikasyonu**

Dokudan ekstrakte edilen ya da Lowenstein-Jensen besiyerinde üreyen bakterilerden elde edilen mikobakterium şüpheli DNA'ların, ilk olarak *M. tuberculosis* kompleks yönünden PZR analizleri yapıldı. PZR için, *M. tuberculosis* kompleks türlerinde *gyr*B gen bölgesi, 1020 bp (baz pair) fargmenti kodlayan; **MTUB_c-gyrBf**-5'-TCG GAC GCG TAT GCG ATA TC–3' ve **MTUB_c-gyrBr**-5'-ACA TAC AGT TCG GAC TTG CG–3 primerleri kullanıldı (Chimara ve ark 2004, Kasai ve ark 2000). PZR; 5 µl PZR buffer (KCl'lü), 3 µl $MgCl_2$ (25 mM), 1 µl dNTP set (10 mM) 1 µl l (1 µl M) her bir primerden (MTUB_C-gyrBf ve MTUB_C-gyrBr) , 0.25 µl (1.25 U) Taq DNA polimeraz, 33,75 µl steril ultra saf su ve 5 µl DNA ekstraktı içeren 50 ml. konsantrasyonda gerçekleşti.

Amplifikasyon işlemi için PZR termal cycler (MJ Research PTC-100 USA) cihazında; 95 ^{o}C'de 10 dak. ön denatürasyonu takiben, 94 ^{o}C'de 1 dak. denatürasyon, 65 ^{o}C'de 1 dak soğutma, 72 ^{o}C'de 1 dak ekstensiyon ve 72 ^{o}C'de 10 dak. son zincir uzamasından oluşan 35 devirlik bir program uygulandı.

Örnek analizi için 5 µl PZR ürünü, 1 µl loading dye (Sigma, G7654) ile boyanarak, 5 µg/ml etidyum bromid içeren %1.5 agarose jel (Seakem, 50002, USA) içinde 125 V'ta elektroforeze (EC App. Coorp. EC135 USA) tabi tutularak UV transilluminatörde incelenerek, görüntülendi. Oluşan bandların büyüklükleri standart 100 bp DNA marker (100 bp DNA ladder (Bioron 50 µg 304005) ile karşılaştırılarak değerlendirildi. 1020 bp büyüklüğünde bant veren DNA örnekleri *M. tuberculosis complex* yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Kasai ve ark 2000, Chimara ve ark 2004). Pozitif kontrol olarak *M tuberculosis* H37 Rv suşu, negatif kontrol olarak ise *M. avium* ATCC 25291 suşu referens olarak kullanıldı.

M. tuberculosis DNA amplifikasyonu

M. tuberculosis ve *M. bovis* suşlarında *gyrB* gen bölgesi 1020 bp de pozitif band verdiğinden dolayı ayrım için *M. tuberculosis* için spesifik 734 bp fragmenti kodlayan **MTUB-gyrB-**756-Gf 5'-GAA GAC GGG GTC AAC GGT G ve **MTUB-gyrB-**1450-Cr 5'-CCT TGT TCA CAA CGA CTT T CGC–3' primerleri ile *M. tuberculosis* H 37 Rv referans suşuna PZR uygulandı (Kasai ve ark 2000).

PZR 50 µl konsantrasyonda; 5 µl PZR buffer (KCl'lü), 3 µl $MgCl_2$ (25 mM), 1 µl dNTP set (10 mM) 1 µl l (1 µl M) her bir primerden (MTUB_c-gyrB-756 Gf' ve MTUB-c-gyrB-1450-Cr) , 0.25 µl (1.25 U) Taq DNA polimeraz, 33,75 µl steril ultra saf su ve 5 µl DNA ekstraktından oluştu.

Amplifikasyon işlemi PZR termal cycler (MJ Research PTC-100 USA) cihazında; 95^{o}C'de 10 dak. ön denatürasyonu takiben, 94 ^{o}C'de 1 dak. denatürasyon, 65^{o}C'de 1 dak. soğutma, 72^{o}C'de 1 dak. ekstensiyon ve 72^{o}C'de 10 dak. son zincir uzamasından oluşan 35 devirlik bir program uygulandı.

Örnek analizi için 5 µl. PZR ürünü, 1 µl loading dye (Sigma, G7654) ile boyanarak, 5 µg/ml etidyum bromid içeren %1,5 agarose jel (Seakem, 50002, USA) içinde 125 V'ta elektroforeze (EC App. Coorp. EC135 USA) tabi tutularak UV transilluminatörde görüntülendi. Oluşan bandların büyüklükleri standart 100 bp DNA marker (Bioron 50 µg 304005) ile karşılaştırılarak değerlendirildi (Kasai ve ark 2000, Chimara ve ark. 2004). 734 bp büyüklüğünde bant veren DNA örnekleri *M. tuberculosis* pozitif olarak kabul edildi (Kasai ve ark 2000).

Mycobacterium avium subsp. *avium* suşları

M. avium subsp. *avium* türlerinde bulunan IS 901 gen bölgesi üzerinde 1108 bp fragmenti kodlayan **P1-IS*901*** 5′-GCA ACG GTT GTT GCT TGA AA-3′ ve **P2-IS*901*** 5′-TGA TAC GGC CGG AAT CGC GT-3′ primerleri ile *M. avium* ATCC 25291 referans suşuna PZR uygulandı (Kunze ve ark 1991, Pavlik ve ark 2000).

PZR 50 µl konsantrasyonda; 5 µl PZR buffer (KCl'lü), 3 µl $MgCl_2$ (25 mM), 1 µl dNTP set (10 mM) 1 µl l (1 µl M) her bir primerden (P1-IS901 ve P2-IS901) , 0.25 µl (1.25 U) Taq DNA polimeraz, 33,75 µl steril ultra saf su ve 5 µl DNA ekstraktından oluştu. Amplifikasyon işlemi PZR termal cycler (MJ Research PTC-100 USA) cihazında, 94^{o}C'de 1 dak ön denatürasyonu takiben, 94^{o}C'de 30 sn

denatürasyon, 65°C'de 2 dak soğutma, 72°C'de 1,5 dak ekstensiyon ve 72 °C'de 5 dak son zincir uzamasından oluşan 35 devirlik bir program uygulandı (Kunze ve ark 1991). Örnek analizi için 5 µl. PZR ürünü, 1 µl loading dye (Sigma, G7654) ile boyanarak, 5 µg/ml etidyum bromid içeren %1,5 agarose jel (Seakem, 50002, USA) içinde 125 V'ta elektroforeze (EC App. Coorp. EC135 USA) tabi tutularak UV transilluminatörde incelenerek, görüntülendi. Oluşan bandların büyüklükleri standart 100 bp DNA marker (Bioron 50 µg 304005) ile karşılaştırılarak değerlendirildi (Kunze ve ark 1991, Pavlik ve ark 2000). Marker olarak 100 bp DNA ladder (Bioron 50 µg 304005), pozitif kontrol olarak *M. avium ATCC 25291*, negatif kontrol olarakta *M. tuberculosis H 37 Rv* suşları kullanıldı. 1108 bp büyüklüğünde bant veren örnekler *M. avium* subsp. *avium* pozitif olarak değerlendirildi.

2. 2. 4. Restriksiyon Enzim Analizi (REA)

M. tuberculosis kompleks REA

M. tuberculosis kompleks PZR pozitif suşların tür düzeyinde ayırımı için, 1020 bp'lik PZR ürünlerine Chimara ve ark (2004), Kasai ve ark (2000), Nieman ve ark (2000b) belirttikleri metoda göre RsaI ve SacII enzimleri ile restriksiyon enzim analizi yapıldı.

RsaI enzimi ile REA için 10 µl PZR ürüne 1 µl RsaI enzimi, 2 µl 10XBuffer Tango ve 18 µl distle su karıştırılarak birkaç dakika vortekslenerek, 37 °C'de 16 saat inkube edildi. SacII (Cfr421) ile REA için 10 µl PZR ürüne 1 µl RsaI enzimi, 2 µl 10XBuffer B ve 18 µl distle su karıştırılarak birkaç dakika vortekslenir. 37 °C'de 16 saat inkube edildi.

Marker olarak 100 bp'lık bant oluşturan marker kullanıldı, değerlendirme Nieman ve ark (2002) ile Chimara ve ark (2004) bildirdiği metoda göre aşağıdaki şekilde (Çizelge 2. 1**)** değerlendirildi.

Çizelge 2. 1. REA analizi değerlendirme çizelgesi

RsaI (5'…GT ↓ AC…3'), (3'…CA ↑ TG…5')	
M. tuberculosis *M. africanum subtype II* *M. africanum subtype I*	360/560 bp
M. bovis,(Pyrazinamid (PZA) dirençli) *M. bovis* subsp. *caprae* (PZA duyarlı)	360/480 bp
M. microti	360/660 bp
SacII (5'…CCGC ↓GG…3'), (3'…GG ↑ CGCC…5')	
M. bovis (PZA dirençli) *M. bovis* BCG	Kesim Yok
M. bovis subsp. *caprae* (PZA duyarlı)	280/740 bp

2. 2. 5. MIRU-VNTR Analizi

M. bovis izolatlarının hedeflenen MIRU lokusları için Çizelge 2.1'de verilen primerler kullanıldı. Her bir suşa özgü 12 MIRU lokusunun VNTR sayısının belirlenmesi PZR reaksiyonu ile gerçekleştirildi (Skuce ve ark 2002, Smittipatt 2005, Niemann ve ark 2010).

PZR için reaksiyon karışımı aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

dH_2O	2,170µl
DMSO	0,250µl
2X PZR Master mix	3,125µl
Forward Primer	0,040µl
Rewerse Primer	0,040µl
DNA	0,625µl
Toplam	**6,250µl**

2X PZR Master Mix:

4 mM	$MgCl_2$
1,6 mM	dNTP mix (her bir dNTP 0,4 mM)
0,05 u/ µl	Taq DNA Polimeraz içermektedir.

Amplifikasyon işlemi için; thermal cycler'da (MJ Research PTC-100 USA) 94^{o}C'de 5 dak ön denatürasyonu takiben, 95^{o}C'de 30 sn denatürasyon, 62^{o}C'de 1 dak soğutma, 72^{o}C'de 1,5 dak ekstensiyon ve 72 ^{o}C'de 10 dak son zincir uzamasından oluşan 40 devirlik bir program uygulandı.

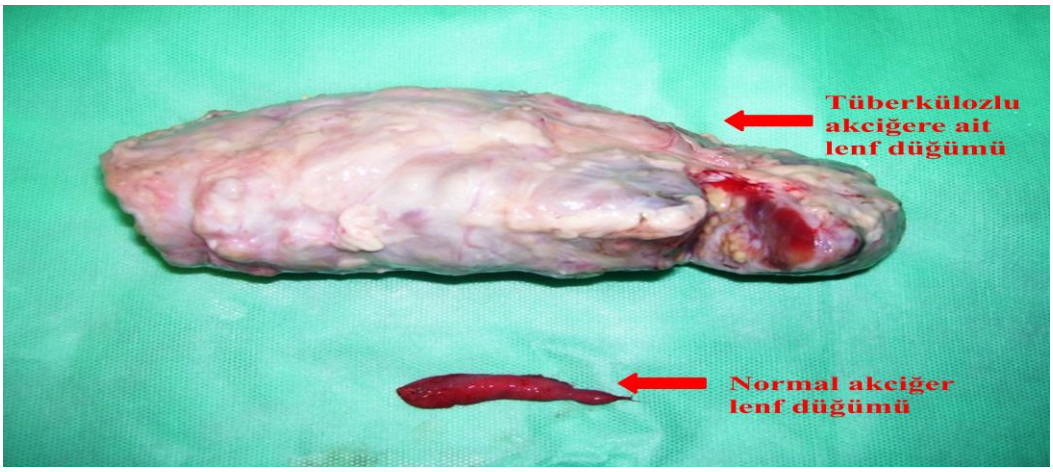
Amplikonlar 120 Voltta, 60 dakika, etidyum bromürlü %2'lik agaroz (Seakem, 50002, USA) jel elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez sonrası jel görüntüleme sistemi (EC App. Coorp. EC135 USA) ile görüntülendi. Bant büyüklüğünün tespitinde 50-1000 bp lik marker (Fermantas) kullanıldı. Bant büyüklüklerine dayanarak 12 lokus MIRU-VNTR tipleme sonucunda her bir MIRU lokusunda bulunan allel tekrar sayısı (Çizelge 2. 2) belirlendi (Zeytinli 2010) .

Çizelge 2. 2. MIRU lokuslarının MIRU-VNTR tekrar sayıları ve amplikon boyutları

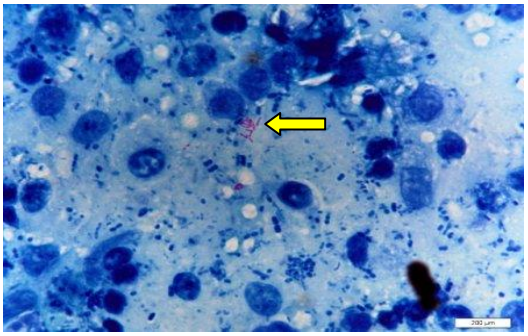
ALLEL	**MIRU**											
TEKRARI	**2**	**4**	**10**	**16**	**20**	**23**	**24**	**26**	**27**	**31**	**39**	**40**
0	402	175	482	565	437	150	395	285	498	492	540	354
1	455	252	537	618	514	200	447	336	551	545	593	408
2	508	329	590	671	591	253	501	387	604	598	646	462
3	561	406	643	724	668	306	555	438	657	651	699	516
4	614	483	696	777	745	359	609	489	710	704	752	570
5	667	560	749	830	822	412	663	540	763	757	805	624
6	720	637	802	883	899	465	717	591	816	810	858	678
7	773	714	855	936	976	518	771	642	869	863	911	732
8	826	791	908	989	1053	571	825	693	922	916	964	786
9	879	868	961	1042	1130	624	879	744	975	969	1017	840
10	932	945	1014	1095	1207	677	933	795	1028	1022	1070	894
11	985	1022	1067	1148	1284	730	987	846	1081	1075	1123	948
12	1038	1099	1120	1201	1361	783	1041	897	1134	1128	1176	1002
13	1091	1176	1173	1254	1438	836	1095	948	1187	1181	1229	1056
14	1144	1253	1226	1307	1515	889	1149	999	1240	1234	1282	1110
15	1197	1330	1279	1360	1592	942	1203	1050	1293	1287	1335	1164

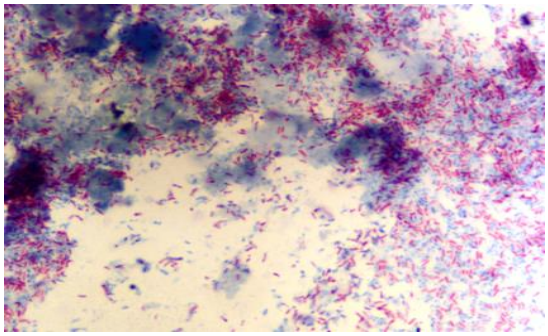
3. BULGULAR

3. 1. Bakteriyoskopi

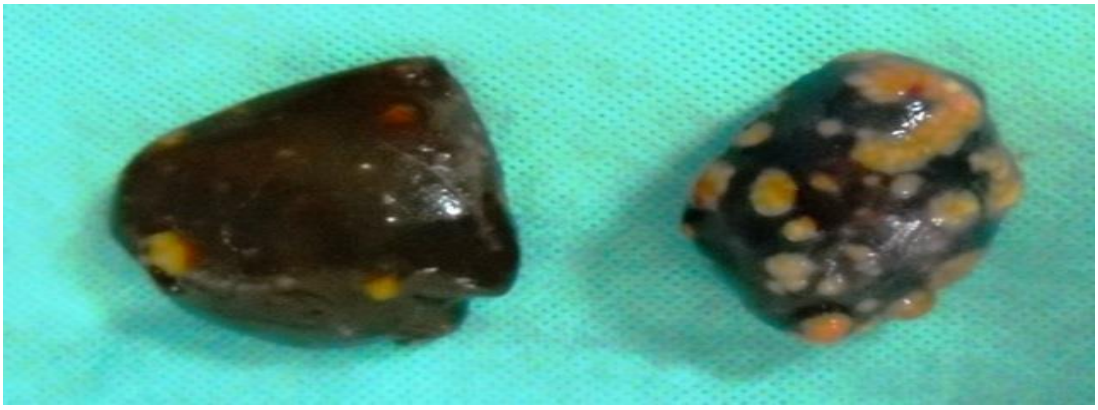


Resim 3. 1. Bakteriyoskopi ve kültürü yapılan sığır lenf düğümü.





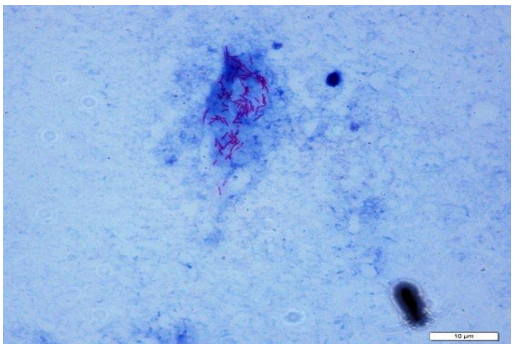
Resim 3. 2. ve **Resim 3. 3**. Sığır mediastinal lenf yumrusu ve kültürde Ziehl-Neelsen boyama ile bakteriyoskopide gözlenen mikobakteriumlar.

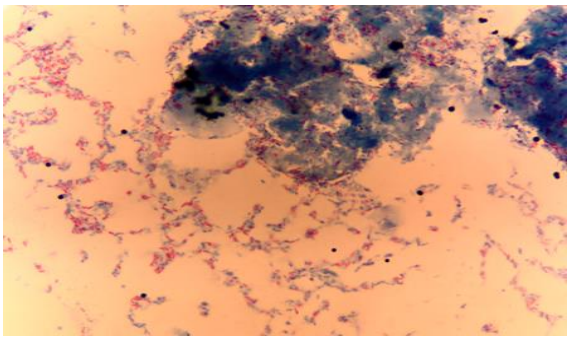


Resim 3. 4. Bakteriyoskopi ve kültürü yapılan bir hindiye ait dalak ve karaciğer.

Toplam 81 sığıra ait 98 doku ve organ (33 granülom, 65 mediastinal lenf yumrusu) örneğinin (Resim 3. 1) 68'inde (%69,38) bakteriyoskopi ile mikobakteriumlar tespit edilirken (Resim 3. 2, Resim 3. 3), 87'sinden etken

izolasyonu yapıldı. Tüberkülozun teşhisinde bakteriyoskopinin **sensitivitesi,** %78,16, **spesifitesi** %100 olarak belirlendi.

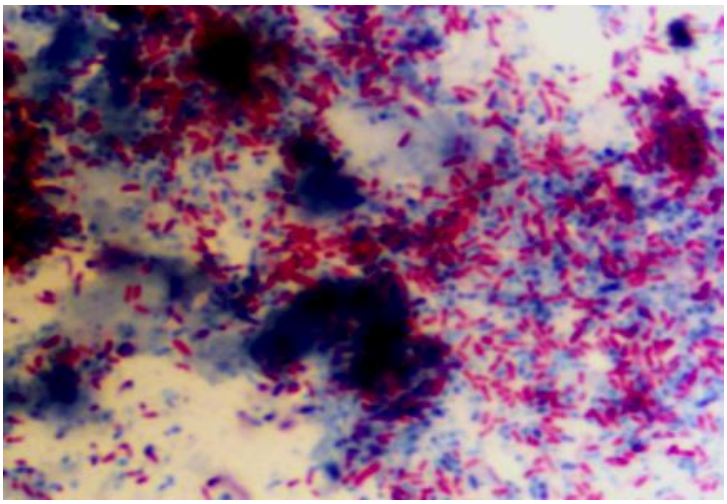




Resim 3. 5 ve 3. 6. Hindi karaciğer doku örneği ve kültürde bakteriyoskopi ile görülen mikobakteriumlar

Kanatlılarda güvercin (2 adet), devekuşu (1 adet) ve hindiye (1 adet) ait 7 örnekte (3 dalak ve 4 karaciğer) bakteriyoskopi (Resim 3. 4) ile mikobakteri basilleri (Resim 3. 5, Resim 3. 6) gözlendi.

Kültür pozitif 9 kanatlı doku örneğinden, 7'sinde kültür öncesi bakteriyoskopi ile etken görülürken **sensitivitesi,** %77,77 olurken, kültür negatif doku örneklerinin bakteriyoskopisinde etken gözlenmedi ve **spesifitesi** %100 olarak belirlendi.



