

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

MYCOBACTERIUM BOVIS
İZOLATLARININ MIRU- VNTR VE
SPOLİGOTYPİNG İLE SURVEYANSI

Veteriner Hekim Nevin TUZCU

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL

ADANA 2013

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

MYCOBACTERIUM BOVIS
İZOLATLARININ MIRU- VNTR VE
SPOLİGOTYPİNG İLE SÜRVEYANSI

Veteriner Hekim Nevin TUZCU

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL

**Bu çalışma TF2011 D1 nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi Araştırma
Projeleri tarafından desteklenmiştir.**

ADANA 2013

KABUL VE ONAY

Tıbbi Mikrobiyoloji Doktora Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan
“Mycobacterium Bovis İzolatlarının MIRU-VNTR ve Spoligotyping ile surveyansı”
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 10/04/2013

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Fatih Koksai
Çukurova Üniversitesi
Başkan

Prof. Dr. Akgün Yaman
Çukurova Üniversitesi
Raportör

Prof. Dr. Fügen Yarkın
Çukurova Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Gönöl Aslan
Mersin Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. İsmail Hanta
Çukurova Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun 11 / 04 / 2013 tarih ve 9/8-7 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Şeref ERDOĞAN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilimsel desteklerini esirgemeyen, ahlaki ve insani değerlerini örnek aldığım, samimiyetine inandığım kıymetli danışman hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Fatih Köksal'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca değerli hocalarım Prof. Dr. Akgün Yaman, Prof. Dr. Fügen Yarkın ve Prof. Dr. M. Macit İlkit'e de eğitimime verdikleri katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam sırasında suş temin etmemde desteğini gördüğüm Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gönül Aslan hocama sonsuz teşekkürler. Yrd. Doç. Dr. Begüm KAYAR, Dr. Taylan BOZOK, Doktora öğrencisi Mahdi Marzi, Yüksek Lisans öğrencisi Gülfer YAKICI ve tüm tüberküloz çalışma grubuna, bölüm sekreterimiz Suna GÖKMEN başta olmak üzere bütün çalışma arkadaşlarıma destekleri için ayrıca teşekkür ederim. Şu an görev yaptığım Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi ve Deney Hayvanları Laboratuvarında bulunan çalışma arkadaşlarıma ve hocalarıma verdikleri manevi destekten dolayı çok teşekkür ederim.

Son olarak dostum, meslektaşım ve hayattaki en büyük desteğim sevgili eşim Mehmet TUZCU ve canım kızlarım Aybüke ve Ceren TUZCU'ya eğitimim boyunca gösterdikleri sabır, anlayış ve yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim. İyi ki varsınız, iyi ki de benim hayatımdasınız...

Vet.Hek.Nevin TUZCU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
KISALTMA LİSTESİ	IX
ÖZET	XI
ABSTRACT	XII
1-GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Mikobakterilerin Evrimsel Gelişimi ve <i>M. bovis</i>	5
2.3. Sınıflandırma	8
2.3.1. <i>M. tuberculosis</i> Kompleks (MTK)	10
2.3.1.1. <i>M. tuberculosis</i>	10
2.3.1.2. <i>M. africanum</i>	10
2.3.1.3. <i>M. microti</i>	10
2.3.1.4. <i>M. canettii</i>	11
2.3.1.5. <i>M. pinnipedii</i>	11
2.3.1.6. <i>M. caprae</i>	11
2.3.1.7. <i>M. bovis</i>	11
2.4. Morfoloji	12
2.4.1. Hücre duvarı	12
2.4.2. <i>M. bovis</i> 'in Genomu	13
2.5. Üreme Özellikleri	15
2.6. Antijenik Yapı ve Direnç	16
2.6.1. Mikobakteriyel Proteinler	17
2.6.1.1. Old Tüberkülin (OT)	17
2.6.1.2. Saflaştırılmış Protein Türevi (PPD)	17

2.6.1.3. Isı Şok Proteinleri - HspX (65Kda, 38 Kda, 12 Kda)	17
2.6.1.4. 65 kDa Protein	17
2.6.1.5. 19 kDa Lipoprotein	17
2.6.1.6. ESAT-6 (Early secretory antigenic target) ve CFP-10 (Culture filtrat protein)	17
2.6.2. Mikobakteriyel Lipidler	18
2.6.2.1. Trehaloz-6,6 Dimikolat (Kord Faktör)	18
2.6.2.2. Sülfolipidler (Sülfatidler)	18
2.6.2.3. WaxD	18
2.6.2.4. Lipoarabinomannan	18
2.6.2.5. Fosfatidil İnoзит Mannoзid (PIM)	18
2.6.3. Mikobakteriyel Enzimler	18
2.6.4. Transkrip Regülatörleri	19
2.7. İmmünite	19
2.7. 1. Tüberkülozda Doğal İmmünite	19
2.7.1.1. Üst Solunum Yolunun Fiziksel Engeli	19
2.7.1.2. Fagositoz	20
2.7. 2. Tüberkülozda Kazanılan İmmünite	20
2.7. 2. 1. Gecikmiş Tip Aşırı Duyarlılık Reaksiyonu	21
2.7. 3. Granülom Oluşumu	22
2.8. Patogeneз	22
2.9. Tanı ve Ayırıcı Tanı	23
2.9.1. PPD Tüberkülin Deri Testi	24
2.9.2. Gamma İnterferon (IFN- γ) Testi	24
2.9.3. Bakteriyoskopi ve Kültür	25
2.9.4. Lenfosit Proliferasyon Testi	26
2.9.5. Humoral Bağışıklığın Ölçülmesi	26
2.9.6. Moleküler Metodlar	27
2.9.6.1. IS6110 Restriction Fragment Length Polimorfizm (RFLP)	28
2.9.6.2. Spoligotyping	28
2.9.6.3. MIRU-VNTR (Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number of tandem repeat)	29