Resim 3. 7. Ankara Türkiye Halk Sağlığı Kurumu' ndan temin edilen insan izolatı bakteriyoskopik görünümü

THSK'dan alınan 50 insan izolatının tamamında bakteriyoskopik olarak mikobakterium basilleri tespit edildi (Resim 3. 7).

3. 2. Kültür Sonuçları

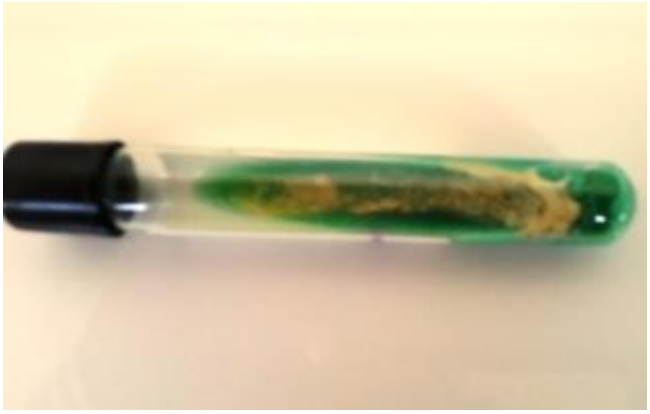
3. 2. 1. Sığır Doku ve Organlarından İzolasyon

Bakteriyolojik kültürü yapılan 81 sığırdan 70 sığıra ait 32 granülom ve 55 akciğer lenf düğümünde Lowenstein-Jensen besiyerinde mikobakterium şüpheli üremeler (Resim 3. 8) görüldü.



Resim 3. 8. Lowenstein-Jensen (piruvatlı) besiyerinde üreyen sığır dokularından izole edilen mikobakterium kolonileri.

3. 2. 2. Kanatlı Doku ve Organlarından İzolasyon



Resim 3. 9. Lowenstein-Jensen (gliserollü) besiyerinde kanatlı dokularından izole edilen mikobakterium kolonileri.

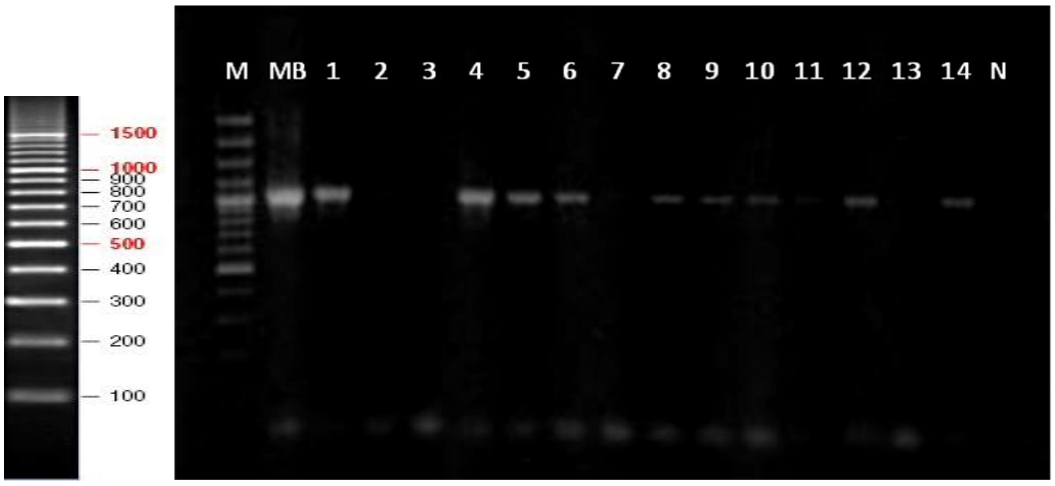
Kanatlılarda, güvercin (3 adet), devekuşu (1 adet) ve hindiye (1 adet) ait 4 dalak ve 5 karaciğer örneğinden mikobakterium şüpheli koloniler (Resim 3. 9) izole edildi.



Resim 3. 10. Ankara Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'ndan temin edilen insan izolatı kültürü.

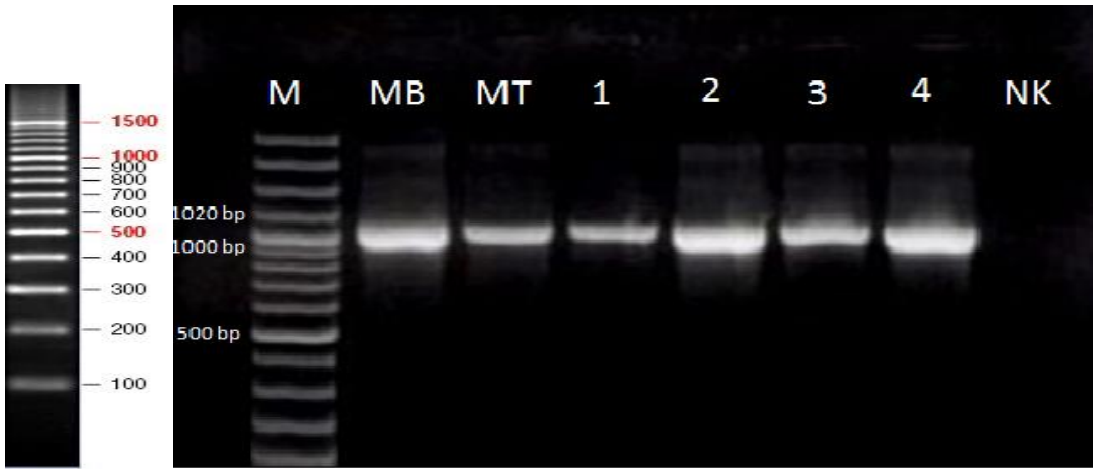
THSK'dan alınan 50 insan izolatının tamamında Lowenstein-Jensen besiyerinde mikobakterium şüpheli koloniler (Resim 3. 10) izole edildi.

3. 3. 3. PZR Sonuçları



Resim 3. 11. Sığır doku örneklerinde *Mycobacterium tuberculosis complex* PZR görüntüsü **M :** 100 bp Marker (Bioron), **MB** : *M.bovis* Etlik MKVKE,**MT :** *M. tuberculosis* H 37 Rv **1, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14:** *M.bovis* şüpheli doku örnekleri , **2, 3, 7, 13 :** Negatif doku örnekleri **NK:** Negatif Kontrol *(M.avium* ATCC 25291*).*

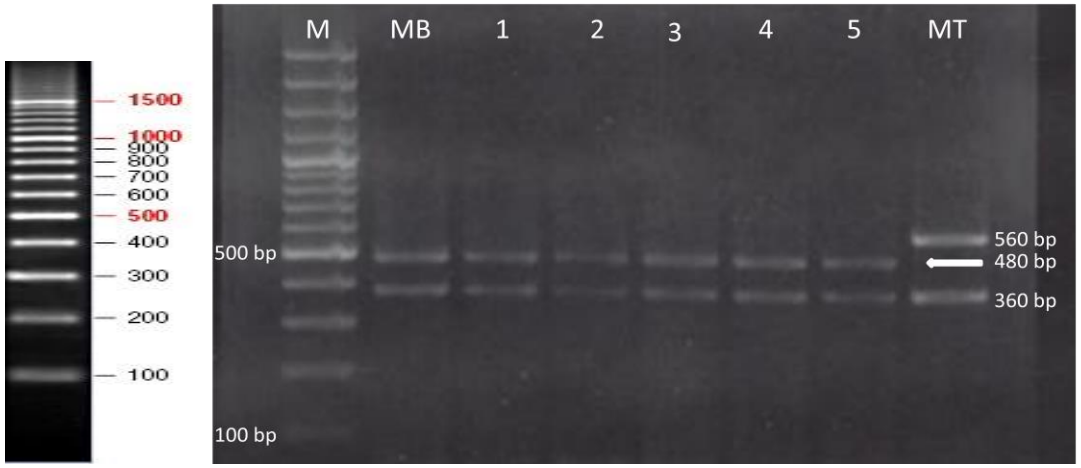
Çalışmada 81 sığırın 62'sine ait 28 granülom ve 47 lenf düğümü örneğinde 1020 bp uzunluğunda bandlar (Resim 3. 11, Resim 3. 12) elde edildi. Pozitif kontrol olarak *M. bovis* Etlik MKVKE suşu kullanılırken, negatif kontrol olarak *M. avium ATCC 25291* suşu kullanıldı.



Resim 3. 12. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks saha izolatlarının PZR görüntüsü. **M :** 100 bp Marker (Bioron), **MB** : *M.bovis* Etlik MKVKE,**MT :** *M. tuberculosis* H 37 Rv **1, 2, 3, 4:** *M.bovis* saha izolatları **NK:** Negatif Kontrol *(M.avium* ATCC 25291*).*

Sığır örneklerinin kültürü sonucu 70 sığıra ait 32 granülom ve 55 lenf düğümünden izole edilen suşların PZR analizlerinde 1020 bp *M. tuberculosis* kompleks yönünden pozitiflik bulundu.

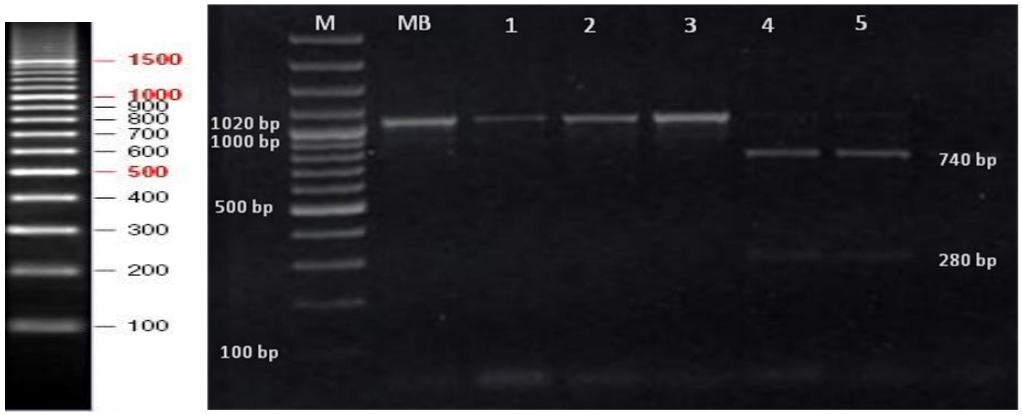
Kültür pozitif 87 sığır doku örneğinin 75'inde, *M. tuberculosis* kompleks PZR ile pozitif sonuç elde edildi. Kültür sonuçları altın standart kabul edildiğinde klinik örneklerde *M. tuberculosis* kompleks türlerini belirlemeye yönelik olarak uygulanan 1020 bp PZR **sensitivitesi** %86,20 olurken, **spesifitesi** %100 olarak belirlendi.



Resim 3. 13. ***M.bovis*** **saha izolatlarının REA PZR görüntüsü M :** 100 bp Marker (Bioron), **MB** : *M. bovis* EMVKE , **1, 2, 3, 4, 5** *M.bovis* saha izolatları **MT**: *M. tuberculosis* H 37 Rv.

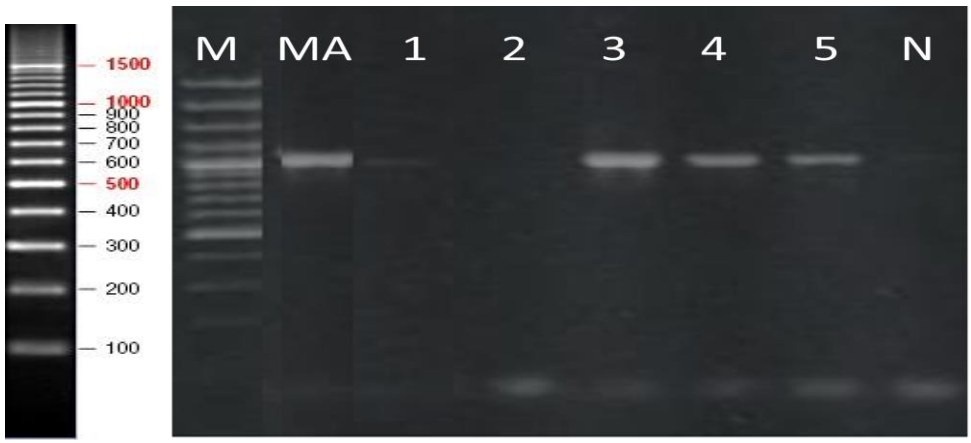
M. tuberculosis kompleks PZR pozitif 75 doku örneği ve 87 saha izolatına ait 1020 bp uzunluğunda bant oluşturan PZR ürünlerinin *RsaI* enzimi ile REA analizi

sonuçlarına göre 360 ve 480 bp büyüklüğünde DNA bantları elde edildi. Bu şekilde izolatların *M. bovis/M. bovis* subsp. *caprae* olduğu belirlendi. *M. tuberculosis* H 37 RV suşuna ait 1020 bp PZR ürünü ise *RsaI* enzimi ile 360 bp ve 560 bp büyüklüğünde band (Resim 3. 13) elde edildi.

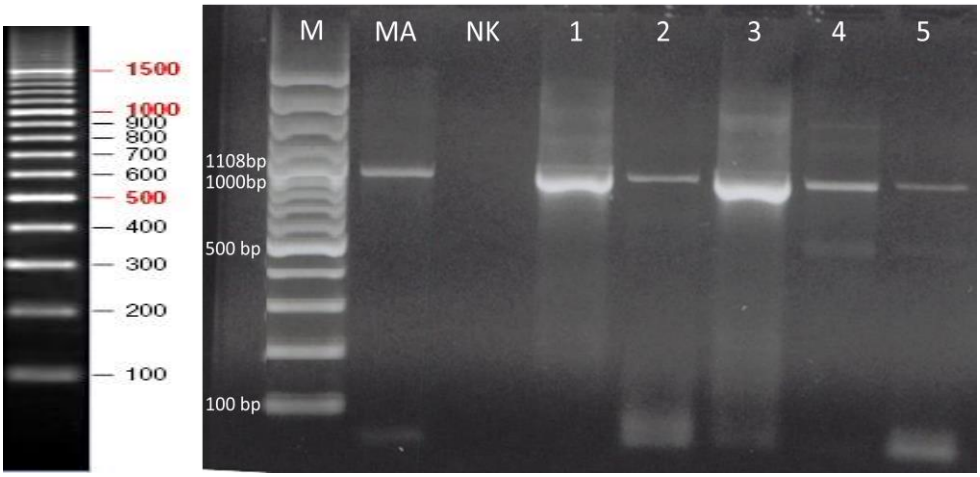


Resim 3. 14. *M.bovis* ve *M. bovis* subsp. *caprae*'nin PZR görüntüsü M : 100 bp Marker (Fermentas), **MB** : *M. bovis* EMVKE , **1, 2, 3:** *M. bovis* saha izolatları **4, 5** : *M. bovis* subsp. *caprae.*

57 sığıra ait 25 granülom ve 47 lenf düğümünden elde edilen izolatlar SacII enzimi ile REA sonucu bandlarda kesim olmadığı görüldü ve suşlar *M. bovis* (PZA dirençli) olarak tiplendirildi. 13 sığıra ait 8 granülom ve 9 lenf düğümü izolatında ise 280 ve 740 bp büyüklüğünde DNA bantları oluştu. Bu suşlarda *M. bovis* subsp. *caprae* olarak identifiye edildi (Resim 3. 14).



Resim 3. 15. Kanatlı doku örneklerinde *Mycobacterium avium* subsp. *avium* DNA' sının PZR görüntüsü. **M :** 100 bp Marker (Bioron), **MA** : *M.avium* ATCC 25291, **1, 3, 4, 5** *M. avium* saha izolatları, **2** : Negaif Saha Örneği **NK:** *M. tuberculosis* H 37 Rv.



Resim 16. *Mycobacterium avium* subsp. *avium* izolatlarının PZR görüntüsü**. M :** 100 bp Marker (Bioron), **MA** : *M.avium* ATCC 25291, **NK:** *M. tuberculosis* H 37 Rv, **1, 2, 3, 4, 5** *M. avium* saha izolatları.

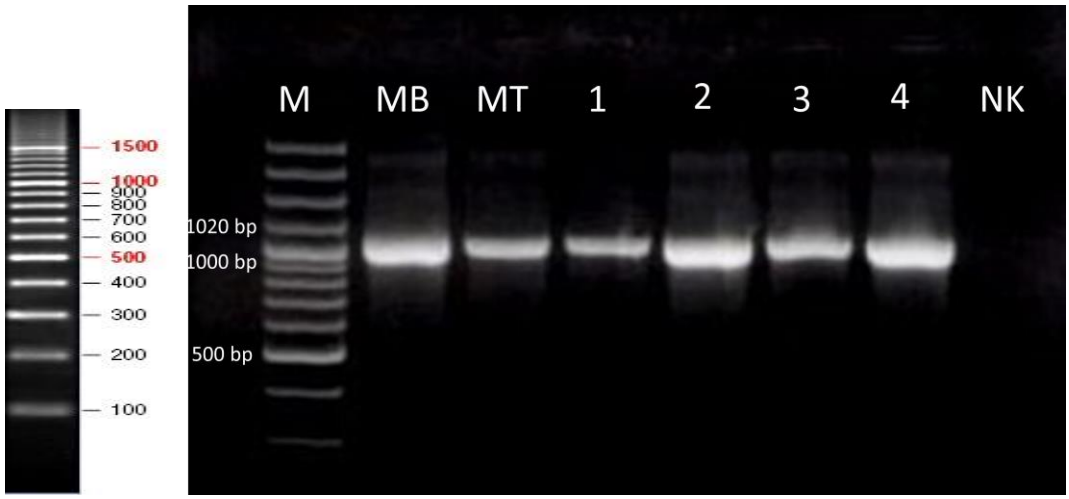
Kanatlı dokularından 4 karaciğer ve 3 dalak dokusu örneği ve kültür sonucu elde edilen 9 izolatın patojen *M. avium* suşlarında bulunan IS901 gen bölgesine yönelik *P1-IS901 ve P2-IS901* primerleri ile PZR analizleri ve PZR ürünlerinin elektroforezi sonrası 1108 bp de DNA bantları oluştuğu görülerek (Resim 3. 15), suşların patojen *M. avium* suşları olduğu belirlendi.

Kültür pozitif 9 kanatlı doku örneğinin 7'sinde, *M. tuberculosis* kompleks PZR ile pozitif sonuç elde edildi (Resim 3. 16). Kültür sonuçları altın standart kabul edildiğinde klinik örneklerde *M. avium* suşlarını belirlemeye yönelik olarak uygulanan 1108 bp PZR **sensitivitesi** %77,77 olurken, **spesifitesi** %100 olarak belirlendi.

Çizelge 3.1 Sığır ve kanatlılarda tüberküloz enfeksiyonunun postmortem teşhisinde kullanılan testlerin sensitivite ve spesifiteleri

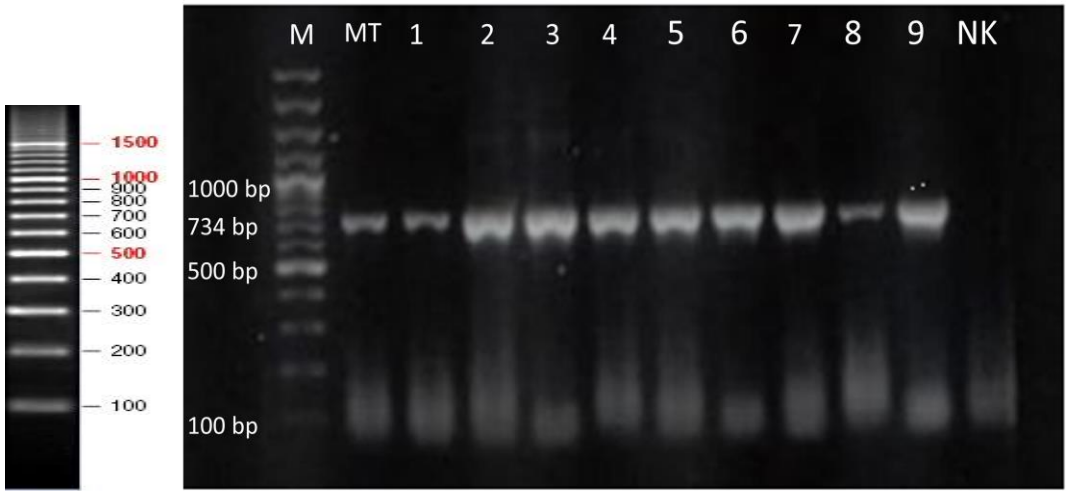
Test	Sensitivite	Spesifite
Dokudan direkt mikroskopik muayene (sığır)	78,16	100
Dokudan direkt mikroskopik muayene (kanatlı)	77,77	100
Dokudan *M. tuberculosis* kompleks (1020 bp) PZR	86,20	100
Dokudan *M. avium* (1108 bp) PZR	77,77	100
Kültürden *M. tuberculosis* kompleks (1020 bp) PZR	100	100
Kültürden *M. avium* (1108 bp) PZR	100	100

sensitivite (%) = [Gerçek Poz / (Gerçek Poz+Yanlış Neg)] x100
spesifite (%) = [Gerçek Neg/ (Gerçek Neg+Yanlış Poz)] x100



Resim 3. 17. *M. tuberculosis* kompleks PZR görüntüsü. **M :** 100 bp Marker (Fermentas), **MB** : *M.bovis* Etlik MKVKE, **MT :** *M. tuberculosis* H 37 Rv, **1, 2, 3, 4** THSK'dan alınan *M. tuberculosis* izolatları **NK:** Negatif Kontrol *(M.avium* ATCC 25291*).*

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'ndan alınmış olan 50 mikobakterium şüpheli izolatının hepsi 1020 bp *M. tuberculosis* kompleks PZR ile pozitiflik bulundu.