2.10. Epidemiyoloji	30
2.11. Tedavi	34
2.11.1. Birinci Seçenek İlaçlar	34
2.11.2. İkinci Seçenek İlaçlar	34
2.12. Korunma	34
3-GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Kültür	36
3.2. DNA Ekstraksiyonu	37
3.2.1. Sıvı besiyerinden DNA Ekstraksiyonu	37
3.2.2. Koloniden DNA Ekstraksiyonu	37
3.3. Spoligotyping	38
3.3.1. PCR	38
3.3.2. Spoligotyping Metodunda Kullanılacak Çözeltiler	39
3.3.2.1. 0.5M EDTA (pH 8,0)	39
3.3.2.2. 20mM EDTA (pH 8,0)	39
3.3.2.3. 20x SSPE (pH 7,4)	39
3.3.2.4. 2xSSPE	39
3.3.2.5. %10 SDS	39
3.3.2.6. 2xSSPE / %0.1SDS	40
3.3.2.7. 2xSSPE / %0.5SDS solüsyonu	40
3.3.2.8. %1 SDS	40
3.3.2.9. 10 × TE	40
3.3.3. PCR Ürününün Hibridizasyonu ve Görünür Hale Getirilmesi	40
3.3.4. Membranın Regenerasyonu	42
3.3.5. Yorumlama	42
3.4. MIRU-VNTR	43
4- BULGULAR	46
5- TARTIŞMA	54
6- SONUÇ VE ÖNERİLER	64
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Tablo no</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1 : Genom Karşılaştırılmalarına Genel Bakış	7
Tablo 2 : Woods ve Washington Sınıflandırması	9
Tablo 3 : 1988-1995 yılları arasında tüberkülin test uygulamaları ve sonuçları	32
Tablo 4: 2000-2011 Yılları Arasında Türkiye’de Sığırlardaki Tüberküloz Sayıları	33
Tablo 5: 12 Lokus MIRU-VNTR Metodu İçin Kullanılan Primerler	44
Tablo 6: MIRU Lokuslarının MIRU-VNTR tekrar sayıları ve ampikon boyutları	45
Tablo 7: 42 <i>M. bovis</i> izolatına ait spoligotyping paternleri	47
Tablo 8: 42 <i>M. bovis</i> suşuna ait Spoligotyping aileleri ve görülme oranları	48
Tablo 9 : 42 <i>M. bovis</i> izolatının 12 lokus MIRU-VNTR profilleri	50
Tablo10: 12 MIRU-VNTR Lokuslarının Tekrar Kopya Sayı ve Oranları	51
Tablo11: 42 <i>M. bovis</i> izolatının 12 lokus MIRU-VNTR kopya sayıları ve ayırım güçleri	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil no</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1: MTK Türleri Arasındaki Filogenetik İlişki	7
Şekil 2: <i>M. bovis</i> AF2122/97 ve <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Suşları Arasındaki Farklılıklar	8
Şekil 3: Mikobakterilerde Hücre Duvarı Yapısı	13
Şekil 4: Spoligotyping Görüntüsü	48
Şekil 5: MIRU4 Jel Görüntüsü	49
Şekil 6: MIRU40 Jel Görüntüsü	49
Şekil 7: Çalışmada Belirlenen Subgruplar	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Avian
ARB	: Asido Resistant Bacil
B	: Bovine
BCG	: Bacille Calmette-Guerin
BSL 3	: Biyogüvenlik Seviyesi 3
bTB	: Bovine Tuberculosis
CDC	: Center's for Disease Control
CDS	: Coding Sequences
CFP	: Culture Filtrat Protein
CFT	: Complement Fixation Test
CRISPR	: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DKKTB	: Düzgün Koloni Oluşturan Tüberküloz Basili
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DR	: Direct Repeat
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
DVR	: Direct Variable Repeat
ELISA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ESAT-6	: Early Secretory Antigenic Target
ETR	: Exact Tandem Repeat
GM-CS F	: <i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
H	: Human
HIV	: Human Immunodeficiency Virüs
HSCM	: Isı İle Konsantre Edilmiş Sentetik Besiyeri
HSZ	: Hayvan Sağlık Zabıtası
IFN-γ	: İnterferon-Gama
IS	: Insertion Sequence
Kb	: Kilo Base
LAM	: Lipoarabinomannan

MHC	: Major Histocompatibility Complex
MIRU-VNTR	: Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number Of Tandem Repeat
MOTT	: Mycobacterium Other Than Tuberculosis
MTK	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Kompleks
NK	: Naturel Killer
PAS	: Para-amino Salisilik Asit
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PE	: Prolin Glutamat
PE-PGRS	: Polymorphic Guanine-Cytosine Rich Sequence
PPD	: Pürified Protein Derivative
PPE	: Prolin-Prolin Glutamat
R Koloni	: Rough Colony
RD	: Region Of Different
RFLP	: Restriction Fragment Length Polimorfizm
S Koloni	: Smoot Colony
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
T₂H	: Tiyofen-2-Karboksilik Asit Hidrazid
TE	: Tris Edta
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör

ÖZET

MYCOBACTERIUM BOVIS İZOLATLARININ MIRU- VNTR VE SPOLİGOTYPİNG İLE SÜRVEYANSI

İnsan ve hayvan tüberküloz olgularından izole edilen *M. bovis* suşlarının epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesi, kaynağı hayvan ve hayvan ürünleri olan bir grup tüberküloz olgusunun kontrolü ve etkin kontrol tedbirleri ile en aza indirilmesini sağlayacaktır. Bu çalışmada Çukurova bölgesinde pulmoner tüberküloz ön tanılı hastaların balgam örnekleri ile Adana mezbahasında et üretimi amacı ile kesilen hayvanların akciğer ve lenf nodlarının makroskopik incelemelerinde tüberküloz şüphesi yaratacak lezyona sahip olan dokulardan izole edilen *M. bovis* suşlarının muhtemel bir bulaşa delil teşkil etmek üzere klonal düzeyde irdelenmeleri ve bu amaçla kullanılan yöntemlerin tek başlarına veya birlikte kullanılmaları halindeki ayırım güçlerinin tespiti amaçlandı. Çalışmaya Mart 2011-Haziran 2012 tarihleri arasında izole ve identifiye edilen hayvan kökenli 32 ile insan kökenli 10 *M. bovis* izolatu dahil edildi. Klonal ilişkinin belirlenmesinde 12 lokus MIRU-VNTR yöntemi ile spoligotyping yöntemi kullanıldı. Test izolatlarının tamamının spoligotipleme ile 6, MIRU-VNTR ile 10 farklı patern gösterdikleri, her iki yöntemin birlikte kullanılması halinde ise patern sayısının 28'e çıktığı, MIRU lokusları içerisinde MRU4, MIRU26, MIRU31 ve MIRU40'ın ayırım gücü en yüksek lokuslar olduğu, spoligotiplemede de izolatların % 42.85 oranı ile SB0120 paterninde yoğunlaştıkları, aynı yöntemle 7 izolatın *M. bovis ssp caprae* paterni, 2 insan izolatının da *M. bovis* BCG paterni sergiledikleri, 5 insan izolatının spoligotyping ve MIRU-VNTR kalıplarının sığır kökenli izolatlar ile % 100 uyumlu olduğu yani ortak kökenden enfekte edildikleri görüldü. Bu çalışmada *M. bovis* izolatlarının epidemiyolojik analizinde spoligotyping ve MIRU-VNTR yöntemlerinin birlikte kullanılması halinde ayırım güçlerinin her iki yöntemin tek başına kullanılmasına oranla daha yüksek olduğu, bölgemizde bir kaynaktan köken alan suşların hem insanları hem de hayvanları enfekte ettiği bu sebeple de *M. bovis* moleküler epidemiyolojisine yönelik çalışmaların sürdürülerek elde edilen sonuçların Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ile paylaşılmasının uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *M. bovis*, MIRU-VNTR, Spoligotyping