Resim 3. 18. *M. tuberculosis* izolatlarının PZR görüntüsü. **M :** 100 bp Marker (Fermentas), **MT** : *M. tuberculosis* H 37 Rv , **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9** THSK' dan alınan *M. tuberculosis* izolatları **NK:** Negatif Kontrol *(M.avium* ATCC 25291*).*

M. tuberculosis kompleks (Resim 3. 17) türlerinde bulunan *gyrB* gen bölgesi (1020 bp) üzerinde *M. tuberculosis* için spesifik 734 bp fragmenti kodlayan MTUB_c-gyrB-756 Gf ve MTUB-c-gyrB-1450-Cr primerleri ile 50 insan izolatı *M. tuberculosis* PZR pozitif (Resim 3. 18) bulundu.

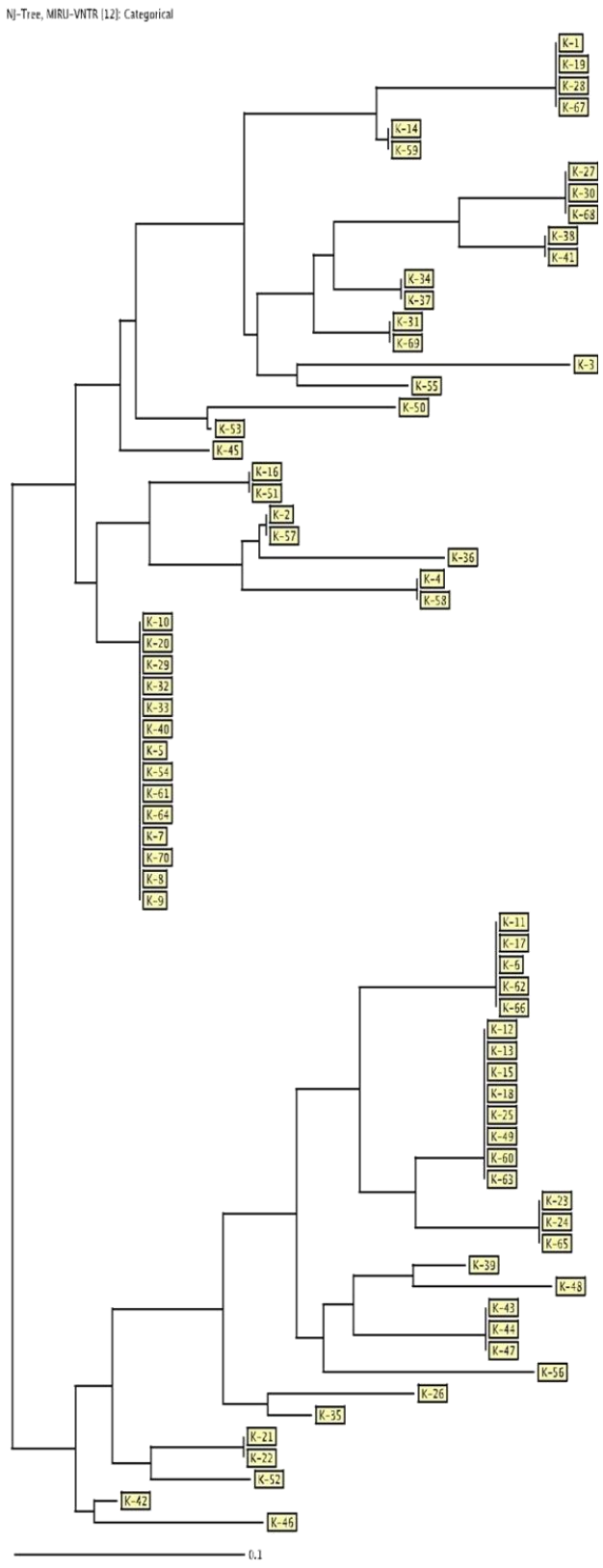
Klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak izole ve identifiye edilen 70 sığıra ait izolatın (57 *M. bovis* ve 13 *M. bovis* subsp. *caprae*) moleküler epidemiyolojik özelliklerinin araştırılması için 12 lokus MIRU-VNTR yöntemi ile yapılan çalışmada; MIRU2, MIRU4, MIRU20, MIRU23, MIRU24, MIRU27 ve MIRU39 lokuslarındaki tekrar sayılarının suşlar arasında farklılık göstermediği, MIRU10, MIRU16, MIRU26, MIRU31 ve MIRU40 lokuslarındaki tekrar sayılarının ise suşlar arasında farklılık gösterdiği (Çizelge 3. 1, Resim 3. 19) ve bu lokusların yüksek ayrım gücüne sahip olduğu (0,25≤h) belirlendi (MIRU-VNTRPlus, www.miru-vntrplus.org).

Çizelge 3. 1. 12 Lokus MIRU-VNTR yöntemi ile belirlenen kopya sayıları ve ayrım güçleri

Miru Lokusları	**Allel Tekrarları****											**Ayrım Gücü (h*)**
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	
MIRU 2			70									0,00
MIRU 4				70								0,00
MIRU 10			40	1		7	19	3				**0,58**
MIRU 16				41	29							0,48
MIRU 20			70									0,00
MIRU 23					70							0,00
MIRU 24			70									0,00
MIRU 26						10	5	38	17			**0,6**
MIRU 27					70							0,00
MIRU 31			29	19		22						**0,65**
MIRU 39			70									0,00
MIRU 40		5	58	7								0,29

**h*= 1 − Σ*xi*^{2}[*n*/(*n*−1)] n: suş sayısı ***xi:* lokusdaki allelin tekrar sayısı

12 lokus MIRU-VNTR yöntemi ile yapılan genotiplendirmede izolat sayısı 1-14 arasında değişen 29 subgrup oluştuğu, 16. subgrubun 14 üyeye sahip en büyük gen grubunu oluşturduğu, bunu 8 üyeye sahip 18. grubun takip ettiği, 17. subgrubun 5 üyeye sahip olduğu, 1 subgrubun 4 üyeye sahip olduğu, 3 subgrubun 3 üyeye sahip olduğu, 8 subgrubun 2 üyeye sahip olduğu ve 14 subgrubun ise tek üyeye sahip olduğu (Çizelge 3. 2, Şekil 3.1) tespit edildi.

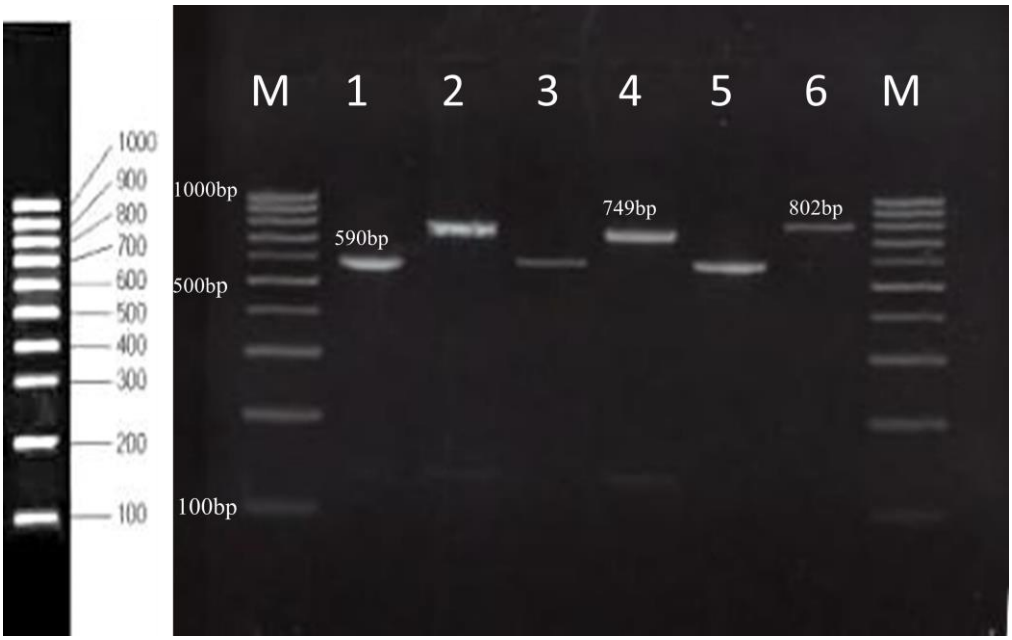


Şekil 3.1. 70 sığır izolatının 12 MIRU-VNTR dendogramı.

Çizelge 3. 2. 70 sığır izolatının MIRU-VNTR analizi sonucu oluşan VNTR profilleri.

12 Lokus MIRU-VNTR Profili	**Suş Sayısı**
232324274222	13
236424274522	8
235424274522	5
232324254323	4
236324284522	3
236424284522	3
237424274322	3
236324284322	2
232324254221	2
232324274221	2
232324254322	2
232324274223	2
232324284322	2
232324284522	2
232324284222	2
232324264222	1
232324254222	1
232324284222	1
232324264522	1
232424274322	1
232424254322	1
232424274222	1
232424274223	1
232424264222	1
233324264322	1
235324284222	1
235424284322	1
236324274221	1
236424264322	1
236424274322	1
	N=70

İnsanlardan izole edilen 50 mikobakterium şüpheli izolatın tamamının *M. tuberculosis* olarak identifiye edilip içlerinden hiçbirinin *M. bovis* olmaması, *M. tuberculosis* kompleks ile *M. avium komplek*s suşlarının VNTR bölgelerinin farklılığından dolayı çalışmamızda insan ve kanatlı izolatlarına ait MIRU-VNTR analizleri yapılamamıştır.



Resim 3. 19. *M. bovis* saha izolatlarının MIRU-10 PZR görüntüsü **M :** 100 bp Marker (Bioron) **1, 2, 3, 4, 5** *M.bovis* saha izolatları

4. TARTIŞMA

Tüberküloz, *M. tuberculosis* kompleks içindeki bir grup mikobakterinin yapmış olduğu, değişik klinik görünümlerde kronik bir enfeksiyondur (Bayram ve Emekdaş 2008). Bilinen en eski hastalıklardan biri olup, 21. yüzyılın başlarında olmamıza rağmen hala önemini korumaktadır (Yüksel 2005, Barani ve ark 2012). Dünya Sağlık Örgütü tarafından tüm dünya nüfusunun yaklaşık üçte birinin tüberküloz basili ile enfekte olduğu, her yıl yaklaşık 8-9 milyon yeni tüberküloz vakası ortaya çıktığı ve her yıl 2 milyon kişinin tüberkülozdan öldüğü bildirilmiştir (Bayram ve Emekdaş 2008).

Sığır tüberkülozu etkeni *M. bovis*, *M. tuberculosis* kompleks üyeleri içinde en geniş konak aralığına sahip olup, hayvanları bazen de insanları enfeksiyona yol açmaktadır (Aslan ve ark 2009). *M. bovis*'in insanlar için en önemli bulaşma kaynağı kontamine, pastörize edilmemiş sütler, enfekte hayvanlarla direkt temas veya basil saçan hayvanların çıkardığı enfeksiyöz aerosollerin solunması ile de bulaşma olabilmektedir. İnsandan insana bulaşma çok nadir olmakla birlikte, özelikle immünsüprese kimseler arasında bu yolla bulaşma olabileceği doğrulanmıştır (Grange 2001, Aslan ve ark 2009). İnsanlarda *M. bovis* enfeksiyonunun insidensi verilerin sınırlı olmasından dolayı net değildir. Sığır enfeksiyonunun taşınmasında insanların da *M. bovis*'in rezervuarı olabileceği belirtilmiştir (Wei ve ark 2004). *M. avium* kompleks *M. avium subsp. avium* (*M. avium*), *M. intracellulare* ve *M. avium subsp. paratuberculosis* (*M. paratuberculosis*) üyelerinden oluşmaktadır (Eriks ve ark 1996). Seroaglutinasyon metodu ile 28 serovara ayrılmıştır. Serovar 1-6, 8-11 ve 21, *M. avium*, Serovar 7, 12 ve 20 *M. intracellulare*, Serovar 22-24, 26-28, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* ve sınıflandırılamayan mikobakteriumları içermektedir (Cardoso ve ark 1999, Dvorská ve ark 2004). Bunlar, gıda üretiminde kullanılan kanatlı, sığır ve domuz gibi hayvanlarda ve insanlarda önemli hastalıklara neden olmaktadır (Eriks ve ark 1996).

M. avium subsp. *avium*, kanatlılarda tüberküloz, sığırlarda ve domuzlarda lenf düğümü enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Picardeau ve Vincent 1996). İnsanlarda fırsatçı patojen olup özellikle immün sistemi baskılanmış insanlarda enfeksiyona sebep olmaktadır (Kunze ve ark 1992).

4. 1. Bakteriyoskopi

Ziehl-Neelsen boyama yöntemi balgam ve postmortem örneklerde mikobakterilerin tespiti için ilk basamaktır (Bayram ve Emekdaş 2008). Tüberkülozda erken teşhis hastalığın yayılmasını önlemek ve özellikle beşeri hekimlikte tedaviye başlamak için önemlidir (Li ve ark. 2000, Barani ve ark 2012). Hastalığın laboratuvar teşhisi bakteriyoskopik olarak hızlı bir şekilde yapılabilmektedir (Singh ve Kashyap 2012). Mikroskobik inceleme tüberküloz tanısında basit, hızlı, ucuz ve özgül bir yöntem olması nedeniyle hastalığın endemik olduğu ülkelerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kılıçarslan 2007, Ekinci 2009). Boyalı preparatlarda bakterilerin gorülebilmesi icin örnekte 5.000-10.000 basil/ml, bulunması gerekmektedir. Bakteriyoskopinin en büyük dezavantajı çevresel mikobakteriumlardan kaynaklanan yanlış pozitifliktir (Manzano ve ark 2008, Bayraktar ve ark 2011). Mikroskobik inceleme öncesinde Ziehl-Neelsen, Kinyoun ve auramin-rodamin floresan boyama uygulanan boyama yöntemleridir (Kılıçarslan 2007).

Gutierrez ve Garcia (1993), 18 sığır ve 24 keçiden, avidin-biotin complex peroxidase (ABC-P) metodu ile 13 keçide (%54) ve Ziehl Neelsen boyama ile de 8 keçide (%33) mikobakterileri tespit etmişlerdir. Ayrıca, 14 sığırda (%77) ise her iki metotla etkeni gözlemlemişlerdir. Böylece, avidin-biotin complex peroxidase (ABC-P)'ın ZN'ye göre daha avantajlı olduğunu bildirmişlerdir.

Farklı araştırmacılar (Okaiyeto ve ark 2008, Al-Saqur ve ark 2009) mikobakteriumları sütlerde ZN ile tespit sensitivitesini sırasıyla % 14 ve %0,4 olarak bildirmişlerdir. Nasr ve ark (2013), 50 tüberkülin pozitif sığır sütünün 7'sinde (%14), 50 tüberkülin negatif sığır sütünün 3'ünde (%0,6) Ziehl-Neelsen boyama ile mikobakteriumları göstermişlerdir.

Adu-Bobi ve ark (2009), 130 tüberküloz şüpheli sığırın 95'inde (%73), Kuria ve Gathogo (2013), tüberküloz benzeri lezyonlu 176 karkastan 35'inde (%20) mikobakterileri tespit ettiklerini, 29'unda mantarla birlikte mikobakterileri Ziehl-Neelsen boyamada tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Proano-Perz ve ark (2006), 29 kültür pozitif sığır doku örneğinin 3'ünde (%10) mikobakterileri bakteriyoskopik olarak belirlemişlerdir.

Chuwku ve ark (2013), 50 sığır ve 50 keçiden aldıkları tüberküloz şüpheli lezyonlar bulunan akciğer örneklerinden 15 sığıra ait akciğer örneğinde (%30) Ziehl-Neelsen boyalı örneklerde pozitiflik tespit ederken, keçi örneklerinin negatif olduğunu rapor etmişlerdir.

Ereqat ve ark (2013), 44 keçi ve 60 sığıra ait 208 doku örneğinden sadece 1 sığıra ait akciğer lenf düğümünde (%0,035) Ziehl-Neelsen boyamada aside dirençli basil tespit etmişlerdir.

Kanatlı tüberkülozu, çoğunlukla *M. avium* tarafından oluşturulan vücudun herhangi bir doku ya da organda tüberküllerin aşamalı gelişimi ile karakterize kronik zayıflamaya neden olan bir hastalıktır (Gümüşsoy ve ark 2006). Enfeksiyon özellikle zoolojik kafeslerde görüldüğünde nadir ve sıradışı türlerin ölüm dahil ciddi ekonomik kayıplara neden olabilmektedir (Kul ve ark 2005). *M. avium* türleri sığır, domuz, yaban kuşları ve yabani ruminantlardan izole edilmektedir (Bartos ve ark 2006). *M. avium* kompleks içinde bulunan türlerin hemen hemen hepsi ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır (Ayele ve ark 2001, Bartos ve ark2006).

Kanatlılarda Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile hazırlanan örneklerde tüberküloz etkenlerinin küçük gruplar halinde kırmızı çomakcıklar şeklinde görüldüğü bildirilmiştir (Tell ve ark 2001, Bougiouklis ve ark 2005, Gerhold ve Fischer 2005, Terim Kapakin ve ark 2010). Tantaş ve ark (1990) ile Yavuz ve ark (2012) kanatlı çiftliklerinden alınan örneklerde bakteriyoskopik olarak tüberkülozu tespit ettiklerini ve bulaşmanın yem kaynaklı olabileceğini bildirmişlerdir. Gonzalez ve ark (2002), 48 haftalık tavuklarda direkt mikroskopik muayenede mikobakterileri gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Bougiouklis ve ark (2005) 3 güvercine ait dalak, karaciğer, kemik iliği, ovidukt ve ovumda bulunan lezyonlu dokularda Ziehl-Neelsen boyamada intra ve ekstrasellüler olarak aside dirençli mikobakterileri tespit ettiklerini rapor etmişlerdir.

Kanatlı tüberkülozu ticari kanatlı işletmelerinde kontrol altına alınmasına rağmen, gerek vahşi gerekse de serbest hayat yaşayan evcil (köy tipi yetiştiricilik) kanatlılarda sorun olmaya devam etmektedir. Bu durum ise halk sağlığı ve diğer kanatlı hayvanlar için potansiyel bir risk oluşturmaktadır. Bu bilgiler eşliğinde kontrollü kanatlı hayvan yetiştiriciliğinin önemi bir kez daha vurgulanmıştır (Terim Kapakin ve ark 2010).

Zink ve Nerlich (2004), parafinlenmiş 49 insan dokusu arşivlerinde 20'sinde PZR analizi ile pozitif buldukları *M. tuberculosis* kompleks örneğinden sadece 8'inde, Park ve ark (2003), 53 dokudan 17'sinde bakteriyoskopik olarak mikobakterileri göstermişlerdir. Parafinli dokularda *M. tuberculosis* kompleks suşlarının identifikasyonu, etkenin epidemiyolojik ve evrimsel değişimi ile ilgili daha ileri düzeyde çalışmalarda kullanılabileceğini göstermiştir.

İşitez ve ark (2004), 280 klinik örnekten 31'ini Ziehl-Neelsen ve 38' ini kültür ile (Löwenstein-Jensen agar) pozitif bulmuşlardır. Li ve ark (2000), ZN negatif olarak tespit edilen formolle fikse edilip parafinlenmiş dokularda IS*6110* primerlerini kullanarak 115 hastanın 68'inde *M. tuberculosis* kompleks varlığını göstermişlerdir. Bu bulgular, tüberküloz hastalığının tanısında birden fazla tanı yönteminin birlikte uygulanmasının hastalığın teşhis şansını arttırdığını göstermektedir.

Ağaçayak ve ark. (2007), insanlarda kültür pozitif tüberküloz olgularından alınan 51 balgam örneğinden PZR ile 44'ünün (%86.3) *M. tuberculosis* kompleks, 4'ünün (%7.8) *M. scrofulaceum*, 2'sinin (%3.9) *M.avium* ve 1'inin de (%1.9) *M. intracellulare* olarak tanımlandığı bildirmişlerdir.

İnsanlarda bakteriyoskopik muayenenin sensitivitesinin farklılık gösterdiği belirtilmektedir. Sensitiviteyi Cousins ve ark (1992) %53, Folguera ve ark (1993) %64, Güneş ve ark (2002) %46, Chen ve ark. (2012) %16, Özbey ve ark (2012) %0.4, Singh ve Kashyap (2012) %43, Ali ve ark. (2013) %37 olarak bildirmişlerdir. Nawaz ve ark (2012) tüberküloz şüpheli hastalarda balgam örneklerinde %23 ve kan örneklerinde %8 sensitivite tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, kültür pozitif 87 sığır örneğinin 68'sinde (%78,16) ve 87 mikobakterium şüpheli izolatın bakteriyoskopisinde etken tespit edilmiştir. Kültür pozitif 5 kanatlıya ait 9 örneğin 7'sinde (%77,77) ve 9 mikobakterium şüpheli izolatın bakteriyoskopik muayenesinde etken belirlenmiştir. Ayrıca THSK'dan alınan 50 mikobakterium şüpheli izolatın Ziehl-Neelsen boyamasında bakteriyoskopik olarak etkenler görüntülenmiştir. Çalışmada kullanılan örneklerin büyük çoğunluğunun tüberküloz lezyonlu dokular olması ve stomacherda parçalama sonrası santrifüjleme işleminin birim hacimde bulunan bakteri yoğunluğunu dolayısıyla tespit oranının yüksek olmasının nedeni olabilir

4. 2. Kültür

Tüberküloz tanısında kültür yöntemleri altın standart olma özelliğini korumaktadır. İzolasyon için yumurta bazlı veya agar içerikli katı besiyerleri ve sıvı besiyerleri kullanılmaktadır. Hızlı tanı amacıyla sıvı besiyerlerinin otomatize ve yarı otomatize cihazların kullanıldığı çeşitli sistemler bulunmaktadır (Kılıçarslan 2007). Bu amaçla günümüzde en yaygın olarak kullanılan katı besiyeri LJ besiyeri, sıvı kültür sistemleri BACTEC 460 TB, MGIT 960, MB\Bact ALERT'dir. Bu sistemlerde kültür 1-3 hafta kadar sürmektedir (Özbey ve ark 2012). Kültürde üreme pozitifliği için örneğin ml'sinde en az 10-100 basil/ml bulunması gerekmektedir (Bayraktar ve ark 2011). Kültür yönteminin avantajları, bakteriyoskopi ile ayrımı yapılamayan *M. tuberculosis* kompleks dışı mikobakteri ayrımını yapabilme, ilaç duyarlılığını belirleme ve genotiplendirme gibi ek testler yapılabilmesine imkan sağlamasıdır (Özbey ve ark 2012).

Corner ve ark. (2012), sığır dokularında 3 farklı besiyeri (modifiye Middlebrook 7H11 (7H11), tuberculosis blood agar (B83) ve Stonebrink's medium) ve 3 farklı dekontaminant (%2 (w/v) *sodium hydroxide* (NaOH), 0.75% (w/v), 0.075% (w/v) *hexadecylpyridinium chloride*, (HPC) ve % 0,5 (w/v) *benzalkonium chloride*) kullanarak yaptıkları çalışmada tüm besiyeri tiplerinde 2. haftanın sonunda üremelerin görüldüğü, kültürlerin %75'inde pozitifliğin ise 8 hafta da tespit edildiğini belirtmişlerdir. Bazı besiyerlerinde üremelerin yavaş olmasını inokülasyonda bulunan bakteri sayısının azlığıyla ilişkilendirmişlerdir. Kolonilerin görünüm zamanını besiyeri tipleri etkilemiş olup, kolonilerin ortalama tespit süresi modifiye Middlebrook 7H11 ve tuberculosis blood agar B83'te 28 gün, Stonebrink's mediumda ise 36 gün olarak tespit edilmiştir. Stonebrink's mediumun en fazla üremenin görüldüğü besiyeri ve toksik etkiden dolayı dekontaminasyon prosedürlerinin pozitif kültürlerin tespiti için gereken minimum süreyi artırdığı bildirilmiştir. Kültür yapılan besiyeri sayısının fazlalığı, pozitif kültür sayısında artışı ve kolonilerin tespit edildiği sürenin azalmasını sağladığı ifade edilmiştir. Bu bilgiler ışığında *M. bovis'* in tespitinde genel olarak seçilen agar, dekontaminat türü ve inkubasyon süresi etkili olduğu ortaya konmuştur.

Kahla ve ark. (2011), PPD mamalian pozitif bulunan 102 sığırdan 15 gün arayla alınan 306 süt örneğinin 5'inden *M.bovis* izole ederken, Pardo ve ark (2001) 15 gün boyunca süt topladıkları 78 sığırdan kültür sonucu 19'unda *Mycobacterium* spp. izole ettiklerini bildirmişlerdir. Kuria ve Gathogo (2013), 176 tüberkülozlu sığır karkasının

64' ünden *Mycobacterium* spp. izole ettiklerini bildirmişlerdir. Awah-Ndukum ve ark (2013) ise, 219 tüberküloz şüpheli sığır dokusunun 169'unu kültür sonrası ZN boyamada pozitif bulduklarını bildirmişlerdir.

Özbey ve ark (2012), tüberküloz ön tanısı konmuş 667 hastanın 1048 örneğini BACTEC MGIT ile, besiyerinde 54 hastada 71 *M. tuberculosis* kompleks ve 7 tüberküloz dışı mikobakteri olmak üzere toplam 78 mikobakteri izole etmişlerdir. Ayrıca, LJ besiyerinde 64 *M. tuberculosis* kompleks ve 4 tüberküloz dışı mikobakteri olmak üzere toplamda 68 izolasyon elde etmişlerdir.

Tüberküloz teşhisinde boyalı preparatların mikroskobik incelemesi kolay ve hızlı bir yöntem olmasına rağmen düşük duyarlılıkta, kültür ise bakteriyoskopiye göre oldukça duyarlıdır. BACTEC MGIT 960 otomatize sıvı bazlı tüberküloz kültür sistemi ile kültür çalışmaları ve ilaç duyarlılıkları kolay ve hızlı bir şekilde çalışılabilmektedir. Tüberküloz tanısında kültür duyarlılığının mikroskopiden fazla olduğu, ancak kültür işlemleri sonuçlanana kadar hastaların erken tanı ve takibinde duyarlılığı düşük olmasına rağmen mikroskobik incelemenin rutin olarak kültür ile birlikte değerlendirilmesi gerektiği bildirilmiştir (Özbey ve ark 2012).

Bayraktar ve ark (2011), 2007-2010 yıllarında 2,436 hastadan alınan 3,828 örnekten 192 mikobakterium suşu izole ettiklerini, 188'inin *M. tuberculosis* komplex, 1'inin *M. abscessus* ve 3'ününde *M. avium complex* olduğunu bildirmişlerdir.

Cousins ve ark (1992), 177 hastanın 63'ünde, Folguera ve ark (1993) 75 örneğin 71'inde, Singh ve Kashyap (2012) 60 örnekten 41'inde, Nawaz ve ark (2012) tüberküloz şüpheli hastalardan alınan 100 balgam örneğinin 11'inde ve 100 kan örneğinin 9'unda kültür pozitiflik elde etmişlerdir.

Kunduracıoğlu ve ark (2013), tüberkuloz şüpheli ve aside dirençli basil (ARB) yayma negatif 107 hastaya ait örnekte (65'i balgam, 32'si bronş aspirasyon sıvısı, 5'i plevral sıvı ve 5'i transtorasik ince iğne aspirasyonu) 45 hasta akciğer parankim tüberkülozu tanısı konurken, LJ kültür yöntemi ile 32'sinde, BACTEC 960 sistemiyle ise 38'inde pozitif sonuç alınmıştır.

Hollanda'da 10 yıl süreyle doğal hayattaki ölü kuşların %0.7'sinden *M. avium* izolasyonu yapıldığı belirtilmiştir (Smit ve ark 1987). Tantaş ve ark. (1990) ve

Yavuz ve ark (2012) kanatlı çiftliklerindeki tavuklardan alınan örneklerde bakteriyolojik kültür sonucu tüberküloz varlığını ortaya koymuşlardır.

Gümüşsoy ve ark (2006), Kayseri hayvanat bahçesinde 4 güvercin (*Columba domestica*), 3 kızıl şahin (*Buteo rufinus*), 2 mandarin ördeği (*Aix galericulato*), 2 hindi (*Meleagris gallopavo*) ve 1 sülün (*Phasianus colchicus*)'de ZN boyamada mikobakteriumları tespit etmiş, kültür ve biyokimyasal testlerle *M. avium* subsp. *avium* olarak tiplendirmişlerdir. Ancak, kümes örneklerinde boyama, bakteriyoskopi ve kültür ile mikobakterileri tespit edemediklerini belirtmişlerdir. Çalışmada, hem konvansiyonel hemde hızlı kolorimetrik metodlar kullanılmış, BACTEC hızlı radyometrik dokuda tüberküloz etkeni varlığının hızlı bir indikatörü olabileceği ifade edilmiş, ayrıca BACTEC sistemi *M. avium*'un tespiti için sensitive bir test olduğu ve hastalığın tespit süresinide kısalttığı belirtilmiştir.

Bu çalışmada, 70 sığıra ait 87 örnekte piruvatlı besiyerinde, 5 kanatlıya ait 9 numunede Lowenstein-Jensen besiyerinde mikobakterium şüpheli üremeler gözlendi. İzolatlar tüberküloz lezyonlu dokulardan izole edilirken lezyonsuz dokulardan herhangi bir üreme olmadı. Bakteriyoskopiye göre kültür pozitifliğinin yüksek olmasını, Ziehl-Neelsen boyalı prepertalarda etkenin görülebilmesi için 5.000-10.000 basil/ml gerekirken, kültürde üreme için 10-100 basil/ml'nin yeterli olması ile açıklanabilir.

4. 3. Moleküler Metotlar

4. 3. 1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR mikobakteriyel enfeksiyonların teşhisinde yaygın olarak kullanılan güvenilir bir yöntemdir (Hawkey 1994). Ancak, klinik örnekten tanı amaçlı PZR testlerinde düşük sensitivite elde edilebilmektedir. PZR inhibitörlerinin varlığı, DNA ekstraksiyonun da yetersizlik, örnekteki bakteri sayısının düşüklüğü düşük sensitivitenin sebeplerindendir. PZR çoğunlukla izole edilen mikobakterilerin tür düzeyinde identifikasyonunda kullanılmaktadır (Bartos ve ark. 2006). Ayrıca moleküler yöntemler, ilaç direncinin belirlenmesinde ve epidemiyolojik araştırmalarda geniş uygulama alanı bulmuştur (Kunduracıoğlu ve ark 2013).

Mikobakteriumların tür ve alt tür düzeyinde ayrımında kolonilerin büyüme karakterleri, biyokimyasal testler, *high-performance liquid chromatography* (HPLC),

DNA probları ve RNA sekanslama gibi araçlar kullanılmaktadır. Mevcut ticari probların geniş kapsamlı standardizasyonu, başlangıçta yüksek ekipman gideri ve/veya yoğun işgücü gereksiniminin olması ayrıca laboratuvarlarda rutin kullanımı için adaptasyon güçlüğü gibi dezavantajları vardır (Khosravi ve ark 2007).

M. tuberculosis kompleks üyeleri (*M. tuberculosis, M. africanum, M. bovis, M. bovis BCG, M. microti, M. tuberculosis* subsp. *caprae and M. canetti ve M. pinnipedii*) genetik olarak çok yakın bir grupta olup, 16SrRNA gen sekansı yönünden yüksek bir homolojiye (%99.9) sahiptirler (Kasai ve ark 2000, Chimara ve ark 2004). Son yıllarda yapılan çalışmalar, IS elemanları ve kısa tekrarlayan DNA dizileri gibi *M. tuberculosis* genomunda tekrarlayan DNA elemanlarının dağılımındaki farklılıklara bağlı polimorfizmlerin, suşların ayrımında kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Karahan 2006). *M. tuberculosis* kompleks türlerinin birbirinden ayrımında spoligotyping, *pnc*A ve *oxy*R genlerindeki mutasyonları belirlemeye yönelik PZR, *mtp* 40 PZR, farklı gen bölgelerinin amplifikasyonuna yönelik metotlar kullanılabilmektedir (Kasai ve ark 2000, Chimara ve ark 2004).

Zink ve ark. (2003), Mısır'daki mumyalarda PZR ile *M. tuberculosis* varlığını göstermişlerdir. Folguera ve ark (1993) 66 hastadan alınan 75 örnekte PZR ile pozitiflik belirlermişlerdir. PZR analizinin, özellikle mikobakteri az sayıda olduğu örneklerde, tüberküloz enfeksiyonunun teşhisinde duyarlı bir metot olduğunu ifade etmişlerdir.

Barani ve ark (2012), 114 örnekten ZN ve PZR ile pozitif bulunan 17 örneğin 4'ünü IS*6110*, 5'ini *TRC*$_4$ primerleri ile 8'ini her ikisi ile de pozitif bulmuşlardır. Ziehl Neelsen negatif olarak tespit edilen ancak PZR ile pozitif bulunan 12 örnekten 3'ünü IS*6110*, 5'ini *TRC*$_4$ primerleri ile 4'ünü her ikisi ile de pozitif bulmuşlardır. Araştırıcılar (Barani ve ark 2012) akciğer TB'li hastaların erken tanısı, tedavinin erken başlaması, hastalığın ilerlemesinin önlenmesi ve toplum sağlığı açısından bulaşın engellenmesinde MTD Gen-Probe yöntemi, literature paralel olarak güvenilir hızlı bir tanı yöntemi olarak bildirmişlerdir.

Bougiouklis ve ark (2005) PZR ile *Mycobacterium spp*.'yi tespit eden 16S rRNA, *M. tuberculosis* kompleks'i tespit eden IS*6110* ve *M. avium* subsp. *avium'* u

tespit eden IS*901* primerleri ile negatif sonuç elde ederken. *M. avium complex*'i tespit eden IS*1245* primerleri ile PZR pozitiflik elde etmişlerdir.

Güvercinlerde tüberkülozun çoğu zaman atipik semptomlarla ortaya çıkmasından ötürü teşhiste yaşanan gecikmeler yetiştiricileri, çocuklar ve immün sistemi baskılanmış insanlarda riski artırmaktadır. Bu durumda biyogüvenlikle ilgili tedbirlerin önemini daha da artırmaktadır (Bougiouklis ve ark 2005).

Gonzalez ve ark. (2002), 48 haftalık tavukların dokularından *M. avium* yönünden PZR ile pozitiflik elde etmişlerdir. Yavuz ve ark (2012), kültür ile elde ettikleri tavuk izolatlarını PZR ile *M. avium* subsp. *avium* olarak identifiye etmişlerdir.

Kazwala ve ark. (2001) tüberkülozlu insanlara ait balgam, servikal ve mezenterik lenf biyopsisinden oluşan 149 örnekte, 31 *M. tuberculosis*, 7 *M. bovis* ve 6'sında ise diğer mikobakterium türleri (tümü akciğerden) izole ve identifiye etmişlerdir. Bu bulgulara dayanarak, *M. bovis* Tanzanya kırsal bölgelerde yaşayan insanlar için endişe verici bir patojen olarak kabul edilmesi gerektiği vurgulanmıştır.

Liebana ve ark (1995), 49 *M. bovis* kültür pozitif sığırdan 35'ine (%71,4), kültür negatif 32 sığırdan 2'sine (%6,25) ait doku örneklerinde *M. tuberculosis* kompleks PZR ile etkeni gösterebilmişlerdir. Solmaz ve ark (2006), PPD deri testi uyguladıkları 210 süt ineğinde, PPD pozitif 3 sığırın süt örneklerinde PZR ile *M. tuberculosis* kompleks belirlemişlerdir. Kuria ve Gathogo (2013) 176 tüberkülozlu sığır karkasın 64'ünden *Mycobacterium* spp. izole ettiklerini ve 19'unu PZR ile *M. bovis* olarak identifiye ettiklerini bildirmişlerdir.

Chuwku ve ark (2013), 50 sığır ve 50 keçiden aldıkları tüberküloz şüpheli akciğer örneklerinden 9'unu PZR ile *M. tuberculosis* kompleks pozitif olarak tespit ettiklerini ve Ziehl-Neelsen boyamada negatif bulunan 35 örnekten 1'inde PZR ile pozitif bulunduğunu bildirmişlerdir.

Ereqat ve ark. (2013), tüberküloz yönünden kültür negatif 44 keçi ve 60 sığıra ait 208 doku örneği ile 120 keçi ve 30 sığıra ait 150 süt örneğinden, 1 keçi ve 3 sığır dokusu ile 4 süt örneğinde IS*6110-PCR* ile pozitiflik bulduklarını ve *real-time PCR HRM* ile *M.bovis* olarak identifiye ettiklerini bildirmişlerdir.

Aslan ve ark (2009), farklı kliniklerden izole edilen ve klinik özellikleri, klasik kültürde uzun üreme süresi ve identifikasyonda *M. tuberculosis*'den farklılık gösteren üç olguya ait izolatlar spoligotiplendirme yöntemiyle *M. bovis* olarak belirlemişlerdir. Tüberküloz etkenlerinin tür düzeyinde ayrımını yapan laboratuvar yöntemlerinin kullanımının yaygınlaşması gerçek *M. bovis* olgu sıklığının ortaya çıkmasına ışık tutacağını bildirmişlerdir.

Ceyhan ve ark (2010), Ankara ve çevre illerde 16'sı sığırlardan 5'i insanlardan izole edilen toplam 21 *M. bovis* suşunu tiplendirilmişlerdir. ERIC-PCR yönteminin ayrım yapmada yetersiz kaldığını, buna karşın OUT-PCR yönteminin farklı kökenleri kolaylıkla ayırabildiğini belirtmişlerdir. OUT-PCR yönteminin kolay uygulanabilen, hızlı veya laboratuvar kaynaklı çapraz kontaminasyonların saptanmasında yararlı olacağı ancak epidemiyolojik çalışmalarda tek başına kullanılamayacağı sonucuna vardıklarını bildirmişlerdir.

Güneş ve ark (2002) 64 hastaya ait örneğin 33'ünde, Singh ve Kashyap (2012) insanlardan alınan 60 örnekten 41'inde PZR pozitiflik elde ettiklerini bildirmişlerdir. Ali ve ark (2013), 324 tüberkülozlu insandan alınan örneğin PZR ile 184'ünde *M. tuberculosis* komplex olarak tespit edildiğini, bunlardan 24'ününde *M. bovis* olarak identifiye ettiklerini bildirmişlerdir. Nawaz ve ark (2012), tüberküloz şüpheli hastalardan alınan 100 balgam örneğinin 42'sinde ve 100 kan örneğinin 43'ünde duplex PZR ile pozitiflik elde etmişlerdir.

Bu çalışmada, 62 sığıra ait 47 lenf düğümü ve 28 granülom örneği ile izole edilen suşların tamamı ayrıca THSK'dan alınan 50 insan izolatı PZR sonucu *M. tuberculosis* kompleks olarak tespit edildi. *M. tuberculosis* kompleks PZR (1020 bp) analizinde pozitif kontrol olarak kullanılan *M. bovis* EMVKAE, *M. tuberculosis* H 37 Rv referans suşları pozitif DNA bantları verirken, negatif kontrol olarak kullanılan *M. avium* ATCC 25291 referans suşunda 1020 bp'de bant tespit edilmemiştir. Daha sonra yapılan PZR ile 50 insan izolatı *M. tuberculosis* pozitif olarak belirlendi. *M. tuberculosis* PZR (734 bp) analizinde pozitif kontrol olarak kullanılan *M. tuberculosis* H37 Rv referans suşu pozitif bant verirken, negatif kontrol olarak kullanılan *M. avium* ATCC 25291 referans suşunda 734 bp'de bant tespit edilmedi.