ABSTRACT

THE SURVEILLANCE OF *MYCOBACTERIUM BOVIS* ISOLATES WITH MIRU- VNTR AND SPOLIGOTYPING

To determine the epidemiological characteristics of *M. bovis* strains, isolated from human and animal tuberculosis cases, will be minimized by controlling a group of tuberculosis cases which is the source of animals and animal products and with effective control measures. In this study, It was aimed the investigation of *M. bovis* strains isolated from sputum samples of patients with pulmonary tuberculosis in Çukurova region and lungs and lymph nodes of slaughtered animals for meat production in Adana slaughterhouse on clonal level and determination of separation forces of methods used for this purpose, either alone or together, to be evidence of a possible transmission. Thirty-two *M. bovis* isolates of animal origin and 10 of human origin, isolated and identified between March 2011-June 2012, were used. 12 locus MIRU-VNTR and spoligotyping method was used for determining the clonal relationship. Six different pattern by spoligotyping and 10 by MIRU-VNTR was determined. When both methods were used together, the number of pattern was found to be 28 and MIRU4, MIRU26, MIRU31, MIRU40 discrimination power was the highest loci. The isolates concentrated in SB0120 pattern in the rate of 42.85 % in spoligotyping. By the same method, it was seen of 7 isolates were *M bovis ssp caprae* pattern and of 2 human isolates were *M. bovis* BCG pattern. Nevertheless, spoligotyping and MIRU-VNTR patterns were compatible with isolates originated from cattle. The use of spoligotyping and MIRU-VNTR methods together was found more sensitive in epidemiological analysis of *M. bovis* isolates when compared to the use of either method alone. It is concluded that strains, sourced from same source in our region, infect both humans and animals. Therefore, continuation of studies on the molecular epidemiology of *M. bovis* and would be appropriate to share with the Ministry of Food Agriculture and Livestock.

Keywords: *M. bovis*, MIRU-VNTR, Spoligotyping

1. GİRİŞ

Mycobacterium (M.) tuberculosis kompleks (MTK) tarafından oluşturulan tüberküloz, farklı klinik görünümlere sahip, kronik seyirli bir enfeksiyondur. MTK içinde bulunan ve tüberküloza neden olan türler, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. caprae* ve *M. pinnipedii*'dir. Yüzden fazla türü olan mikobakterilerin çoğunun insanlarda hastalık oluşturmadığı, ancak bazı atipik mikobakteri türlerinin immun sistemi baskılanmış konaklarda tüberküloz dışı hastalıklar meydana getirdiği de bilinmektedir^{1,2,3}.

Tüberküloz, 1921 yılında kalıcı koruyucu immunité sağlayan bir aşının geliştirilmesi ve 1950'li yılların ortalarından itibaren de anti-tüberküloz ilaçlarla etkili bir şekilde tedavi edilebiliyor olmasına rağmen, günümüzde dünyanın her yerinde önemli bir sağlık problemi olarak hala karşımıza çıkmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) dünya nüfusunun yaklaşık üçte birinin tüberküloz basili ile infekte olduğunu, her yıl yaklaşık 9 milyon yeni tüberküloz vakasının ortaya çıktığını ve yılda 2 milyon kişinin tüberkülozdan öldüğünü bildirmektedir⁴.

Sığır tüberkülozu etkeni *M. bovis*, MTK üyeleri içinde en geniş konak aralığına sahip mikobakteridir ve başta sığırlar olmak üzere diğer hayvanlarda ve insanlarda hastalık oluşturmaktadır. *M. bovis* BCG, *M. bovis*'in 13 yıl boyunca 230 kez pasajlanmasıyla elde edilmiş olup, tüm dünyada genel aşı suşu olarak kullanılmaktadır^{5,6}.

M. bovis'in insanlar için en önemli bulaş kaynağı, pastörize edilmemiş süt tüketimi olmakla birlikte, infekte hayvanlar ile direk temas veya hasta hayvanların çıkarttığı enfeksiyöz aerosollerin inhalasyonu ile de bulaşma gözlenmektedir. İnsandan insana bulaş çok nadir olmakla birlikte, özellikle immun sistemi baskılanmış kişiler arasında bulaşma olduğu da bildirilmektedir^{7,8}.

Dünya Sağlık Örgütü, Güney Amerika'da her yıl *M. bovis*'in neden olduğu 7.000 yeni insan tüberküloz olgusunun bildirildiğini fakat gerçek insidansın bu bildirimden sekiz kat daha yüksek olduğunun tahmin edildiğini belirtmektedir⁴. İnsanlarda *M. bovis* enfeksiyonunun insidansına yönelik doğru bilginin sınırlı olduğu ve

verilerin oldukça tartışmalı olduğu düşünülmektedir. Sığır enfeksiyonunun taşınmasında insanların da *M. bovis*'in rezervuarı olarak davranabileceği belirtilmektedir^{9,10}.

Son yıllarda *M. bovis* gibi zoonotik suşlarla oluşan tüberküloz olgularının ülkemizde dahil olmak üzere bütün dünyada bildirimlerinin artmış olması, hayvan kaynaklı tüberkülozun yayılımının kontrolüne yönelik çabaların ve hayvan kaynaklı suşlarla oluşan tüberkülozun teşhisini sağlayacak yöntemlerin belirlenerek uygulanmasının önemini artırmıştır^{11,12,13}. Tüm dünyada uygulamaya konan ve tüberküloz hastalığını eradike etmeye yönelik programlar hastalardan izole edilen suşların moleküler epidemiyolojik yöntemlerle identifiye edilerek izlenmesinin, major ve minor ajanlara karşı duyarlılığın tespitinden sonra tedavinin başlatılmasının gerekliliğini ortaya koymuştur^{3,4}.

M. bovis'in sebep olduğu enfeksiyonun klinik ve patolojik bulgularının *M. tuberculosis* enfeksiyonuna oldukça benzemesi, tüberkülozlu hastalarda *M. bovis*'in gerçek insidansının bilinmemesine ve bu patojenin sebep olduğu tüberkülozdan korunma ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesinin gözardı edilmesine sebep olarak koruma ve tedavi çalışmalarının başarı oranlarını etkilemiştir^{4,14,15,16}.

Subtropikal iklim kuşağına yakın bir bölgede yer alan Çukurova, tüberküloz için daha yüksek riske sahip düşük sosyo ekonomik ve sosyokültürel düzeye sahip komşu illerden ve ülkelerden yoğun göç almaktadır. Diğer taraftan bölgemizde hayvancılıkla uğraşan insanların gelir seviyelerinin oldukça düşük olması, bu insanların hayvanlarla iç içe yaşamaları, hayvansal gıda üretiminde hijyen kurallarına uyulmaması, bölgemizde yaşayan insanlarda ve hayvanlarda *M. tuberculosis* kadar *M. bovis*'in de tüberküloz olgularına sebep olabileceğini düşündürmektedir.

Bu tez çalışmasında; Çukurova Bölgesinde kesilen tüberkülozlu sığırlardan alınan iç organ örneklerinden ve tüberküloz ön tanılı insanlardan alınan klinik örneklerden, MTK üyesi türlerin konvansiyonel yöntemlerle izolasyonu ve ayırıcı biyokimyasal testlerle identifikasyonu ile elde edilen *M. bovis* izolatlarının, bulaş yollarının, muhtemel kaynağın ve toplumdaki hareketinin tespiti amacı ile MIRU-VNTR ve Spoligotyping yöntemleri kullanılarak genotip düzeyinde tiplendirilmesi yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe:

Üç yüz milyon yıldan beri varlığını sürdüren mikobakteriler, doğada her yerde ve bol miktarda bulunabilir¹⁷. Bilinen en eski tüberküloz vakası Almanya’da bulunan M.Ö. 8000 yıllarına ait insan iskeletlerindeki lezyonlara ait bulgularla tesbit edildiği bildirilmektedir¹⁸. Eski Mısır’ın Thebes bölgesinde M.Ö. 4000-2400 yıllarında yaşamış Fravunlar döneminden kalma mumyaların kemik kalıntılarında da tüberküloza ait lezyonlar belirlendiği ve bu mumyalardan alınan örneklerde ARB, PCR ve IS6110 RFLP teknikleri ile tüberkülozun varlığının gösterildiği ve spoligotipleme ile de suş tayininin yapıldığı bildirilmiştir¹⁹. Yine M.S. 700 yıllarında yaşadığı düşünülen bir İnka erkek çocuğu mumyasının omurga grafisinde omurga tüberkülozuna ait bulgular tespit edilmiştir¹⁸. Hipokrat (M.Ö. 460-377) hastalık için erime, tükenme anlamına gelen “phtisis” deyimini kullanırken, M.S. 2. yüzyılda yaşayan Galen, kendisinden sonra 1000 yıl değişmeyen tüberküloz için tedavi önerilerini ortaya koymuştur²⁰.