Ayrıca 4 kanatlıya ait 4 karaciğer ve 3 dalak örneği ile izolatların tümü PZR sonucu *M. avium* subsp. *avium* olarak tespit edildi. *M. avium* suşlarında bulunan IS901 gen bölgesi için PZR analizinde pozitif kontrol olarak *kullanılan M. avium*

ATCC 25291 suşu 1108 bp'de DNA bantları oluştururken, negatif kontrol olarak kullanılan *M. tuberculosis* H37 Rv referans suşunda DNA bandı tespit edilmedi.

Sığırlarda PZR pozitifliğinin bakteriyoskopiye göre yüksek olmasının nedeni bakteriyoskopiye göre PZR'ın daha az sayıda bakteri gereksinimi olabilir. PZR'da kültüre göre daha düşük pozitiflik elde edilmesi ise, PZR inhibitörleri ve kullanılan örnek miktarının kültüre göre 1/20'i kadar olması ile açıklanabilir.

4. 3. 2. Restriksiyon Enzim Analizi (REA)

MTBC'nin genotiplendirilmesinde, DNA polimorfizmine dayanan yöntemler kullanılmaktadır. DNA hibridizasyon yöntemi, IS*6110*-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), spoligotiplendirme ve 12-15-24 lokus MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetetive Units-Variable Number of Tandem Repeat) moleküler genotiplendirme için belirlenen yöntemleridir.. Bu yöntemlerin her birinin üstün ya da zayıf yönleri bulunmaktadır (Yardımcı ve ark 2007). Mikobakterilerin kısa sürede tiplendirilmesi amacıyla geliştirilen PZR-REA (Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon enzim analizi) yöntemi, DNA'nın, restriksiyon enzimleriyle kesilmesi prensibine dayanmaktadır. Bu yöntem hibridizasyon basamakları ve radyoaktivite içermemektedir (Esen 2003).

M. tuberculosis kompleks türlerinde, REA (restriksiyon endonuclease analizi) ile *M. tuberculosis* kompleks üyelerini ayırt etmişlerdir. İlk aşamada *gyr* bölgesini kodlayan 1020 bp primerler ile PZR gerçekleştirilmekte, ikinci aşamada ise oluşan PZR ürünlerinin *RsaI* ve *SacII* enzimleri ile REA ve agaroz jel elektroforezi yapılamaktadır (Kasai ve ark 2000, Chimara ve ark 2004).

M. bovis subsp. *caprae*, ilk olarak koyun ve keçilerden daha sonra evcil ve yabani sığırlardan, insanlardan, atlardan, kedi, köpek ve domuzlardan izole ve identifiye edilmiştir (Niemann ve ark 2002, Prodinger ve ark 2002, Lantos ve ark 2003). Aranaz ve ark (1999), keçilerden izole ettikleri suşların farklılıklarını ortaya koymuşlar ve *M. bovis subsp. caprae* olarak isimlendirilmesini önermişlerdir.

Sayın (2010) ve Sayın ve Erganiş (2011) Türkiye'de ilk kez sığır tüberküloz vakalarında izolatların 24'ü (%20,5), doku örneklerinin 18'inin (%17) *M. bovis ssp. caprae M. bovis* subsp. *caprae* izole ve identifiye edildiğini bildirmiştir.

Prodinger ve ark (2002), 4 insan, 3 sığır ve 5 yabani kırmızı geyikten *M. bovis* subsp. *bovis caprae* izole edildiğini, 4 insandan 2'sinin sığır yetiştiriciliği ile uğraştığını ve 1'inin sığır çiftliğine yakın bir yerde yaşadığını ama keçiler ile temaslarının bulunmadığını bildirmişlerdir. Etkenin kırsal alanlardaki hayvanlarda bulunduğundan dolayı insan tüberkülozu için önemsiz olamayacağını bildirmişlerdir.

Ağaçayak ve ark (2007), kültür pozitif 51 balgam örneğinden PZR ile *M. tuberculosis* kompleks olarak belirledikleri 44 PZR ürününe, *Rsa*I RE enzimine ek olarak *Taq*I RE enzimi ile 34'ünü *M. tuberculosis*, 8'ini *M. bovis*, 1'ini *M. microti* ve 1'ini *M. africanum* olarak tespit etmişlerdir. Çalışma ile ülkemizin tüm bölgelerindeki tür dağılımının moleküler yöntemlerle belirlenmesinin tüberküloz ile savaşta başarılı olabilmek için gerekli olduğu rapor edilmiştir.

Bayraktar ve ark (2011), *M. tuberculosis* kompleks olarak tespit edilen 188 izolatın *RsaI* ve *TaqI* enzimleri ile REA analizi sonucunda 177'sinin *M. tuberculosis*, 8'inin *M. bovis* ve 3'ünüde *M. caprae* olarak identifiye edildiğini, *M. bovis* olarak tespit edilen 8 izolattan 1'inin BCG aşısı yapılmış bir yaşında bir çocuktan izole edilen ve Geno-Type MTBC testi (Hain Lifescience, Nehren, Germany) ile *M. bovis* BCG olarak tiplendirilen suş olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma sonuçlara göre insanlarda *M. bovis* kaynaklı tüberküloz %5,3 düzeyinde olduğu, sığır sürülerinde tüberkülozun kontrol altına alındığını kabul edilsede enfekte hayvanlardan insanlara bulaşma nedeniyle primer *M. bovis* enfeksiyonları Türkiye'de hala bir sorun olarak devam ettiği, rutin mikobakteriyolojik laboratuar çalışmalarında *M. bovis*'in sık identifiye edilmesi ve pirazinamide olan direnci ile daha fazla bir öneme sahip olduğu bildirilmiştir.

Niemann ve ark (2000b), 30 *M. tuberculosis* kompleks izolatların fenotipik ve genotipik özelliklerini karşılaştırdıklarında, *M. tuberculosis* ve *M. africanum subtype II* dışındaki mikobakterium üyelerinin PZR-RFLP analizleri ile biyokimyasal testlere oranla daha kolay ve daha kısa sürede yapılabileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, 62 sığıra ait 47 lenf düğümü ve 28 granülom örneği ve 87 izolatın *M. tuberculosis* kompleks olarak tespit edilen PZR ürünlerinin RsaI enzimi ile REA (Restriksiyon Endonüklease Analizi) sonucu 13 sığıra ait 7 granülom ve 8 lenf düğümü izolatında ise 280 ve 740 bp büyüklüğünde DNA bantları oluştu. Bu suşlarda *M. bovis* subsp. *bovis caprae* olarak identifiye edildi.

4. 3. 3. Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number Tandem Repeats (MIRU-VNTR)

Tüberkülozda etkenin kaynağının birçok vakada tam olarak belirlenemeyişinde yeterli bilgi eksikliği veya epidemiyolojik olarak iyi değerlendirilmeme en önemli sınırlamalar olarak karşımıza çıkmaktadır (Frothingham ve Meeker-O'Connell 1998). Moleküler yöntemlerin geliştirilmesi ile artan epidemiyolojik araştırmalarla, özellikle reenfeksiyon-reaktivasyon ayrımının yapılabilmesi, salgınlarda kaynağın ve dinamiğin belirlenmesi, iatrojenik enfeksiyonların ve laboratuvar kontaminasyonları belirlenebilmektedir. Önceleri IS*6110* REA ve/veya PGRS (polimorfik GC rich sequence - polimorfik GC'den zengin bölge) yöntemler yerini, son yıllarda spoligotyping (spacer oligonucleotide typing) ve MIRU-VNTR gibi yöntemlere bırakmaktadır (Esen 2003).

Ayrım gücü ve tekrarlanabilirliği yüksek, uygulaması kolay, çok merkezli çalışmalara uygun, otomatize edilebilir ve hızlı sonuç verebilen MIRU-VNTR'ın, hızlı sonuç vermesi, fazla miktarda DNA gerektirmemesi, canlı olmayan örneklerde uygulanabilmesi en önemli avantajlarındandır (Esen 2003, Zeytinli 2010). IS*6110* RFLP ve spoligotipleme ile kıyaslandığında, MIRU-VNTR yöntemiyle tiplendirme daha fazla ayırıcı profil oluşturmaktadır (Peterson 2009, Esen 2003). *M. tuberculosis* kompleks izolatları için duyarlı ve özgüldür (Esen 2003, Zeytinli 2010).

Frothingham ve Meeker-O'Connell (1998) bazı bakterilerde yapılan bağımsız VNTR lokuslarının analizi yerine, ilk kez *M. tuberculosis* kompleks suşlarında 11 VNTR bölgesi belirleyerek tandem tekrarlarının sistematik bir analizini gerçekleştirmişlerdir. VNTR lokuslarının sonuçlarını kombine ederek, 25 *M. tuberculosis* kompleks suşunda 22, 3 *M. africanum* suşunda 2, 6 *M.bovis* suşunda 7, 14 *M. tuberculosis* suşunda 13 VNTR profili elde etmişlerdir.

Roring ve ark (2002), Frothingham ve Meeker-O'Connell (1998)'in kullandığı MIRU-VNTR setini kullanarak, 27 sığır ve 20 porsuktan izole edilen 47 *M. bovis* suşunda 14 farklı VNTR profili elde ettiklerini, VNTR 1895, VNTR 3232, VNTR 3336, ETR-A ve ETR-B (h=0.87) oluşan setin en yüksek ayrım gücüne sahip MIRU lokusları olduğunu bildirmişlerdir.

Allix ve ark (2006) , Belçika'da 77 farklı çiftlikte bulunan sığırlardan izole edilen 127 *M. bovis* izolatını, spoligotyping, IS*6110* RFLP analizi ve 29 lokus MIRU-VNTR yöntemleri ile değerlendirdikleri çalışmada, MIRU-4 ve MIRU-26 lokuslarının da yer aldığı 9 MIRU lokuslu (**MIRU-4, MIRU-26,** VNTR 3232, ETR-B, ETR-A, QUB11b, QUB11a, ETR-C, VNTR 4156**)** set ile en yüksek ayrım gücünü elde ettiklerini, bu set içinde Roring ve ark (2004) ve Skuce ve ark (2002) tarafından da bildirilen ve MIRU-26 lokusunda bulunduğu 6 lokusun (VNTR3232, ETR-A ve B, **MIRU 26,** QUB 11a ve 11b) en yüksek allel farklılıklığını ortaya koyduğunu bildirmişlerdir. MIRU-VNTR verilerin taşınabilirliği ve uluslararası entegre bir standart veritabanı geliştirilmesi ile patojenin dünya çapındaki izlenmesi için çok yararlı olabileceğini, özellikle IS*6110* RFLP ile karşılaştırıldığında MIRU-VNTR uygun, hızlı ve tekrarlanabilir bir teknik olduğunu belirtmişlerdir.

İspanya'da Donana National Park'ta bulunan sığır ve yaban hayvanlarından (geyik, vaşak, yaban domuzu, tilki vb) izole edilen 92 *M. bovis* izolatından 8 farklı MIRU-VNTR profili elde edilen çalışmada, ETR-A + QUB 11b + **MIRU-4** setinin ayrım gücü 0.44 iken, MIRU-4'ün yalnız başına ayrım gücü 0.34, MIRU-40'ınki ise 0.02 olmuştur. Ayrıca *M.bovis*'in aynı spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR profilinin sığır ve etoburlar gibi vahşi hayvanlar tarafından paylaşıldığı da araştırıcılar tarafından ortaya konmuştur (Romero ve ark (2008).

Cvetnic ve ark (2006) 6 sığır ve 4 domuzdan izole edilen *M. bovis* subsp. *caprae* izolatlarını 12 lokus MIRU-VNTR analizi ile test ederek tek tip VNTR profili elde ettiklerini bu nedenle domuz ve sığırları enfekte eden suşun aynı olduğunu, ayrıca *M. bovis* subsp. *caprae* izolatlarının Hırvatistan'da domuzlardan izole ve identifiye edilen ilk suşlar olduğunu bildirmişlerdir.

Besirovic ve ark (2012) Bosna-Hersek'te aralarında 130 km mesafe bulunan iki bölgedeki sığırlardan ilk kez izole ve identifiye edilen 5 *M. bovis* subsp. *caprae* suşlarından 12 lokus MIRU-VNTR analizi ile 2 farklı VNTR profili elde ettiklerini, dolayısıyla her iki bölgedeki suşlar arasında ilişiki olmadığını ve ayrım oluşturan MIRU lokuslarının ise, **MIRU-10, MIRU-16** ve **MIRU-31** olduğunu raporlamışlardır.

Matos ve ark (2010) Portekiz'de bir salgında izole edilen 20 *M. bovis* izolatından sadece 1 suşun diğer 19 suştan farklı VNTR profili oluşturduğunu, suşun

ayrımının ETR-A, ETR-C and MIRU4 lokuslarındaki farklılıktan kaynaklandığını, moleküler ve epidemiyolojik analiz sonucunun salgında etken olan klonal soyun kaynağının aynı olduğu kanaatine vardıklarını belirtmişlerdir.

Duarte ve ark (2010) sığır, yaban domuzu, keçi ve kızıl geyiklerden izole edilen 171 *M. bovis* ve 10 *M. bovis* subsp. *caprae* suşları ile yaptıkları çalışmada 8 lokus MIRU-VNTR analizi ile 87 farklı profil elde etmişler, **MIRU-26**'nın ayrım gücü 0.442 olurken, MIRU-4'ün ayrım gücünü ise 0.325 olarak tespit etmişlerdir. MIRU-4 lokusunun ayrım gücünün daha önce Supply ve ark (2006) tarafından bildirilenin aksine düşük kalmasının nedenini ise, VNTR lokuslarının ülkeler, coğrafik bölgeler ve epidemiyolojik senaryolar arasında değişkenliklerden kaynaklı olabileceği olarak ifade etmişleridir. Ayrıca vahşi hayattaki hayvanlar ile sığır suşları arasında ortak VNTR profili tespitinin sığırlar ve vahşi yaşam arasındaki geçişi teyit ettiğini, bu durumun bulaşma ve/veya ortak kontaminasyon kaynaklarının kullanımından kaynaklı olabileceğini belirtmişlerdir.

M. tuberculosis suşlarının 12 lokus MIRU-VNTR analizlerinde, Chatterjee ve Mistry (2013), MIRU-10, 16, 31, 39 ve 40'ın ayrım gücünün yüksek, MIRU-26'nın ise en yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yine Jafarian ve ark (2010) ile Guo ve ark (2011) en yüksek ayrım gücüne sahip lokusların MIRU-10, 16, 26, 31 and 40 olduğunu, Nikolayevskyy ve ark (2006) ise, MIRU 10, 23, 26, 31 ve 40 olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada 70 sığıra ait izolatın (57 *M. bovis* ve 13 *M. bovis* subsp. *caprae*) 12 lokus MIRU-VNTR yöntemi ile analizi sonucu; MIRU2, MIRU4, MIRU20, MIRU23, MIRU24, MIRU27 ve MIRU39 lokuslarındaki tekrar sayılarının suşlar arasında farklılık göstermediği, MIRU10, MIRU16, MIRU26, MIRU31 ve MIRU40 lokuslarındaki tekrar sayılarının ise suşlar arasında farklılık gösterdiği ve bu lokusların yüksek ayrım gücüne sahip olduğu ($0,25 \leq h$) belirlendi.

Ayrıca 12 lokus MIRU-VNTR yöntemi ile yapılan genotiplendirmede izolat sayısı 1-14 arasında değişen 29 subgrup oluştuğu, 16. subgrubun 14 üyeye sahip en büyük gen grubunu oluşturduğu, bunu 8 üyeye sahip 18. grubun takip ettiği, 17. subgrubun 5 üyeye sahip olduğu, 1 subgrubun 4 üyeye sahip olduğu, 3 subgrubun 3 üyeye sahip olduğu, 8 subgrubun 2 üyeye sahip olduğu ve 14 subgrubun ise tek üyeye sahip olduğu tespit edildi. Bu çalışma ve yapılan farklı araştırmalarda, MIRU

lokuslarında değişik ayrım gücü elde edilmesinin sebebi; suşların ülkeler ve coğrafik bölgeler arasında farklılık göstermesinden kaynaklanabilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Bakteriyoskopik muayenenin sensitivitesinin düşük olduğu bildirilmesine rağmen sığır ve kanatlı örneklerinde tüberkülozun teşhisinde yüksek sensitiviteye sahip olduğu belirlendi. Bu çalışmada, maksatlı örnekleme yapıldığından dolayı alınan örneklerin lezyonlu dokulardan oluşması bu yüksek sensitivitenin sebebi olabileceği kanaatine varıldı. Bakteriyoskopinin ucuz, kolay uygulanabilen ve hızlı sonuç veren bir test olmasından dolayı tüberkülozun endemik olduğu bölgelerde teşhis için kullanılabileceği tespit edildi.

2. Kültür, altın standart olma özelliğini hala taşımakta olup, negatif basınçlı ortamlar gerektirmesi, uzun zamanda sonuç vermesi, diğer mikroorganizmalar özellikle de mantarlarla kontaminasyon riski, dekontaminantların toksik etkileri nedeniyle kültür negatifliğinin oluşması, ortam ve çalışana bulaşma riskleri nedeniyle kullanım kolaylığının olmadığı belirlendi.

3. PZR'ın postmortem örneklerde sensitivitesinin kültüre göre düşük olmasına rağmen, erken ve hızlı tanı sağladığı, epidemiyolojik araştırmalarda kullanılabildiğinden ötürü bu tür çalışmaların arttırılması gerektiği sonucuna varıldı.

4. RE analizinin, biyokimyasal testlere göre hızlı, pratik ve güvenli bir yöntem olarak *M. tuberculosis* kompleks türlerinin identifikasyonunda kullanılabileceği belirlendi.

5. Üç farklı türe ait örnek ve izolatların incelendiği çalışmamızda sığırlarda *M. bovis* subsp. *bovis* ve *M. bovis* subsp. *caprae*, kanatlılarda *M. avium* subsp. *avium,* insanlarda ise *M. tuberculosis* başlıca etken olarak tespit edildi.

6. MIRU-VNTR yönteminin ekonomik, uygulanması kolay, ayırım gücü ve tekrarlanabiliriliği yüksek olması ile enfeksiyonun kaynağı, bulaşma dinamiği ve izolat farklılıklarının ortaya konmasında etkin bir epidemiyolojik araç olarak kullanılabileceği belirlendi.

Sonuç olarak, sığırlardan *M. bovis* subsp. *bovis* yanında özellikle Avrupa'da tüberkülozlu sığır ve insanlardan izole edilen *M. bovis* subsp. *caprae'*de izole ve identifiye edilmiştir. Kanatlılardan ise, patojen olan ve özellikle immun sistemi

baskılanmış insanlar için tehdit olan *M. avium* subsp. *avium* izole ve identifiye edilmiştir. Her ne kadar çalışmada identifiye edilen insan izolatların tamamı *M. tuberculosis* olarak identifye edilmiş, sığır ve kanatlı kökenli iki türe rastlanmamış olsa bile, bu türlerin insanlar için tehdit olduğu bilindiğinden özellikle *pyrazinamid* dirençli *M. bovis*'lerin insan vakalarında etken olabileceği dikkate alınmalı, *M. tuberculosis* kompleks olarak tespit edilen izolatların mutlaka alt tiplendirme çalışmaları yapılmalıdır. Özellikle, moleküler tiplendirme yöntemlerinin kullanılması ile çok değerli epidemiyolojik bilgiler edinilebileceğinden ve etkili tüberküloz kontrol programlarının geliştirilmesinde genotiplendirme yöntemlerinden yararlanıldığından bu tür çalışmalar arttırılmalı, zoonoz olan bu enfeksiyonun kayıplarını azaltmak için ülkesel eradikasyon çalışmalarına önem verilmelidir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sığır, Kanatlı Ve İnsanlardan İzole Edilen Mikobakterilerin Moleküler Tekniklerle Tiplendirilmesi

Yasin GÜLCÜ

Mikrobiyoloji (Vet) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/KONYA-2014

Bu çalışmada, sığır, kanatlı ve insanlardan mikobakterilerin izolasyonu, direk klinik materyalden PZR ile tespiti, rutin teşhiste kullanılabilirliği, moleküler tiplendirilmesi ve izolatların orjinlerinin belirlenmesi amaçlandı. Toplam 81 sığır granülom ve lenf düğümü ile 9 güvercin, 2 tavuk, 1 hindi ve 1 devekuşundan doku ve organ örnekleri toplandı. Örnekler Konya'daki kesimhaneler, kanatlı yetiştiricileri ve Konya Veteriner Kontrol Enstitüsüne gönderilen tüberküloz şüpheli materyalleerden alındı. İnsan izolatları (n=50) ise, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Tüberküloz Laboratuvarı kültür koleksiyonundan alındı. Doku örnekleri Zielh-Neelsen ile boyandı, Lowenstein-Jensen (LJ) besiyerine ekildi ve PZR analizleri (*M. tuberculosis* komplex ve *M. avium*'un tespiti, identifikasyonu ve Restriksiyon Endonükleaz Analizleri (REA) ile tiplendirilmesi) yapıldı.