Aceves Avila ve arkadaşları (1998) Meksika’da 16. Yüzyılda yaşamış yerlilere ait, 443 iskelette yaptıkları çalışmada, inceledikleri iskeletlerin 19 tanesinde vertebra tüberkülozuna ait bulgular gördüklerini rapor etmişlerdir. Yine Colomp öncesi dönemde tüberkülozun sık görüldüğü Peru’da yaşadığı düşünülen en az 1000 yıllık olduğu tahmin edilen bir kadına ait spontan olarak mumyalaşmış akciğer dokusundaki lezyonlardan IS6110 tekniği ile *M. tuberculosis*’in varlığının gösterilmiş olması tüberküloz tarihinin Amerika kıtasında da oldukça eski olduğuna işaret etmektedir^{21,22}.

Rönesans’la beraber tüberküloz konusunda da yeni bilgiler ortaya çıkmış, Andreas Vesalius (M.S. 1478) fitizisli hastaların otopsilerinde kaviter lezyonların bulunduğunu bildirmiştir. F. Syllivus (1614-1672) ise tüberkülozdan ölen hastaların akciğerlerinde küçük sert nodüllerin bulunduğunu göstererek bunlara “tüberkül” adını vermiştir²². On yedinci ve on sekizinci yüzyıllarda sanayi devrimi döneminde, yetersiz beslenen ve kalabalık barınma şartlarında yaşayan yoksul insanların sayısının çoğalması ile tüberküloz salgınlarında artışlar olmuştur. Bu durum hastalığın İngiltere’den tüm batı ülkelerine yayılmasına yol açmış ve batı Avrupalılar tüm dünyaya yayıldıkça tüberküloz da yaygınlık kazanmıştır¹⁸.

Robert Koch 1882’de tüberkülozun *M. tuberculosis* ile oluşan bir enfeksiyon hastalığı olduğunu ispatlayarak yeni bir dönem başlatmıştır. Robert Koch’un bu buluşu kendisine 1905 yılında Nobel ödülü kazandırmıştır²³.

Koch tüberküloz aşısını geliştirmek için hayvan ve insanlardan elde ettiği tüberküloz kültürlerini yüksek ısı ile muamele ederek hazırladığı solüsyona Old tuberculin ismini vermiş ve old tuberculin aşı olarak kullanmıştır¹⁸. F. Seibert 1930’lu yıllardan sonra old tüberkülini saflaştırmış ve elde edilen saflaştırılmış proteini (PPD) tüberküloz enfeksiyonunun varlığını tespit için kullanmıştır¹⁸.

Almanya’da 1854 yılında ilk sanatoryumun açılmasıyla tüberküloz tedavisinde yeni bir yaklaşım başlamış ve W. Roentgen’in 1895 yılında X ışınlarını buluşu ile sanatoryumlar bakteriyolojik ve fluoroskopik incelemelerin yapıldığı tüberküloz tedavi ve araştırma merkezleri haline gelmiştir¹⁸.

Tüberküloza karşı etkili bir aşı hazırlamayı amaçlayan Calmette ve Guérin mikobakterilere karşı bağışıklık kazandıracak ama virülansı düşük bir mikobakteri üretmeyi amaçlamışlar ve bir inekten izole ettikleri virülan bir tüberküloz basilini patates, sığır safrası ve gliserin içeren besi yerlerine ekerek, yaptıkları 13 yıl süren 230 pasajdan sonra istedikleri sonuca ulaşmışlardır. Bağışıklık yapma özelliği olan bu basil Bacille Calmette-Guérin (BCG) olarak isimlendirilmiştir. İlk aşılama çalışması 1 Temmuz 1921’de Paris’te başlatılmıştır. Bu çalışmada anneleri tüberkülozlu olan 600 çocuk aşılanmış ve çocuklardan hiçbirinin hastalanmadığı belirlenince, BCG ile hazırlanmış aşı uygulaması hızla yayılmıştır^{24,25}.

Osmanlı’da tüberküloz ile mücadele II. Abdülhamit döneminde başlamıştır. 1882 yılında Robert Koch’un verem basilini keşfinden üç yıl sonra İstanbul’da balgamda verem basili gösterilmiştir. Yine İstanbul’da 1890’lı yıllarda Almanya ile eş zamanlı olarak tüberkülozdan korunmada tüberkülin kullanılmış ve Avrupa ile paralel olarak pnömotoraks tedavisi uygulanmıştır²⁰. Yine II. Abdülhamid zamanında ilk defa İstanbul ve İzmir’de verem kayıtları tutulmaya başlanmıştır. 20. Yüzyılın başında nüfusu 1.2 milyon olan İstanbul’da ortalama 2.800 kişinin veremden öldüğü kayıtlara geçirilmiştir²⁰.

Geçmişte çiçek, veba veya kolera gibi hastalıklarla birlikte birçok dramatik salgınlara sebep olan mikobakterilerin sebep olduğu salgınlar immün yetmezliğe neden olan viral enfeksiyonlar (Human immunodeficiency virüs/HIV) ve uygulanan immün

supresif tedaviler nedeniyle günümüzde tekrar artarak, yeniden tehdit edici boyutlara ulaşmıştır^{26,27}.

Mikobakteriler hücre duvarlarında bulunan peptidoglikan yapısı ile Gram pozitif bakterilere benzerlik gösterebilirler de, bilinen anilin boyaları ile boyanmazlar ve boya alma yeteneklerini etkileyen son derece kompleks yapıları mevcut olup asidorezistan boyanma özelliğine sahiptirler²⁶.

2.2. Mikobakterilerin Evrimsel Gelişimi ve *M. bovis*

MTK popülasyonunun; yaklaşık 15.000-35.000 yıl kadar önce daralmaya uğrayarak genetik çeşitliliğin azalmasına yol açan bir evrimsel darboğaz geçirdiği ve bu darboğazın ardından tek bir klondan çoğalan “eski” *M. tuberculosis* kökenlerinin ve günümüzdeki tüberküloz olgularının büyük bir bölümünden sorumlu olan TbD1 delesyonlu “modern” *M. tuberculosis* kökenlerinin ortaya çıkmış olabileceği görüşü kabul görmektedir^{22,28}.