Aynı zamanda, LJ'de izole edilen mikobakteri türleri de ZN ile boyandı ve PZR analizleri yapıldı. Sığır örneklerinin bakteriyoskopisinde; 25 granülom ve 43 lenf düğümü örneğinde mikobakterium şüpheli basiller gözlendi. Kültürde; 32 granülom ve 55 lenf düğümü örneğinden LJ'de mikobakterium şüpheli R tipi koloniler izole edildi. Kanatlı örneklerinden, 3 güvercin, 1 devekuşu ve 1 hindiye ait 4 dalak ve 4 karaciğer örneğinde bakteriyoskopi ile mikobakterium basilleri gözlendi. Aynı zamanda, LJ'de 4 dalak ve 5 karaciğer örneğinden mikobakteri şüpheli koloniler izole edildi. PZR yoklamalarında 28 granülom ve 47 lenf düğümü örneğinde ve LJ'de üreyen 87 şüpheli izolat *M. tuberculosis complex* olarak belirlendi. PZR ürünlerinin REA'sında; izolatların 70'i *M. bovis* ve 17'si *M. bovis* subsp. *caprae* olarak identifiye edildi. PZR ile kanatlılarda üreyen 9 izolatın tümünün *M. avium*, insanlara ait 50 izolatın ise *M. tuberculosis* olduğu gözlendi. MIRU-VNTR analizi ile MIRU-10, MIRU-16, MIRU-26, MIRU-31 ve MIRU-40 lokuslarının yüksek ayrım gücüne sahip olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak, sığırlarda *M. bovis* subsp. *bovis* ve *M. bovis* subsp. *caprae*'nin, kanatlılarda *M. avium* subsp. *avium*'un, insanlarda ise *M. tuberculosis*'in tüberkülozun ana etken olduğu belirlendi.

Anahtar Sözcükler: *Moleküler tiplendirme;M. avium;M. bovis;M. tuberculosis;tüberküloz.*

7. SUMMARY

Molecular Typing of Mycobacteria Isolated from Bovine, Poultry and Human

This study was aimed to isolate mycobacteria from bovine, poultry and human, to detect directly from clinical materials by PCR, usability in routin diagnosis, molecular typing and to determine origin of isolates. Samples were collected from 81 bovine granulomas and lymph nodules, tissues 9 pigeons, 2 chickens, 1 turkey and 1 ostrich. Samples from tuberculosis suspected materials were provided by slaughterhouses located in Konya Province, poultry production farmers and Veterinary Control Instıtute of Konya. In addition, human isolates (n=50) were obtained from culture collection of National Tuberculosis Reference Laboratory, Public Health Institution of Turkey. All the tissue samples were first stained by Ziehl-Neelsen, were them cultured on Lowenstein-Jensen (LJ) medium and were analysed by PCR (for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *M. avium,* identification and typing by Restriction Endonuclease Analyses).

Also, mycobacteria strains isolated on LJ were stained by ZN and analysed by PCR. In microscopic examination of bovine samples; AFB results were positive in 25 granulomas and 43 lymph nodules. In culture; mycobacteria strains like-R type were isolated from 32 granulomas and 55 lymph nodules. In microscopic examination of poultry samples; AFB positivities were determined in 3 spleens and 4 livers belong to pigeon, ostrich and turkey. Also, suspected mycobacterial colonies were isolated from 4 spleens and 5 livers. *M. tuberculosis complex* were determined by PCR from 28 bovine granulomas and 47 lymph nodules and 87 mycobacteria isolates. According to the results of REA, a total of 70 strains were identified as *M bovis* and 17 were *M. bovis* subsp. *caprae.* All of the poultry isolates were detected to be *M. avium*, while all human isolates were *M. tuberculosis*. The maximal resolution of MIRU-VNTR typing was achieved using MIRU10, 16, 26, 31 and 40 loci by MIRU-VNTR analysis.

In conclusion, this study shown that *M. bovis* subsp. *bovis* and *M. bovis* subsp. *caprae* in cattle, *M. avium* subsp. *avium* in poultry and *M. tuberculosis* in human have been found to be main agents for tuberculosis.

Key words : *Molecular typing; M. avium; M. bovis*; *M. tuberculosis; tuberculosis.*

8. KAYNAKLAR

1. Abass NA, Süleimann KM ve El-Jalii IM. Differentiation of clinical *Mycobacterium complex* Isolates by their GyrB polymorphism. Indian J. Med. Microbiol. 2010; 28 (1):26-29.

2. Adu-Bobi NAK, Mak-Mensah EE, Achel DG, Gyamfi KD, Bedzra KD. Preliminary investigation of bovine tuberculosis in suspected beef from a metropolitan abattoir in Ghana with ziehl-neelsen microscopy. Pakistan J. Biol. Sci., 2009; 12 (17); 1222-1225.

3. Ağaçayak A, Bulut Y, Seyrek A. Elazığ yöresinde tüberkülozlu hastaların balgam örneklerinde mikobakteri tür dağılımının PCR-RFLP yöntemi ile belirlenmesi. Mikrobiyol. Bült. 2007; 203-209.

4. Akay Ö. Aside-dirençli bakteriler. In: Arda M, editör. Özel Mikrobiyoloji. 5.Baskı. Ankara: Medisan Yayınevi. 1997: 179-198.

5. Akçay E. Sığır tüberkülozu. Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. Erişim tarihi: 20.10.2011. http://www.etlikvet.gov.tr/Vethalksagligi/tuberkuloz.htm.

6. Albay A. Tüberküloz immün profilaksisinde umut vaad eden son gelişmeler. Trabzon Mikobakteri Günleri. s107-109. 4-7 Kasım 2009. Trabzon.

7. Allix C, Walravens K, Saegerman C, Godfroid J, Supply P, Fauville-Dufaux M. Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS*6110* restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. J. Clin. Microbiol. 2006; 44(6): 1951-1962.

8. Ali B, Anjum A, Mahmood S, Wadood MA, Shakoori AR. Identification of bovine and human tuberculosis in afb positive and negative patients. Pakistan J. Zool. 2013; 45(1): 255-260.

9. Al-Saqur I, M Al-Thwani AN, Al-Attar IM. Detection of *Mycobacteria spp* in cows milk using conventional methods and PCR.Iraqi J. Vet. Sci. 2009; 23(2) : 259-262.

10. Ambrosio SR, Oliveira EMD, Rodriguez CAR, Neto CSF, Amaku M. Comparison of three decontamınation methods for *Mycobacterıum bovis* isolatıon. Brazilian J. Microbiol. 2008; 39: 241-244.

11. Aranaz A, Liebana E, Gomez-Mampaso E, Galan JC, Cousins D, Ortega A, Blazquez J, Baquero F, Mateos A, Suarez G, Dominquez L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov. a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. Int. J. Syst. Bact. 1999; 49: 1263- 1273.

12. Arda M. Tüberkülozis. In: Arda M, Minbay A, Aydın N. ed. Özel Mikrobiyoloji, 1.Baskı. Ankara Üniversitesi Basımevi. 1982 : 324-361.

13. Arda M. Boyalar ve boyama metotları. Temel Mikrobiyoloji. 1. Baskı. Ankara. Medisan Yayınevi. 1997: 281-289.

14. Aslan G, Kuyucu N, Çalıkoğlu M, Ersöz G, Ülger M, Günal S, Emekdaş G. M*ycobacterıum bovis*'in etken olduğu tüberküloz olguları. Ankem Derg. 2009; 23(4): 182-187.

15. Awah-Ndukum J, Kudi AC, Bradley G, Smith NH, Ane-Anyangwe I, Cho-Ngwa F, Titanji VPK. Molecular genotyping of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle tissues in the North West Region of Cameroon. Trop. Anim. Health Prod. 2013; 45: 829-836.

16. Ayele WY, Machackova M, Pavlik I. The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. Vet. Med.-Czech. 2001; 46: 205-224.

17. Barış Yİ. Çağlar Boyu Tüberküloz. 21. yy'da Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı. s1-7, 2003, Samsun.

18. Barnes DS. Historical perspectives on the etiology of tuberculosis. Microbes and Infection. 2000;2: 431-440.

19. Barani R, Sarangan G, Antony T, Periyasamy S, Jyoti K, Srikanth P. Improved detection of *Mycobacterium tuberculosis* using two independent PCR targets in a tertiary care centre in South India. J. Infect. Dev. Ctries. 2012; 6 (1) : 46-52.

20. Bartos M, Hlozek P, Svastova P, Dvorska L, Bull T, Matlova L, Parmova I, Kuhn I, Stubbs J, Moravkova M, Kintr J, Beran V, Melicharek I, Ocepek M, Pavlik I. Identification of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-Probes, serotyping, and single IS900, IS901, IS1245 and IS901-flanking region PCR with internal standards. J. Microbiol. Meth. 2006; 64: 333–345.

21. Bayraktar B, Bulut E, Barış A, Toksoy B, Dalgıç N, Çelikkan Ç, Sevgi D. Species distribution of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates from 2007 to 2010 in Turkey: a prospective study. J. Clın. Mıcrobıol. 2011: 3837-3841.

22. Bayram G ve Emekdaş G. Mikobakteri türlerinin identifikasyonunda polimeraz zincir reaksiyonu-parça uzunluk polimorfizmi tekniği ile klasik yöntemler arasındaki uyumun belirlenmesi. Mersin Üniv. Sağl. Bil. Derg. 2008; 1(3): 8-13.

23. Bengisun JS, Gökırmak MÇ, Arıbal E, Saygun N, Özenci E. Tüberkülozun serolojik tanısında ELISA testinin tanı değeri. Ankara Üniv. Tıp Mecm. 1997; 50 (4): 193-195.

24. Besirovic H, Amer A, Spicic S, Cvetnic Z, Prasovic S, Velic L. Bovine tuberculosis in Bosnia and Herzegovina caused by Mycobacterium caprae. Vet. Arhiv. 2012; 82 (4): 341-349.

25. Bilgehan H. Aşırı duyarlılık tepkimeleri. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. 9. Baskı. İzmir, Barış Yayınları. 1999; 492-531.

26. Boniotti MB, Goria M, Loda D, Mondo A, Tisato E , Zanoni M, Zoppi S, Dondo A, Tagliabue S, Bonora S, Zanardi G, Pacciarini L. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of Variable-Number Tandem Repeats for geographically optimized genotyping. J Clin Microbiol, 2009; 47: 636–644.

27. Bougiouklis P, Brellou G, Fragkiadaki E, Iordanidis P, Vlemmas I, Georgopoulou I. Outbreak of avian mycobacteriosis in a flock of two-year-old domestic pigeons (Columba livia f. domestica). Avian Dis. 2005; 49: 442-445.

28. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci. 2002; 99(6): 3684-3689.

29. Buddle BM, Pollock JM, Skinnera MA ve Wedlock DN. Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. Int. J. Parasitology. 2003; 33(5-6) : 555–566

30. Cardoso SL, Briones MRS, Sircili MP, Balian SC, Mores N, Neto JSF. Identification of two novel *Mycobacterium avium* allelic variants in pig and human isolates from Brazil by PCR-Restriction Enzyme Analysis. J. Clin. Microbiol. 1999; 37: 2592-2597.

31. Cavanagh R, Begon M, Bennett M, Ergon T, Graham IS, Haas PEW, Hart CA, Koedam M, Kremer K, Lambin X, Roholl P ve Soolingen D. Mycobacterium microti Infection (Vole Tuberculosis) in Wild Rodent Populations. J. Clin. Microbiol. 2002: 3281-3285

32. Ceyhan İ, Tarhan G, ımcı H. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated from varied origins, Türk Klinik Laboratuvar Dergisi. 2010; 1(1): 7-11.

33. Chatterjee A and Mistry N. MIRU-VNTR profiles of three major *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes found in western India. Tuberculosis. 2013; 93: 250-256.

34. Chen P, Shi M, Feng GD, Liu JY, Wang BJ, Shi XD, Ma L, Liu XD, Yang YN, Dai W, Liu TT, He Y, Li JG, Hao XK, Zhaoa G. A highly efficient ziehl-neelsen stain: Identifying *de novo* intracellular *Mycobacterium tuberculosis* and improving detection of extracellular *M. tuberculosis* in cerebrospinal fluid. J. Clin. Microbiol. 2012; 50 (4) : 1166-1170.

35. Chimara E, Ferrazoli L, Leo SC. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using *gyrB* restriction fragment length polymorphism analiysis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2004; 99(7) : 745-748.

36. Chukwu ID, Chukwu COO, Kandakai-Olukemi YT, Owolodun O, Nwosuh C, Agada GO, Audu BJ, Chollom SC. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in lung specimen of slaughtered cattle and goats by a DNA based multiplex polymerase chain reaction and ziehl-neelsen methods in jos, Nigeria, British Microbiol. Res. J. 2013; 3(4): 550-556.

37. Coetsier C, Pascal V, Blondeel N, Denef JF, Cocito C, Gala JL. Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin- fixed paraffin-embedded tissues from cattle. J Clin Microbiol. 2000; 38(8): 3048-3054

38. Colditz GA, Berkey CS, Mosteller F, Brewer TF, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV. The efficacy of Bacillus Calmette-Guérin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: Meta-analyses of the published literature pediatrics. 1995; 96(1): 29-35.

39. Corner LA ve Trajstman AC. An evaluation of 1- hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of Mycobacterium bovis from bovine lesions. Vet. Microbiol. 1998; 18: 127-134.

40. Corner LAL, Gormley E, Pfeiffer DU. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: Conditions for maximising the number of positive cultures. Vet. Microbiol. 2012; 156: 162-171.

41. Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HFKA, Kantor I, Melsin FX. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerg Infect Dis. 1998 : 4(1): 59-70

42. Cousins DV, Wilton SD, Francis BR, Gow BL. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 1992; 30 (1): 255-258.

43. Coyle MB, Carslon LC, Wallis CK, Leonard RB, Raisys WA, Kılburn JO, Samadpour M Böttger EC. Laboratory aspects of "Mycobacterium genavense," a proposed species isolated from AIDS patients. J Clin Microbiol.1992: 3206-3212

44. Cvetnic Z, Spicic S, Katalinic-Jankovıc V, Marjanovic S, Obrovac M, Benic M, Mitak M, Pavlik I. Mycobacterium caprae infection in cattle and pigs on one family farm in Croatia: a case report. Veterinarni Medicina. 2006; 51(11): 523–531

45. Çalışır HC. Tüberküloz. 2004. Erişim tarihi: 13.06.2010 http://www.toraks.org.tr/kisokulu3-ppt-pdf/Haluk_calisir.pdf.

46. Çavuşoğlu C, Akıncı P, Söyler İ, Bayram N, Vardar F. Yaygın *Mycobacterium bovis* BCG infeksiyonunun laboratuar tanısı. İnfeksiyon Dergisi *(Turkish Journal of Infection)* 2007; 21 (1): 39-44

47. Çelik GE. BCG aşısı. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi. 1994; 14: 439-441.

48. Daniel TM, Boom WH, Ellner JJ. Immunology of tuberculosis. In: Reichmann LB, Hershfield ES.Ed. Tuberculosis A Comprehensive Internationale Approach. Second Edition. New York, Basel. 2000 : 187-204.

49. Daniel TM. The History of Tuberculosis. Respiratory Medicine. 2006; 100: 1862-1870.
de Valliere S, Abate G, Blazevic A, Heuertz RM, Hoft DF. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. Infect Immun 2005; 73: 6711- 6720.

50. Diker S. Aşırı duyarlılık reaksiyonları. İmmunoloji. 1. Baskı. Ankara, Medisan Yayınevi. 1998; 237-253.

51. Duarte EL, Domingos M, Amadoa A, Cunhaa MV, Botelhoa A. MIRU-VNTR typing adds discriminatory value to groups of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* strains defined by spoligotyping. Veterinary Microbiology. 2010; 143: 299-306.

52. Durupınar B. Mikobakteriler ve Çevre Koşullarına Dayanıklılıkları. O.M.Ü. Tıp Dergisi. 1996; 13(4) : 297-304.

53. Dvorská L, Bartoş MG, Erler W, Pavlik I. Strategies for differentiation, identification and typing of medically important species of mycobacteria by molecular methods. Vet. Med.- Czech. 2001; 46 (11-12): 309-328.

54. Ekinci T. 1996-2008 yılları arası çok ilaca dirençli akciğer tüberkülozu olgularımızın değerlendirilmesi. İstanbul Süreyyapaşa Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Uzmanlık Tezi. 2009.

55. Ereqat S, Nasereddin A, Levine H, Azmi K, Al-Jawabreh A, Greenblatt, CL, Abdeen Z, Bar-Gal GK. First-time detection of *Mycobacterium bovis* in livestock tissues and milk in the west bank, Palestinian Territories. PLoS. Negl. Trop. Dis. 2013; 7(9) : 1-8.

56. Erganiş O. Mycobacterium cinsi. Mikrobiyoloji ve immünoloji. 2.baskı. Konya Sağlık Eğitim Enst.Yayınları. 1994; 299-304.

57. Erganiş O ve İstanbulluoğlu E. Aşırı duyarlılık reaksiyonları. İmmunoloji. 2. Baskı. Konya, S. Ü. Vet. Fak. Yayın Ünitesi. 1999; 95-106.

58. Erganiş O, Kav K, Sayın Z, Hadimli HH. Anadolu yaban koyunlarında (ovis gmelini anatolica) *Mycobacterium avium subs. paratuberculosis*'in ilk izolasyonu ve moleküler karekterizasyonu. IX.Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi. s50. 5-7 Ekim 2010. Yakındoğu Üniverisitesi. Lefkoşa, KKTC

59. Eriks IS, Munck KT, Besser TE, Cantor GH, Kapur V. Rapid differentiation of *Mycobacterium avium* and *M. paratuberculosis* by PCR and restriction enzyme analysis. J. Clin. Microbiol. 1996; 34 (3): 734-737.

60. Eriş FN, Yuluğ N, Öztürk S. Laboratuvarımızda hazırladığımız Enzim-Bağlı-Immün Assay (ELISA) kitleri ile tüberkülozda IgG yanıtının araştırılması. Toraks Derg. 2000; 1(1) : 35-40.

61. Ertürk M. Tüberküloz immünolojisi. Trabzon Mikobakteri Günleri. s98-102. 4-7 Kasım 2009. Trabzon

62. Erwin PC, David AB, Mawby DI, McCombs SB, Lorinda LS, Himelright IM, Halford SK,DiemLD, Metchock B, Jones TF, Schilling MG, Thomsen BV. *Mycobacterium tuberculosis* transmission from human to canine. Emerg Infect Dis. 2004; 10(12): 2258-2259.

63. Esen N. Tanı ve ilaç duyarlılık testlerinde moleküler yöntemlerin değeri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Tanı Yöntemleri Kursu. s402-408, 2003, Samsun.

64. Fine PEM. BCG vaccines and vaccination. In:Reischmann LB, Hershfield ES ed. Tuberculosis, A Comprehensive International Approach, Second Edition. Newyork. Marcel Dakker. 2000; 503-520.

65. Fokkens WJ and Scheeren RA. Upper airway defence mechanisms. Paediatric Respiratory Reviews. 2000;1: 336-341.

66. Folgueira L, Delgado R, Palenque NAR. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples by using a simple lysis method and polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1993; 31 (4): 1019-1021.

67. Frothingham R and Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology. 1998; 144: 1189-1196.

68. Foulds J and O'Brien R. New tools for the diagnosis of tuberculosis: the perspective of developing countries. The Int. J. Tubercle Lung Dis. 1998; 2(10): 778-783.

69. Gedikoğlu S. Klasik tanı yöntemlerinde yaşanan sorunlar. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. s75-80, 2003, Samsun.

70. Gerhold RW ve Fischer JR. 2005. Avian tuberculosis in a wild turkey. Avian Dis. 2005; 49: 164-166.

71. Giacomini E, Iona E,Ferroni L, Miettinen M, Fattorini L, Orefici G, Julkunen I, Coccia EM. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* ınduces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. The J. Immuno. 2001; 166: 7033-7041.