M. bovis’in *M. tuberculosis*’e göre daha geniş bir konak aralığına sahip olması ve *M. tuberculosis*’in çoğunlukla insanlarda hastalık oluşturmaması sebebi ile, yakın bir geçmişe kadar *M. tuberculosis*’in, *M. bovis*’in hayvandan insana adaptasyonu ile evrimleştiği görüşü kabul görmüştür²⁹. Ancak günümüzde, genomdaki mutasyonel delesyonların irdelenmesi ile, *M. bovis*’in, *M. tuberculosis* atasal suşlarından ayrimından sonra bu türden sırası ile, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae* ve *M. bovis* olacak şekilde delesyonel mutasyonlar sonucu ortaya çıkan en yeni üye olduğu görüşü kabul edilmektedir. Bu kanı, *M. bovis*’in genomunun delesyonlar sebebi ile *M. tuberculosis*’den ~60 kb daha kısa olması ve *M. bovis*’e özgü yeni bir gen kümesinin bulunmaması ile desteklenmektedir^{8,30,31}.

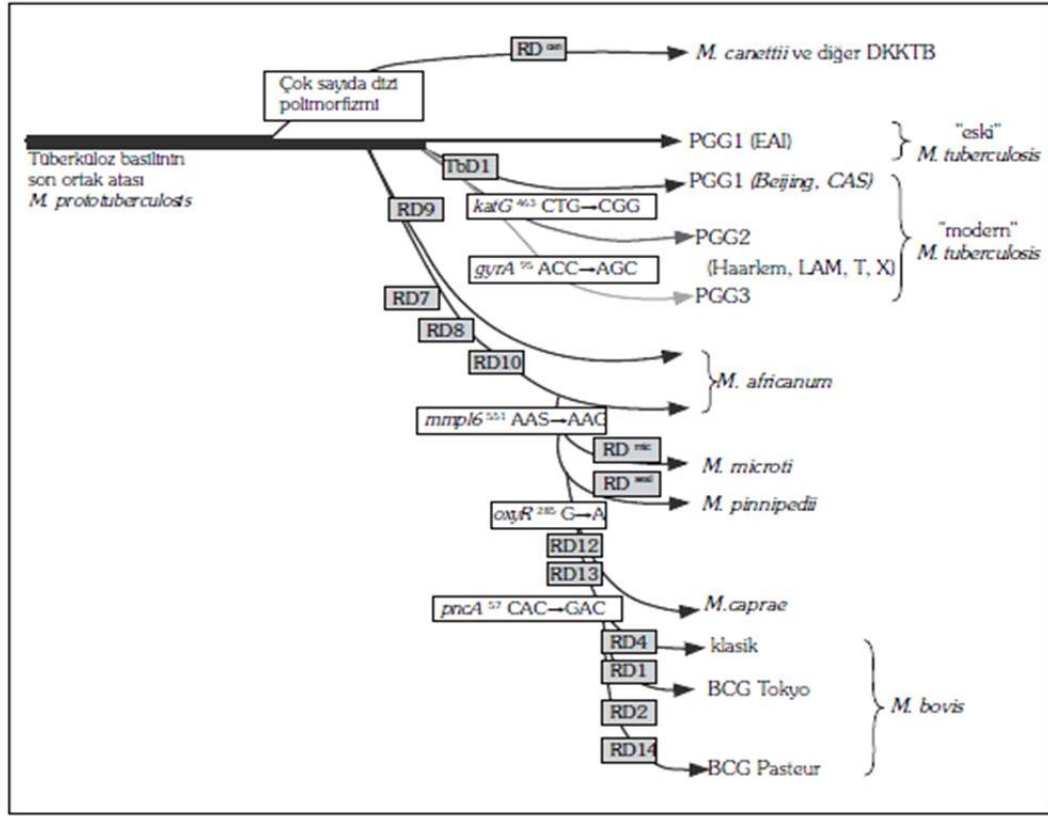
Moleküler yöntemlerle yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçlar, tüm MTK’nın daha büyük bir tüberküloz basili türünün bir alt grubu olduğunu göstermektedir. Sonuçta; MTK’nın *M. canettii* ve diğer düzgün koloni oluşturan tüberküloz basilini de (DKKTB) içeren ve *M. prototuberculosis* olarak adlandırılan çok daha eski ve geniş bir bakteriyel türden daha sonra doğan klonal bir popülasyon olduğu kabul edilmektedir. *M. prototuberculosis*’in yaşı sinonim nükleotit çeşitliliği yöntemiyle 2,6-2,8 milyon yıl olarak hesaplanmıştır. Darboğaz öncesi hattın temsilcileri olan *M. canettii* ve DKKTB’nin erken hominidlerin 3 milyon yıl önce yaşadıkları Doğu

Afrika’da izole edilmesi erken hominidlerin de tüberkülozdan etkilendiklerini düşündürmektedir^{4,26,31}.

M. caprae ve *M. pinnipedii*, *M. bovis*’in farklı kökenleri olarak bilinmektedir. TbD1 bölgesinin bulunmasına karşın, RD7, RD8, RD9 ve RD10 delesyonunun bulunması *M. bovis*, *M. caprae* ve *M. pinnipedii* kökenlerinde gözlenen ortak bir özelliktir. Fok izolatlarında (*M. pinnipedii*) RD^{seal}, keçi izolatlarında (*M. caprae*) RD12, RD13 ve “klasik” *M. bovis* izolatlarında ise RD4, RD12 ve RD13 delesyonu belirlenmiştir. Bu bulgular *M. caprae*’nin veya atalarının *M. bovis* veya atalarından daha eski olduğunu düşündürmektedir. *M. bovis* BCG’de ise attenuasyon işlemleri sırasında klasik *M. bovis*’de bulunan **ESAT-6** (Early secretory antigenic target) ve **CFP-10** (Culture filtrat protein) proteinlerini kodlayan RD1 bölgesinin yanı sıra RD2 ve RD14 bölgelerinin delesyona uğradığı bilinmektedir. *M. bovis* BCG’de *M. tuberculosis*’de bulunan en az 61 genin kayıp olduğu tahmin edilmekte ve bu genomik bölgelerin konak spektrumundan veya virulans kaybından sorumlu olduğu düşünülmektedir^{31,32}.

İnsanlarda aşı olarak kullanılan avirulan *M. microti* ve *M. bovis* BCG’deki attenuasyonun sebebi virulan ve attenüe türler arasındaki RD lokuslarının dağılımlarının genomik düzeyde karşılaştırılması ile kısmen değerlendirilmiş ve *M. bovis* BCG’nin RD1^{BCG} ve *M. microti*’nin RD1^{mic} bölgelerinin karşılaştırılmasıyla virulan kökenlerde bulunan potent T-hücre antijenleri **ESAT-6** ve **CFP-10** ile **PE35** ve **PPE68** proteinlerinin aşı kökenlerinde olmadığı gösterilmiştir. Böyle bir ilişki RD3, RD4, RD5, RD7 veya RD9 bölgeleri ile gösterilememiştir. Patojenitede önemli bir rol oynamasına karşın tek başına RD1’in tamamlanmasıyla BCG kökenlerinde virulans tam anlamıyla oluşmamaktadır. Bu bulgular *M. bovis* BCG’de RD1 ile birlikte diğer RD’lerin ve nokta mutasyonlarının da virulansda rol oynadığını göstermektedir^{33,34}.

Brosh ve arkadaşları (2002) ortak atadan köken alan mikobakterilerin evrimlerini genomlarında bulunan 10 adet restriksiyon ile kaybedilmiş “farklılaşma bölgeleri” (RD’s) ile tek nükleotid polimorfizmin (SNP’s) belirlediğini ileri sürmüş ve filogenetik yapılanmayı da Şekil 1’de verildiği gibi şematize etmişlerdir³⁵.



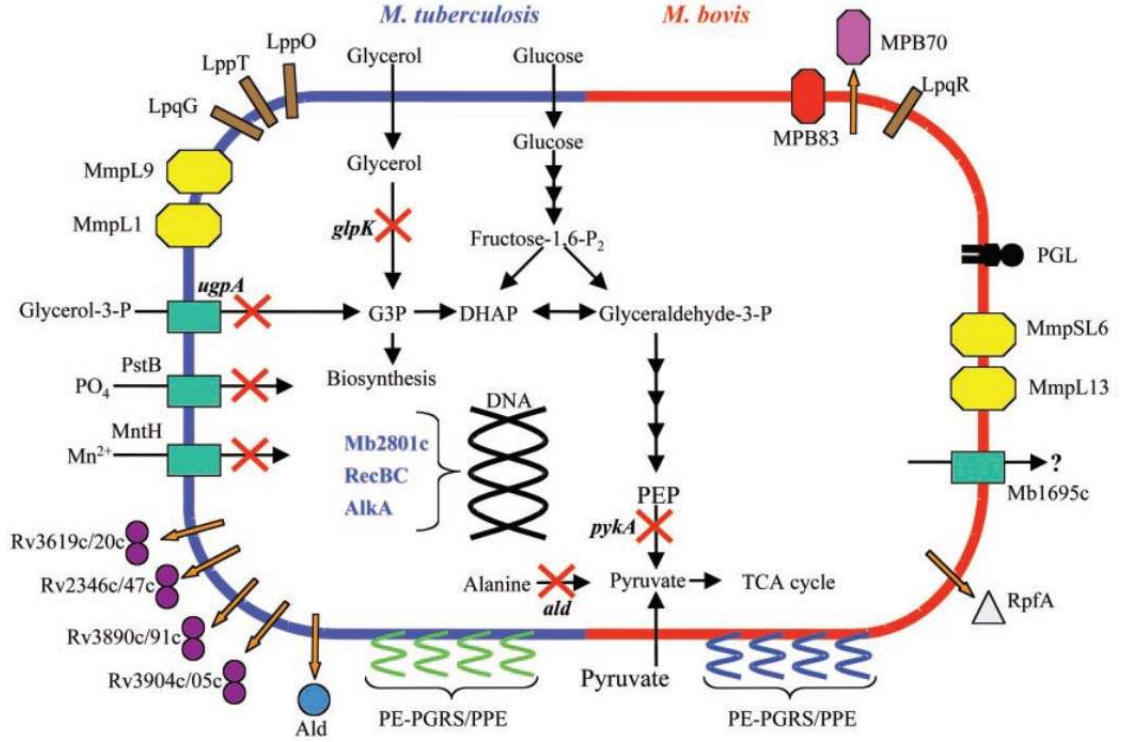
Şekil 1: MTK türleri arasındaki filogenetik ilişki³⁵

M. bovis AF2122_97, *M. tuberculosis* H37Rv ve *M. tuberculosis* CDC1551 suşlarının genom özellikleri karşılaştırılmış ve Tablo 1’de ana hatlarıyla özetlenmiştir³¹.

Tablo 1: Genom Karşılaştırmalarına Genel Bakış³¹

Özellik	<i>M. bovis</i> AF2122-97	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. tuberculosis</i> CDC1551
Genom uzunluğu, bp	4,345,492	4,411,532	4,403,836
G +C, %	65.6	65.6	65.6
Protein kodlayan gen sayısı	3,951	3,995	4,249
<i>M. bovis</i> ’le karşılaştırması			
SNPs	–	2,437	2,423
Transitions	–	1,649	1,630
Transversions	–	788	793
Deletions (≥1 bp)	–	205	221
Insertions (≥1 bp)	–	177	245

Yine *M. bovis* AF2122/97 ve *M. tuberculosis* H37Rv suşları arasında sekrete edilen protein farklılıkları, karbonhidrat metabolizmasındaki farklılıklar ve *M. bovis*'te inaktif olan proteinler aşağıda Şekil 2'de gösterilmiştir³¹.



Şekil 2: *M. bovis* AF2122/97 ve *M. tuberculosis* H37Rv suşları arasındaki farklılıklar. Mavi çizgi *M. tuberculosis* hücre duvarı, kırmızı çizgi *M. bovis* hücre duvarı. Hücre duvarına yerleşen her iki tüberküloz basiline ait transport molekülleri, sekrete edilen farklı proteinler (turuncu oklar) her iki yarımda gösterilmiştir. Şekil içerisinde karbonhidrat metabolizmasındaki önemli adımlar ve *M. bovis*'teki eksiklikler kırmızı çarpı işareti ile belirtilerek gösterilmiştir. *M. bovis*'te inaktif olan ve DNA ile birbirini etkileyen proteinler mavi ile gösterilmiştir. PGL, phenolic glycolipid; G3P, glycerol 3-phosphate; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; Ald, alanine dehydrogenase³¹.

2.3. Sınıflandırma

Evrimin ilk yıllarında *Mycobacterium* cinsi içerisinde bulunan üyelerin genomunda meydana gelen insersiyon ve delesyonlara bağlı olarak tür ve alt tür özelleşmeleri meydana geldiğinden, genomik düzeyde benzerlik gösteren türler farklı kompleksler içerisine dahil edilmiştir. Halk sağlığı açısından önemi sebebi ile MTK, *Mycobacterium* cinsinin en önemli grubunu oluşturmaktadır^{36,37}.

M. bovis *Actinomycetales* takımı içerisinde bulunan *Mycobacteriaceae* ailesinin *Mycobacterium* cinsine bağlı, aside dirençli, yavaş üreyen ve oldukça stabil genom yapısına sahip bir bakteridir³⁶.

Mikobakteri türlerinin sınıflandırılmasında Ernest Runyon, *M. tuberculosis* dışındaki MOTT (Mycobacterium Other Than Tuberculosis) türlerini üreme hızları, pigment üretimleri ve koloni morfolojilerini temel alarak fotokromojen, skotokromojen, nonfotokromojen ve hızlı üreyenler olarak dört gruba ayırmıştır³⁸. Woods ve Washington (1987) bu sınıflandırmayı eksik bulmuş ve *M. tuberculosis*'i de içerisine alan klinikle uyumlu Tablo-2'de verilen sınıflandırmayı önermişlerdir³⁹.