72. Gonzalez M, Rodriguez A, Gimeno I, Flores J, Pizarro M. Outbreak of avian mycobacteriosis in 48-week-old commercial layer hen flock. Avian Dis. 2002; 46: 1055-1061.

73. Grange JM. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. Tuberculosis. 2001; 81: 71-77.

74. Gutiérrez CMM ve García MJF. Comparison of Ziehl-Neelsen staining and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and caprine tuberculous lesions. J. Compo Path. 1993; 109: 361-370.

75. GTHB. Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü. 30.12.2013.

76. Guo J, Xiang W, Zhang G, Luo T, Xie N, Yang Z, Sun Q. Mycobacterial interspersed repetitive unit typing in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Sichuan Province in China. Indian J Med Res. 2011; 134: 362-368.

77. Gümüşsoy KS, Beyaz L, Aydın F, Özcan M, Atasever A. Kayseri hayvanat bahçesinde kanatlı tüberkülozisi. Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg. 2006; 3 (1) : 25-28.

78. Güneş S, Bağcı H, Kara N. Tüberküloz tanısında polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırılması. O. M. Üniv. Tıp Derg. 2002; 19: (1) 8-14.

79. Gyles CL and Thoen CO. Pathogenesis of bacterial ınfections in animals.Second Edition.Iowa State University Press. 1993 : 44-56.

80. Haas WH, Bretzel G, Amthor B, Schilke K, Krommes G, Rüscgerdes S, Sticht-Groh V, Bremer HJ. Comparison of DNA fingerprint patterns of isolates of *Mycobacterium africanum* from east and west Africa. J Clin Micro. 1997: 663-666.

81. Hawkey PM. The role of polymerase chain reaction in the diagnosis of mycobacterial infections. Rev. Med. Microbiol. 1994; 5: 21-32.

82. Hazıroğlu R, Tüberkülozis. In: Hazıroğlu R, Milli Ü, ed. Veteriner Patoloji II. Cilt, 1. Baskı, Ankara, Tamer Matbaacılık ve Yayıncılık, 1998 ; 83-91.

83. Heifets C, Linder T, Sanchez T, Brennan J. Two liquid medium systems, mycobacteria growth indicator tube and MB redox tube, for mycobacterium tuberculosis isolation from sputum specimens. J Clin Micro. 2000; 38: 1227-30.

84. Hernández-Pando R, Chacón-Salinas R, Serafín-López J, Estrada I. Immunology, Pathogenesis, Virulence.In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V, editors. Tuberculosis 2007 From basic science to patient care. First edition. Brazil. 2007: 157-184.

85. Hewinson G. Introduction to M. bovis issue. Tuberculosis. 2001; 81(1/2): 3-4.

86. Hoop RK, Bottger EC, Pfyffer GE. Etiological agents of Mycobacterioses in pet birds between 1986 and 1995. J Clin Micro. 1996: 991-992.

87. Hueloner RE, Schein MF, Bass JB Jr. The tuberculin skin test. Clin. Infect. Dis. 1993; 17: 968 975.

88. Inderlied CB, Kemper CA, Bermudez LEM. The *Mycobacterium avium* complex. Clin Microbiol Rev. 1993: 266-310.

89. İşitez M, Çetinkaya Z, Altındiş M, Çiftçi İ, Fidan F. Afyon bölgesinde Löwenstein-Jensen, Bactec ve TK Medium yöntemleri ile izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının dört major ilaca karşı dirençlerinin belirlenmesi. Kocatepe Tıp Derg. 2004; 5: 45-48.

90. Jafarian M, Aghali-Merza M, Farnia P, Ahmadi M, Masjedi MJ, Velayati AA. Synchronous comparison of *Mycobacterium tuberculosis* Epidemiology strains by "MIRU-VNTR" and "MIRU-VNTR and Spoligotyping" Technique. Avicenna J Med Biotech, 2010; 2(3): 145-152

91. Joloba ML, Johnson JL, Namale A, Morrissey A, Assegghai AE, Rüsch-Gerdes S, Mugerwa RD, Ellner JJ, Eisenach KD. Quantitative bacillary response to treatment in *M.tuberculosis* infected and *M. africanum* infected adults with pulmonary tuberculosis. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2001; 5(6): 579-582.

92. Kahla B, Boschiroli ML, Souissi F, Cherif N, Benzarti M, Boukadida J, Hammami S. Isolation and molecular characterisation of *Mycobacterium bovis* from raw milk in Tunisia. African Health Sci. 2011; 11(1 ; 1-5.

93. Karabulut NA. *Mycobacterıum tuberculosis* kompleks suşlarının primer ilaçlara duyarlılığının MGIT, E-TEST ve agar proporsiyon yöntemleri ile araştırılması,İstanbul Şişli Etfal Eğitim ve AraştırmaHastanesi, Uzmanlık Tezi, 2008.

94. Karahan ZC, Tekeli A, Atalay F, Akar N. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile genotiplendirilmesi. Ankara Üniv. Tıp Fakültesi Mecm. 2006; 59 : 139-143.

95. Karlıkaya C. Tüberküloz Ders Notları. Erişim tarihi:13.10.2012 http://celalkarlikaya.trakya.edu.tr/TBdernot.htm.

96. Kasai H, Ezaki T, Harayama S. Differentiaition of phylogenticallay related slowly growing mycobacteria by their *gyr*B sequences. J. Clin. Microbiol. 2000; 38(1); 301-308.

97. Kasımoğlu Ö.Tüberküloz Mikrobiyolojisi. Klimik Dergisi. 1989; 2(1): 3-5.

98. Kazwala RR, Daborn CJ, Sharp M, Kambarage DM, Jiwa SFH, Mbembati NA. Isolation of *Mycobacterium bovis* from human cases of cervical adenitis in Tanzania: A cause for concern? Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2001; 5(1): 87-91.

99. Keane K, Remold HG, Kornfeld H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. J. Immunol. 2000;164:2016-2020.

100. Keskin O. Sığır Tüberkülozis'inin teşhisinde ELISA'nın kullanılması ve alerjik yöntemlerle karşılaştırılması. Ankara Üniversitesi. 1996. Doktora Tezi.

101. Khosravi AD, Hashem A. Application of restriction enzyme analysis technique based on 65kda heat shock protein gene for fingerprinting and differentiation of *Mycobacterıum tuberculosis*

clinical strains isolated from tuberculosis patients ın Ahwaz, Iran. Pak. J. Med. Sci. 2007; 23 (2); 216-219.

102. Kılıçarslan Z. Dünyada ve Türkiye'de Tüberküloz. Ankem Derg .21(Ek 2).2007;76-80.

103. Kiehn TE, Hoefer H, Bottger CE, Ross R, Wong,M, Edvards F, Antinoff N, Armstrong D. *Mycobacterium genavense* Infections in Pet Animals. J. Clin Micro. 1996: 1840-1842.

104. Kobayashi K, Kaneda K, Kasama T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. Microsc Res Techniq. 2001; 53: 241-245.

105. Koneman EW and Winn WC. Mycobacteria. Konemans Colar Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Sixt Edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2006;1066-1124.

106. Köksal F and Yaman A. Farklı Bir Bakteri Topluluğu Mikobakterilerde Hücre Duvarı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, 34-47, 2003, Samsun.

107. Köksalan OK. 2010. Günümüzde tüberküloz tanısı/güçlükleri. Ankem Derg., 24 (2): 61-6.

108. Kul O, Tunca,R. Hazıroglu R, Diker S, Karahan S. An outbreak of avian tuberculosis in peafowl (*Pavo cristatus*) and pheasants (*Phasianus colchicus*) in a zoological aviary in Turkey. Vet. Med. Czech. 2005; 50 (10) : 446–450.

109. Kunduracıoğlu A, Karasu I, Bicmen C, Özsoz A, Erbaycu AE. Yayma negatif tüberküloz olgularının tanısında MTD Gen-Probe® testi, BACTEC 960™ sistemi ve Löwenstein-Jensen kültür yöntemlerinin performansının karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul. 2013; 47 (3) : 417-431.

110. Kunze ZM ,Wall S, Appelberg R, Silva MT, Portaels F, McFadden JJ. IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity *Mycobacterium avium*. Mol. Microbiol. 1991; 5: 2265-2272.

111. Kunze ZM, Portaels F, McFadden JJ. Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS*901*. J. Clin. Microbiol. 1992; 30: 2366-2372.

112. Kuria JN ve Gathogo SM. Concomitant fungal and *Mycobacterium bovis* infections in beef cattle in Kenya, J Vet Res., 2013; 80 (1) : 1-4.

113. Lantos A, Nieman S, Mezosi L, Sos E, Erdelyi K, David S, Parsons LM, Kubica T, Rüsch-Gerdes S, Somoskövi A. Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in captive Siberian Tiger. Emerg Infect Dis. 2003; 9: 1462-1464.

114. Li JY, Lo ST, Ng CS. Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* in tissues showing granulomatous inflammation without demonstrable acid-fast bacilli, Diagn Mol Pathol. 2000; 9 (2): 67-74.

115. Liebana E, Aranaz A, Mateos A, Vilafranca M, Gomez-Mampaso E, Tercero JC, Alemany J, Suarez G, Domingo M, Dominguez L. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 33-36.

116. Manabe Y ve Bishai W. Latent Mycobacterium tuberculosispersistence, patience and winning by waiting. Nature Med, 2000; 6:1327-1329.

117. Manzano JR, Blanquer R, Calpe JL, Caminero JA, Cayla J, Dominguez JA, Garcia JM, Vidalh R. Diagnosis and treatment of tuberculosis. Arch Bronconeumol. 2008; 44(10) : 551-566.

118. Matos F, Amado A, Botelho A. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolated in the first outbreak of bovine tuberculosis in the Azores Islands: a case report. Veterinarni Medicina, 2010; 55(3): 133-136.

119. Mijs W, Haas P, Rossau R, Laan TDL, Rigouts L, Portaels F, Soolingen DV. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and *M. avium* subsp. *hominissuis* for the human/porcine type of *M. avium*. Int J Syst Evol Micr. 2002; 52:1505-1518.

120. Michalak K, Austin C, Diesel S, Bacon JM, Zimmerman P, Maslows JN. Mycobacterium tuberculosis infection as a zoonotic disease: Transmission between humans and elephants. Emerg Infect Dis. 1998; 4(2): 283-287.

121. MIRU-VNTRplus. Erişim tarihi : 07.01.2014. www.miru-vntrplus.org

122. Nasr SE, Saad NM, EA Nasr, Wahba NM, Elsherif WM. Detection of bovine tuberculosis in milk and serum of tuberculin reactors dairy farm animals in Assiut City, Egypt. Basic Research Journal of Animal Science. 2013; 1(1): 1-6

123. Nawaz A, Chaudhry ZI, Shahid M, Gul S, Khan FA, Hussain M. Detection of *Mycobacterium tuberculosıs* and *Mycobacterium bovis* in sputum and blood samples of human. J Anim Plant Sci. 2012; 22(2): 117-120.

124. Neill SD, Bryson DG, Pollock JM. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. Tuberculosis. 2001: 81(1/2); 79-86.

125. Niemann S, Richter E, Rüsch-Gerdes S. Differentiation among Members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: Evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis.* J. Clin Micro. 2000: 152-157.

126. Niemann S, Harmsen D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis, J. Clin Micro, 2000. 38 (9): 3231-3234.

127. Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2002; 52:433-436.

128. Niemann S, Diel R,Khechinashvili G, Gegia M, Mdivani N, Tang YW. *Mycobacterium tuberculosis* Bejing linage favors the spread of multidrug resistant tuberculosis in the Republic of Georgia. J.Clin.Microbiol. 2010; 48 (10): 3544-50

129. Nigou J, Gilleron M, Puzo G. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. Biochimie 85. 2003; 153-166.

130. Nikolayevskyy V, Gopaul K, Balabanova Y, Brown T, Fedorin I, Drobniewski F. Differentiation of tuberculosis strains in a population with mainly Beijing-family strains. Emerg Inf Dis. 2006; 12(9):1406-1413.

131. Oğuz D. 5-24 Ay Arası Sağlıklı Çocuklarda BCG Aşısının Tüberkülin Deri Testine Etkisinin Araştırılması. T.C.Sağlık Bakanlığı İstanbul Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Hast. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği. 2004;1-52.

132. OIE. OIE Terrestial Manual. 2008. Avian Tuberculosis, Erişim tarihi:07.04.2013. http://www.oie.int/eng/normes/ mmanual/2008/pdf/2.03.06 AVIAN TB.pdf.

133. OIE. OIE Terrestial Manual 2009. Bovine Tuberculosis, Erişim tarihi : 07.04.2013 http://www.oie.int/ eng/normes/mmanual/ 2008/pdf/2.04.07 bovine tb.pdf.

134. OIE. Animal Health İnformation. World Animal Health Information Database. 2012 http://www.oie.int/wahis/public.php

135. Okaiyeto SO, Allam L, Akam E, Sabo G. Investigation of the prevalance of bovine tuberculosis i

in a dairy farm in Kaduna Stage Nigeria. Research Journal of Dairy Sciences. 2010; 2 (1): 27-29.

136. O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. Tuber Lung Dis. 1995; 76(1): 1-46.

137. Özbal Y. Tüberküloz İmmünolojisi. Erciyes Tıp Dergisi. 2006 ; 28(1): 25-34.

138. Özbey G, Kalender H, Muz A. F.Ü. Sığır tüberkülozu'nun epidemiyolojisi ve teşhisi. Sağ. Bil. Derg. 2008; 22(5): 307-314.

139. Özbey N, Akçalı A, Tatman-Otkun M. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi sağlık uygulama ve araştırma merkezi 2009-2011 yılı tüberküloz laboratuvar verilerinin değerlendirilmesi. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi. 2012; 69(3): 149-154

140. Özkara Ş, Aktaş Z, Ecevit H. Türkiye'de tüberklülozun kontrolü için başvuru kitabı. Ankara: Rekmay Ltd. Şti. 2003:7-9.

141. Özkınay F, Özkınay C. BCG vaccine, PPD and new tuberculosis vaccines. Journal of Pediatric Infection. 2008;2(Özel Sayı):1-6.

142. Özşahin SL. Tüberküloz bakteriyolojisi. T.Klin.Tıp Bilimleri.1994;14:404-408.

143. Öztürk R. Tüberkülozda doğal direnç ve risk faktörleri, 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. s58-73, 2003, Samsun.

144. Palaci M, Ueki SY, Sato DN, Teles MAS, Curcio M, Silva EAM. Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) for recovery and drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis isolates from respiratory specimens. Journal of Clinical Microbiology. 1996; 34:762-764.

145. Palmer MV ve Waters WR. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. Veterinary Microbiology. 2006; 112 : 181–190.

146. Pardo RB, Langoni H, Mendonça LJP, Chi KD. Isolation Of *Mycobacterium* spp. in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. São Paulo, 2001 ; 38: 284-287.

147. Park DY, Kim JY, Choi KU, Lee JS, Lee CH, Sol MY, Suh KS. Comparison of polymerase chain reaction with histopathologic features for diagnosis of tuberculosis in formalin-fixed, paraffin-embedded histologic specimens. Arch Pathol Lab Med. 2003; 127: 326-330.

148. Pavlik I, Svastova P, Bartl J, Dvorska J and Rychlık I. Relationship between ıs*901* in the M*ycobacterium avium* complex strains ısolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry. Clınıcal And Dıagnostıc Laboratory Immunology, 2000, 7: 212–217.

149. Peterson R. Molecular Epidemiology of Tuberculosis.Karolinska Institutet. Doktora Tezi. Stockholm. Sweden. 2009.

150. Pfyffer GE, Auckenthaler R, van Embden JDA , van Soolingen D. Mycobacterium canettii, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. Emerg Infect Dis. 1998; 4(4):631-634.

151. Picardeau M and Vincent VR. Typing of *Mycobacterium avium* isolates by PCR. J. Clin Micro. 1996; 389-392.

152. Piessens WF and Nardell EA. Pathogenesis of tuberculosis. In: Reischmann LB, Hershfield ES ed. Tuberculosis, A Comprehensive International Approach, Second Edition, Newyork, Marcel Dakker. 2000 ; 241-255.

153. Pollock JM ve Andersen P. Predominant recognation of the ESAT-6 protein in the first phase of infection with *M.bovis* in cattle. Infection and Immunity. 1997; 65: 2587-2592.

154. Pollock JM, Rodgers JD, Welsh MD, McNair J. Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection. Veterinary Microbiology. 2006; 112: 141-150.

155. Prodinger WM, Eigentler A, Allerberger F, Schönbauer M, Glawischnig W. 2002. Infection of red deer, cattle and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in Western Austria. Journal Of Ciınical Microbiology, 40(6): 2270–2272.

156. Proano-Perz F, Rigouts L, Brandt J, Dorny P, Ron J, Maria-Agusta C, Rodriguez R, Fissette K, Aerde AV, Portaels F, Benitez-Ortiz W. Preliminary observations on *Mycobacterium ssp*. in dairy cattle in Ecuador. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2006. 75(2): 318-323.

157. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. Mycobacterium species. Clinical Veterinary Microbiology. London.Mosby. 1994;159-169.

158. Raqib R, Rahman J, Kamaluddin AKM, Kamal SMM, Banu FA, Ahmed S. Rapid diagnosis of active tuberculosis by detecting antibodies from lymphocyte secretions. The Journal of Infectious Diseases. 2003; 188: 364-370.

159. Resmi Gazete. 27188 sayılı "Sığır Bovine Tüberkülozu Yönetmeliği". 02.04.2009

160. Rishi S, Sinha P, Malhotra B and Pal N. A compertive study for the detection of Mycobacteria by Bactec MGIT 960, Lowenstein Jensen Media and Direct AFB examination, Ind J Med Microbiol, 2007; 25(4): 383-386.

161. Romero B, Aranaz A, Sandoval A, Alvarez J, de Juan L, Bezos J, Sanchez C, Galka M. Fernandez P, Mateos A, Dominguez L. Persistence and molecular evolution of *Mycobacterium bovis* population from cattle and wildlife in Donana National Park revealed by genotype variation. Vet Microbiol. 2008; 132: 87-95.

162. Roring S, Scott AN, Brittain D, Walker I, Hewinson G, Neill S, Skuce R. Development of Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium bovis*: Comparison of results with those obtained by using existing Exact Tandem Repeats and spoligotyping. J Clin. Microbiol. 2002; 40(6): 2126-2133.

163. Roring S, Scott AN, Hewinson RG, Neill SD, Skuce RA. Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in molecular typing of Mycobacterium bovis isolates from Ireland. Vet Microbiol. 2004; 101:65-73.

164. Saniç A. Tüberküloz tanısında moleküler yöntemlerin yeri. Ankem Derg. 2007; 21(2): 81-85.

165. Sarıgüzel N. Direkt Mikroskopi Teknikleri ve Değerlendirilmesi. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. s291-299, 2003, Samsun.

166. Sayın Z. Sığırlarda tüberkülozun farklı metotlar ile karşılaştırmalı teşhisi. S.Ü.Sağlık Bilimleri. Doktora Tezi. Konya. 2010.

167. Sayın Z, Erganiş O. Identification of Mycobacterium strains by PCR and PCR-REA. Bull Vet Inst Pulawy. 2011; 55: 641-644.

168. Schluger NW. The Pathogenesis of tuberculosis**.** American Journal of Respiratory and Cell and Molecular Biology. 2005:32;251-256

169. Singh A ve Kashyap VK. Specific and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by polymerase chain reaction. Hindawi Publishing Corporation Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. 2012:1-5.

170. Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, Roring SM, Scott AN, Brittain D, Hughes S, R. Hewinson G, Neill S. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. Microbiology. 2002; 148: 519-528.

171. Smit T, Eger A, Haagsma J, Bakhuizen T. Avian tuberculosis in wild birds in the Netherlands. Journal of Wildlife Diseases. 1987; 23 (3): 485-487.

172. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clinical Microbiology Reviews. 2003; 16(3): 463-496

173. Smittipat N**.** Three-year population-based evaluation of standardized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number of Tandem Repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2005;43:5034-5043.

174. Solmaz H, Z İlhan, Aksakal A, Gülhan T, Ekin İH, Boynukara B. Van bölgesinde sığır tüberkülozunun polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile saptanması, VII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi. s146-147, 2006, Antalya.

175. Somoskovi A, Kodman C, Lantes A, Barfai Z, Tamasi L, Füzy J, Magyar P. Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* using the automated BACTEC/MGIT-960 system, the BACTEC460TB system and Lowenstein-Jensen medium. Jornal of Clinical Microbiology. 2000; 38: 2395-2397.