Tablo 2: Woods ve Washington sınıflandırması³⁹

Klinik önemi olan Mikobakteriler	<i>M. tuberculosis</i> kompleks(MTK) <i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> (<i>M. bovis</i> BCG) <i>M. africanum</i> <i>M. microti</i> <i>M. canetti</i>		
İnsanda potansiyel patojen olan Mikobakteriler	<i>M. avium-intracellulare</i> kompleks <i>M. kansasii</i> <i>M. fortuitum-chelonae</i> kompleks <i>M. scrofloceum</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. szulgari</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. simiae</i> <i>M. genavense</i> <i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. celatum</i>		
İnsanda nadiren hastalık yapan saprofitik türler	Yavaş üreyenler <i>M. gordonae</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. terrae-triviale</i> komp. <i>M. shimoidei</i> <i>M. gastri</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. paratuberculosis</i>	Orta hızda üreyenler <i>M. flavescens</i>	Hızlı üreyenler <i>M. thermoresistible</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i> <i>M. phlei</i> <i>M. parafortuitum</i> kompleks

2.3.1. *M. tuberculosis* Kompleks (MTK)

Kompleks içerisindeki benzerlikler ve koloni morfolojisi, üreme hızı ve biyokimyasal testler gibi fenotipik özellikler ile DNA fingerprint teknikleri kullanılarak yapılan tanımlamalar ile *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedii* ve *M. caprae* olmak üzere 7 üye dâhil edilmiştir⁴⁰.

2.3.1.1. *M. tuberculosis*

İnsan tüberkülozunun en sık görülen etkenidir. Çoğunlukla damlacık enfeksiyonu şeklinde yayılır. *M. tuberculosis* evrim sürecinde spesifik delesyon bölgesi TbD1 delesyonu ile atasal suştan ayrılmıştır. Esas konağı insan olan *M. tuberculosis*, katı besiyerlerinde aerop ortamda, 37 °C’de 2-4 haftada, pigmentsiz, R koloni oluşturarak ürer. Niasin kullanır, nitratı nitrite indirgerler. Tiyofen-2-karboksilik asit hidrazid (T₂H) üremesini baskılamaz. Pirazinamidaz aktivitesi pozitifdir. Katalaz aktivitesi düşüktür veya yoktur⁴¹.

2.3.1.2. *M. africanum*

Afrika’da Senegalli bir hastadan 1968 yılında izole edilmiştir⁴⁰. *M. africanum* subtip I (Batı Afrika) ve subtip II (Doğu Afrika) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. *M. africanum* subtip II *M. tuberculosis*’ in alt dalı olarak kabul edilmektedir. Batı Afrika *M. africanum* iki dala (lineage) ayrılmıştır. Lineage 1’de RD711 bölgesi, lineage 2’de ise RD7, RD8, RD9, RD10, RD701 ve RD702 bölgeleri delesyona uğramıştır. Bu iki dal neredeyse Batı Afrika’daki tüberküloz olgularının yarısından sorumludur. *M. africanum* insan konaklı patojendir, *M. tuberculosis*’den daha düşük oranda izole edilir. Bu durum coğrafi sınırlılığa veya laboratuvar klasifikasyon eksikliğine bağlı olabilir. Mikroaerofilik ortamda iyi ürerler. Nitratı indirgemezler. T₂H varlığında üremezler. Pirazinamidaz aktiviteleri pozitifdir^{40,42}.

2.3.1.3. *M. microti*

Çoğunlukla küçük kemirgenlerde bildirilmesine rağmen kediler, domuzlar ve lamalarda enfeksiyon oluşturduğu gözlenmiştir. *M. microti*’ nin son zamanlarda çok nadir de olsa insanlarda enfeksiyon yaptığı bildirilmiştir⁴⁰. Geleneksel yumurtalı katı besiyerinde zayıf üreme gösterirler. Sıvı kültür tekniklerinde daha hızlı ve bol miktarda

ürerler. *M. microti* suşları diğer MTK suşlarında gözlenenden farklı karakteristik IS6110 bant profili ve spoligotyping paterni göstermektedir. Lama-tipi ve sıçan-tipi olmak üzere iki Spoligotyping profili bulunmaktadır^{42,43}.

2.3.1.4. *M. canettii*

M. tuberculosis'in oldukça nadir görülen bir varyantıdır. 16S rRNA dizileri diğer mikobakteriler ile benzerdir. *M. canettii* çoğunlukla düzgün, yuvarlak ve parlak görünümlü koloniler oluşturur. Düzgün koloni fenotipi stabil değildir, düzensiz koloni morfolojisine de dönüşebilir. *M. canettii* suşları arasında housekeeping gen polimorfizmi, IS1081 kopya sayısı, koloni morfolojisi, hücre duvarının lipid içeriği gibi birçok açıdan farklılıklar belirlenmiştir. Delesyon incelemesi sonucunda RD, RVD ve TbD1 bölgelerinin *M. canettii* genomunda korunduğu görülmüştür⁴⁰.

2.3.1.5. *M. pinnipedii*

M. pinnipedii ilk olarak Avustralya deniz aslanları ve fok balıklarında gözlenen tüberküloz vakalarından izole edilmiştir. Fok balıklarından izole edilen suşlar sodyum piruvat içeren besiyerinde üreme göstermiştir. Ziehl-Neelsen boyamada gevşek kord formasyonu ve pirazinamid duyarlılığı ile *M. bovis* 'ten farklılık göstermektedir⁴⁰.

2.3.1.6. *M. caprae*

M. caprae ilk olarak İspanya'da keçilerden izole edilmiştir. MTK'nın diğer üyelerinden farklılıklar gösterir. Pirazinamid duyarlılığı gibi biyokimyasal ve epidemiyolojik özellikleri dışında gen (*pncA*, *oxyR*, *katG* ve *gyrA*) polimorfizm kombinasyonları ile MTK'nın sıradışı bir üyesidir⁴⁰.

2.3.1.7. *M. bovis*

M. bovis'in konak spektrumu hayvan ve insanları da içine alacak kadar geniştir. Klinik olarak *M. tuberculosis* enfeksiyonundan ayırımı oldukça zordur. İnsan nadiren de olsa primer konak olabileceği için epidemiyolojik açıdan *M. tuberculosis* ile tür düzeyinde ayırt edilmelidir. *M. bovis* enfeksiyonları düşük sosyo-ekonomik düzeyli, tüberküloz kontrol programlarının yetersiz olduğu ve pastörizasyonun uygulanmadığı ülkelerde hayvan ve insanlarda oldukça yaygındır⁴⁴.

2.4. Morfoloji

Mikobakteriler DNA'sında bulunan G+C oranı (%62-70) ile *Nocardia* (%60-69), *Rhodococcus* (%59-69) ve *Corynebacterium* gibi diğer aside dirençli bakterilere benzerlik gösterir. Mikobakteriler 0,3-0,6x1-4 mm büyüklüğünde çomakçıklar olup, bazen hafif kıvrık biçimlerde de görülebilirler⁴². Mikroskopik olarak tüberküloz etkenlerinin birbirinden ayrılması oldukça zordur. Mikobakteriler stoplazma, plazma membranı ve bunları çevreleyen lipidlerce zengin bir hücre duvarından oluşur. Bazı mikobakterilerin stoplazmalarında kromozomal DNA dışında plazmid ve epizom olarak adlandırılan küçük DNA parçacıkları görülür⁴².