176. Soysal A. Tüberküloz immunolojisi ve tüberküloz enfeksiyonu tanısında yeri? Ulusal İmmünoloji Kongresi : s28-30, 19-22 Kasım 2009, Girne, Kıbrıs.

177. Srivastava K, Chauhan DS, Gupta P, Singh HB, Sharma VD, Yadav VS, Sreekumaran, Thakral SS, Dharamdheeran JS, Nigam P, Prasad HK, Katoch VM. Isolation of *Mycobacterium bovis* & *M. tuberculosis* from cattle of some farms in north India - Possible relevance in human health. Ind J Med Res. 2008; 128: 26-31.

178. Sunder S, Lanotte P, Godreuil S, Martin C, Boschiroli ML. ve Besnier JM. Human-to-human transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in immunocompetent patients. Journal of Clinical Microbiology. 2009 ; 1249-1251.

179. Supply P, Allix C, Lesjean S, Oelemann MC, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, Haas P, Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, Soolingen D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial ınterspersed repetitive unit–variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis.* J Clin Microbiol. 2006;12:4498-4510.

180. Szewzyk R, Svenson S, Hoffner S, Bölske G, Wahlström H, Englund L, Engvall A, Kallenius G. Molecular epidemiological studies of *Mycobacterium bovis* ınfections in humans and animals in Sweden. Journal of Clinical Microbiology. 1995; 33(12) : 3183-3185.

181. Tahaoğlu K. Tüberküloz.Türk Toraks Derneği Okulu. 2007; 47-57.

182. Talbot EA, Williams DL ve Frothingam R. PCR Identification of *Mycobacterium bovis* BCG. Journal of Clinical Microbiology.1997; 566-569.

183. Tantaş A, Ak S, Yılmaz H. Bir tavukçuluk yetiştirmesinde görülen kanatlı tüberküloz olgusu, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 1990; 16(2): 61-66.

184. Taşbakan MS ve Sayıner A. Tüberküloz hastalığı ve infeksiyonunda interferon gamma testlerinin yeri. İnfeksiyon Dergisi *(Turkish Journal of Infection)*. 2008; 22 (3): 179-184.

185. T. C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı Tüberküloz hastalarının tanı-tedavi ve izlenmesi. Ankara. 1998; 13-15.

186. T. C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı. Türkiye'de Tüberkülozun kontrolü İçin başvuru kitabı. Ankara, 2003; 7-9.

187. Tell LA, Woods L, Cromie RL. Mycobacteriosis in birds. Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz. 2001; 20 (1): 180-203.

188. Terim Kapakin KA. Sağlam YS, Altun S. Bir aile işletmesinde yetiştirilen tavuklarda saptanan tüberküloz olguları üzerine patolojik incelemeler. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg. 2010; 5 (3): 141–146.

189. Thoen CO. Tuberculosis. Disease of Poultry. 10th Edition.Iowa USA. 1998;167-178.

190. Thoen CO, Steele CH, Gilsdorf MJ. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans, Second Edition. Blackwell Publishing.Iowa. 2006; 21-22.

191. Turenne CY, Collins DM, Alexander DC, Behr MA. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M.avium subsp. avium* are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of *M. avium* organisms. Journal of Bacteriology. 2008: 2479–2487.

192. Türk Tabipleri Birliği. Tüberküloz raporu. Türk Tabipleri Birliği Yayınları. Ankara. 2012; 7-12.

193. Uçar N, Saka D, Coşkun Ö, Sarı A. Akciğerin savunma mekanizmaları. Solunum Hastalıkları. 2002; (13): 153-160.

194. Ursavaş A, Karadağ M, Sağlam DA, Yavuz Z, Yıldız F, Rodoplu E, Ege E, Özyardımcı N. Tüberküloz tanısında tüberkülin deri testinin güvenilirliği ve bazı parametreler ile ilişkisi. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2004;30 (1): 11-15.

195. van Crevel RV, Ottenhoff THM, van der Meer JVM. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis.* Clinical Microbiology Reviews. 2002: 294-309.

196. van Soolingen D, Hoogenboezem T, Haas PEW, Hermans PW M, Koedam MA, Teppema KS, Brennan PJ, Besra GS, Portaels F, Top J, Schouls LM, van Embden JDA. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Canetti:* Characterization of an exceptional isolate from Africa. International Journal of Systematic Bacteriology. 1997: 1236-1245.

197. Vordermeier HM. T-cell recognition of mycbacterial antigens. Eur Respir J. 1995; 20: 657-667.

198. Vordermeier HM, Chambers MA, Cockle PJ, Whelan AO, Simmons J, Hewinson RG. Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. Infection and Immunity. 2002; 70(6): 3026-3032.

199. Wei CY, Hsu YH, Chou WJ, Lee CP, Tsao WL. 2004. Molecular and histopathologic evidence for systemic infection by *Mycobacterium bovis* in a patient with tuberculous enteritis, peritonitis, and meningitis: a case report. Kaohsiung J Med Sci. 20(6): 302-307.

200. WHO. Global tuberculosis control, epidemilogy, strategy, financing. WHO Report 2009. Erişim tarihi:15.05.2012.http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/en/index.html.

201. WHO 2013. Global tuberculosis report. Erişim tarihi: 15.02.2014 http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf.

202. Witmer G, DeLibertov T, VerCauteren K, Butchko P. Mycobacterial disease in wildlife. Wildlife Damage Management, Internet Center for USDA National Wildlife Research Center –Staff Publications. 2003: 309-315.

203. Yaman M. Tüberküloz patogenezi. erişkin ve çocukta tüberküloz sempozyumu. s15-20. 30 Nisan 1999. İstanbul.

204. Yaramış A. BCG aşılamasının değeri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. s199-203, 2003, Samsun.

205. Yardımcı H. Mycobacterium enfeksiyonları. In: Aydın N ve Paracıkoğlu J, Edit. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). 1. Baskı. Ankara. İlke-Emek Matbacılık ve Yayıncılık. 2006; 87-107.

206. Yardımcı H, Ünal CB, (Kökçü) Ataseven L, Sareyyüpoğlu B. Sığır tüberkülozunun PCR ile tanısı ve *Mycobacterium bovis*'in spoligotiplendirme yöntemi ile genotiplendirilmesi. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2007; 54: 183-189.

207. Yavuz O, Özdemir Ö, Sayın Z, Hatipoğlu F, Hadimli HH. Yumurtacı tavuklarda avian tüberkülozisin patolojik, mikrobiyolojik ve PZR yöntemleriyle teşhisi. VI Ulusal Patoloji Kongresi: s18, 2012, Aydın.

208. Yüksel P. Pirazinamide dirençli *Mycobacterium tuberculosis* kompleks kökenlerinde *pnca* genindeki mutasyonların araştırılması. Trakya Üniversitesi, Doktora Tezi, 2005.

209. Zeytinli OÜ. Çukurova bölgesinde akciğer tüberkülozlu hastalardan izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının spoligotyping ve MIRU-VNTR (mycobacterial interspersed repetitive unitvariable number of tandem repeat) yöntemiyle tiplendirilmesi. Çukurova Üniversitesi. Uzmanlık Tezi, Adana, 2010.

210. Zink AR, Sola C, Reischl U, Grabner W, Rastogi N, Wolf H ve Nerlich A.G. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. J. Clin. Micro. 2003 : 359-367.

211. Zink AR ve Nerlich AG. Molecular strain identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in archival tissue samples. J Clin Pathol. 2004; 57:1185-1192.

9. EKLER

EK-A : Etik kurul kararı

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ
ETİK KURUL (SÜVFEK) KARARLARI

Toplantı Tarihi	08.07.2009	Toplantı Sayısı	2009/13	Karar Sayısı	2009/057

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet ATEŞ tarafından sunulan "**Sığır, Kanatlı ve İnsanlardan İzole Edilen Mikobakterilerin Moleküler Tekniklerle Tiplendirilmesi**" isimli tez projesi değerlendirilmiştir.

Projede Konya ve çevresindeki mezbahalarda kesime tabi tutulan 100 sığır ve 35 kanatlının tüberküloz şüpheli olan materyallerinden (akciğer, lenf yumruları) alınan örneklerin ve Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezinden temin edilecek olan insanlardan izole edilmiş 30 adet suşun kullanılacağı belirtilerek, bunların tiplendirilmesi, orijinlerinin belirlenmesi ve zoonotik yaklaşımın ortaya konulmasının amaçlandığı bildirilmektedir.

Başvuruda, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin araştırma etiği açısından "**Uygun olduğuna**" oy birliği ile karar verilmiştir.

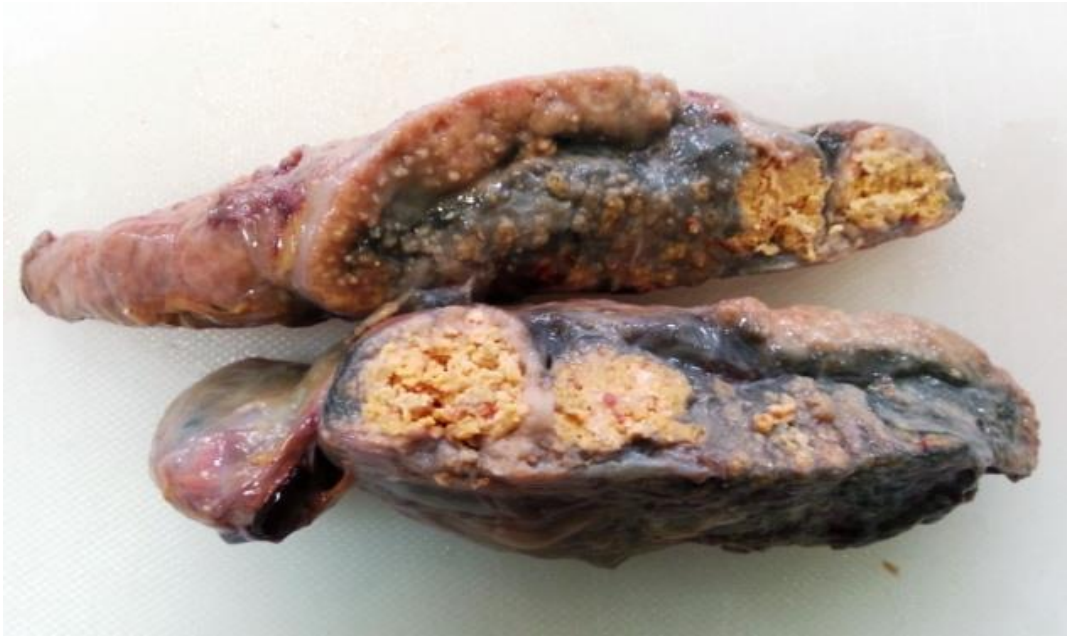
Prof. Dr. Mehmet MADEN Başkan	Prof. Dr. Enver YAZAR Başkan Yardımcısı
Prof. Dr. Sadettin TIPIRDAMAZ Üye	TOPLANTIYA KATILMADI Gürkan HIZLI Konya Doğayı ve Hayvanları Koruma Derneği Üyesi

Prof. Dr. Fatma İNAL Raportör Üye	Prof. Dr. Vahdettin ALTUNOK Üye	TOPLANTIYA KATILMADI Hüseyin AYDIN Sivil Üye

EK-B : Resimler



Resim. 9. 1. Akciğer dokusunun kesit yüzünde tüberkeller



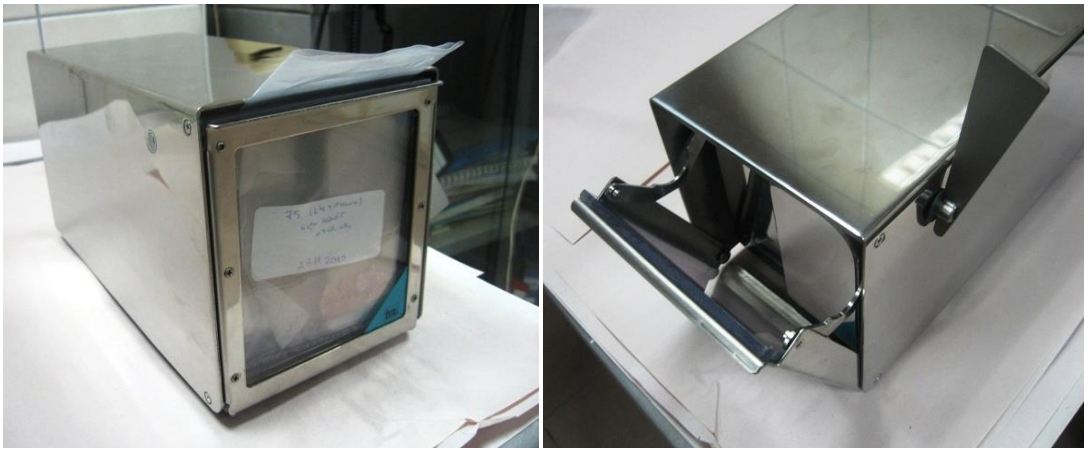
Resim. 9. 2. Mediastinal lenf yumrusunun kesit yüzünde tüberkeller



Resim 9. 3. ve 9. 4. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Biyogüvenlik-3 düzeyndeki Tüberküloz Laboratuvarı.



Resim 9. 5. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Tüberküloz Laboratuvarı suş bankası.



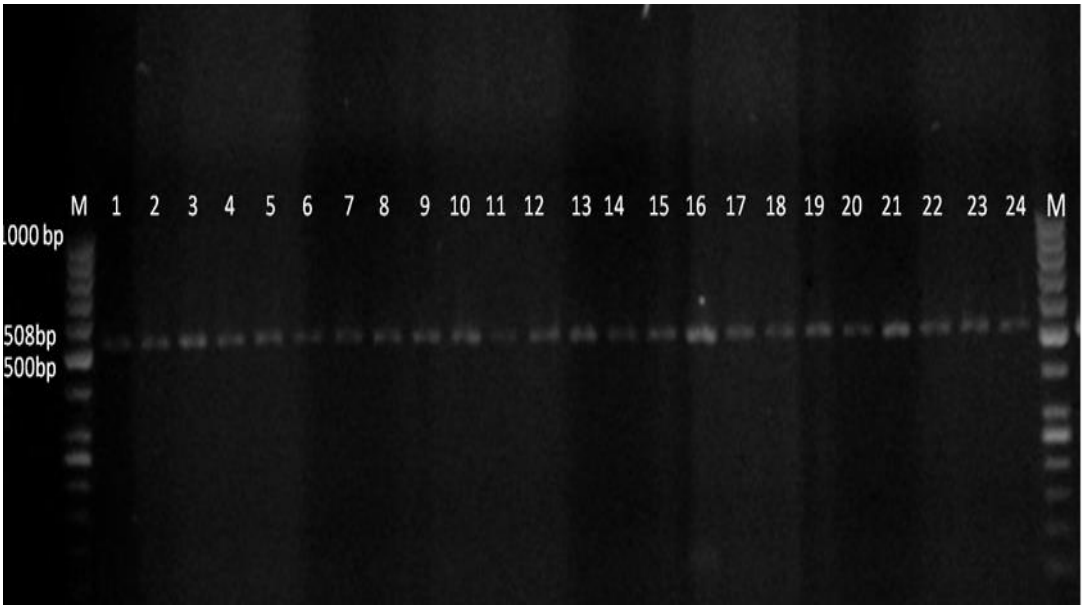
Resim 9. 6. Tüberküloz şüpheli örneklerin parçalanmasında kullanılan stomacher (IUL Instruments, Spain).



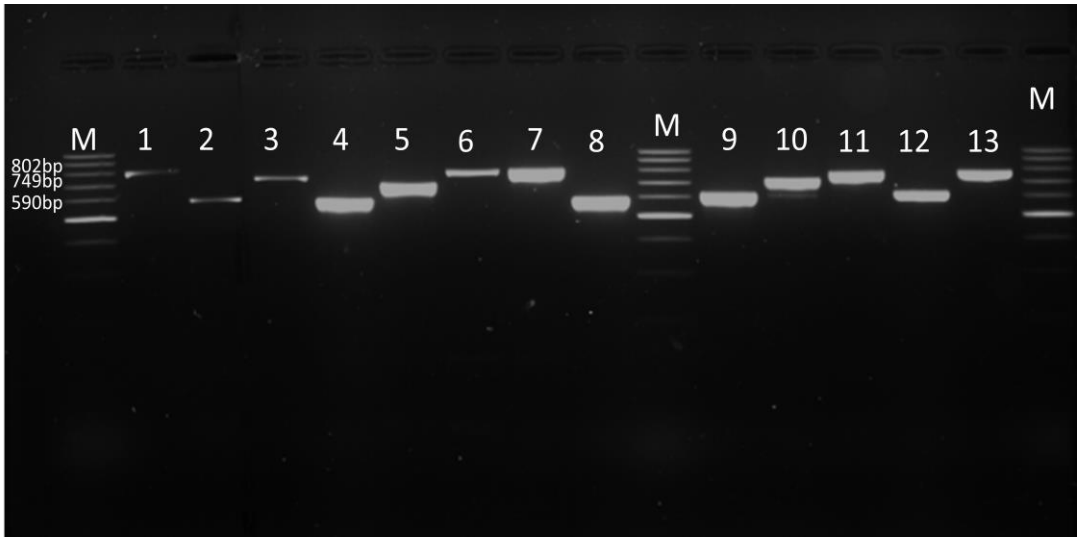
Resim 9. 7. Lowenstein-Jensen besiyerinde mikobakterium şüpheli koloniler.



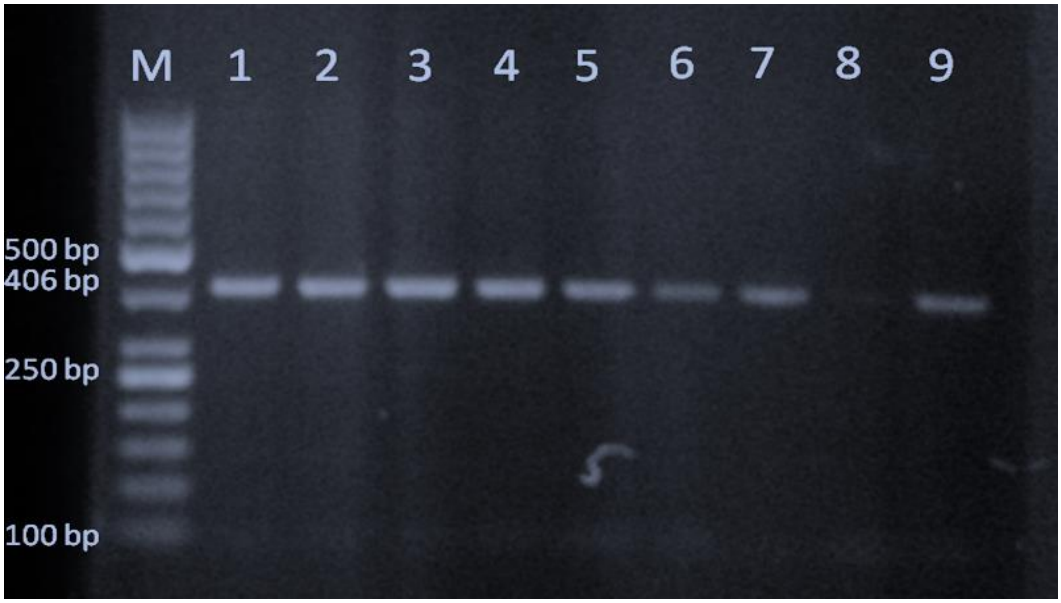
Resim 9. 8. PCR gel elektroferez.



Resim 9. 9. MIRU-VNTR jel görüntüsü (MIRU-2).



Resim 9. 10. MIRU-VNTR jel görüntüsü (MIRU-10).



Resim 9. 11. MIRU-VNTR jel görüntüsü (MIRU-4).

10. ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Konya'da doğdu. İlk, orta öğrenimini Konya'da tamamladı. 1994 yılında Konya Veteriner Sağlık Meslek Lisesi'nden mezun oldu. Aynı yıl S.Ü. Veteriner Fakültesi'ni kazandı. Üniversite öğrenimine devam ederken 1995 yılında Veteriner Sağlık teknisyeni olarak memuriyete başladı. 1999 yılında S.Ü. Veteriner Fakültesi'nden mezun oldu. 2000 yılında ise Konya Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne atandı. 2014 yılında doktora eğitimini tamamladı. Halen aynı kurumda Bakteriyoloji Laboratuvarında Şef olarak görev yapmakta olup, evli ve 1 çocuk babasıdır.