2.4.1. Hücre duvarı:

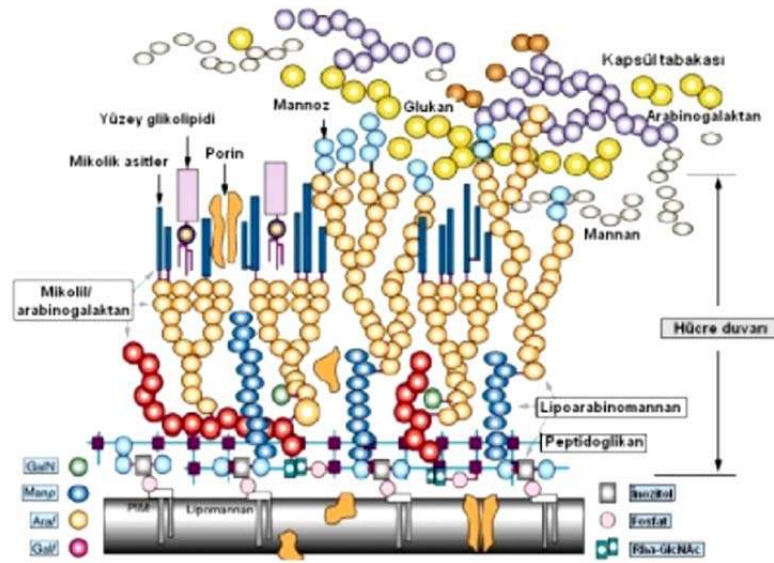
Mikobakterilerin hücre duvarı, bilinen bakteri hücre duvarlarından farklı olmak üzere, plazma membranı, orta tabaka ve peptidoglikan yapı olmak üzere 3 tabakadan oluşur²⁶.

Plazma Membranı: Protein ve fosfolipidlerden oluşan plazma mebranı çift katmanlı yapıdadır ve peptidoglikan tabakadan periplazmik boşlukla ayrılır^{26,45}.

Orta Tabaka: Peptidoglikan, arabinogalaktan, mikolik asitler, açıl trehalozlar, oligosakkarid içeren lipidler ve fosfotidilinozitolün glikozil derivatları yer alır. Antijenik özelliğe sahip glikoproteinler ile porin yapılar da orta tabakada yer alır. Mikobakterilerin en önemli virulans faktörlerinden olan mikolik asitler hücre duvarı kuru ağırlığının % 50'sini oluşturur. Mikolik asitler güçlü hidrofobik özelliğe sahip olup hücre duvarı permeabilitesini de etkilerler²⁶.

Peptidoglikan Yapı: Mikobakterilerde hücre duvarının en önemli karakteristiği kemotip-IV peptidoglikan yapısıdır. Klasik bakteriyel peptidoglikandan farklı olan bu yapı N- asetilglukozamin ve N- glikozilmuramik asitin, betaglikozid ve fosfodiester bağlarla bağlanmasından oluşan bir heteropolimerdir. Mikobakterilerin kemotip-IV peptidoglikan sınıfından olan peptidoglikan tabakasında, diğer bakterilerin peptidoglikanlarından farklı olarak muramik asidin asetillenmiş yapısı yerine glikolik asitle glikozillenmiş formu bulunmakta ve tetrapeptit yan zincirler diaminopimelik asit içermektedir. Mikobakterilerdeki peptidoglikan tabaka kor bölgesinin iskeletini oluşturmak üzere gram pozitif bakterilerdeki teikoik asitin bağlanmasına benzer bir disakkarit fosforil köprü ile bir heteropolisakkarit olan arabinogalaktanı kovalent olarak

bağlar. Peptidoglikan yapı bakteriye şeklini verir, hücre duvarına bütünlük ve sertlik kazandırır. Tetrapeptid yapıda yer alan diaminopimelik asitler ile lizozimlere karşı direnç kazanırlar. Hücre duvarları yapısında peptidoglikanın bulunması mikobakterilerin Gram pozitif bakterilere benzer olduğunu düşündürür. Ancak hücre duvar yapısında protein ve polisakkaritlerin yerini lipid tabakanın bulunması gram pozitif bakterilerle farklılık yaratır^{26,45}. Şekil 3'te hücre duvarının yapısı verilmiştir²⁶.



Şekil 3: Mikobakterilerde hücre duvarı yapısı²⁶

2.4.2. *M. bovis*'in Genomu

M. bovis genom dizilimi büyük oranda *M. tuberculosis* genomuna benzer fakat *M. tuberculosis*'ten farklı olarak genomda oluşan delesyonlar genom uzunluğunun azalmasına neden olmuştur³¹. İnsan veya hayvan tüberküloz etkenlerinin konak tropizminde farklı gen ekspresyonları anahtar rol oynar. *M. bovis* insanlarda halen kullanılan aşı suşu *M. bovis* BCG'nin atasıdır ve *M. bovis* BCG, *M. bovis*'in 13 yıl boyunca seri bir şekilde 230 kez pasaj yapılarak attenüasyonu ile elde edilmiştir⁴⁶. Basilin attenüasyonuna yol açan mutasyon tam olarak bilinmemekle birlikte RD1 delesyonunun rol oynadığı düşünülmektedir.

Garnier (2003) ve arkadaşları İngiltere’de tüberküloz lezyonu bulunan akciğer ve lenf düğümlerinden elde ettikleri *M. bovis* suşunun genom dizisinin 4,345,492 bp uzunluğunda tek sirküler kromozoma sahip ve G+C oranının % 65,63 olduğunu belirterek, protein kodlayan ve içeriğinde profaz evresi ve 42 adet IS elementi olan 3,951 gene sahip olduğunu rapor etmişlerdir³¹.

M. bovis’de tek lokusta bulunan ve TbD1 olarak adlandırılan sekans *M. tuberculosis*’te büyük ihtimalle yoktur. *M. bovis*’in şeklini oluşturan dominant mekanizma delesyondur. *M. bovis*’le *M. tuberculosis* H37Rv suşu arasında 2.437 SNP (Single Nucleotide Polymorphism), *M. bovis*’le *M. tuberculosis* CDC1551 suşu karşılaştırıldığında ise 2.423 adet SNP vardır. *M. bovis*’e ait **pncA** geninde meydana gelen nokta mutasyon sonucunda antitüberküloz ilaç olan prazinamid direnci oluşur ve niasin birikimine engel olur. 2,504 CDS, (coding sequences) identifiye edilen 3 ayrı genomda kıyaslandığında; *M. tuberculosis* H37Rv ile 1629, *M. tuberculosis* CDC1551 ile 1656 coding dizisinin benzer olduğu ortaya çıkmıştır. 2,082 CDS her iki *M. tuberculosis* suşunda aynı bulunmuştur. Bu seçilen CDS’nin karşısında *M. bovis*, *M. tuberculosis* H37Rv suşuyla kıyaslandığında 506 synonymous, 769 nonsynonymous, *M. tuberculosis* CDC1551 ile kıyaslandığında 506 synonymous, 800 nonsynonymous SNPs gösterilmiştir. Bu iki *M. tuberculosis* suşu arasında ise 241 synonymous, 339 nonsynonymous SNPs görülmüştür. Bu durum hem MTK üyelerinin arasında gen diziliminin korunmuş olduğunu hem de *M. tuberculosis* ile *M. bovis* arasındaki farklılığı vurgulamaktadır³¹.

İnsan ve hayvan tüberküloz basilinin hücre duvarı ve sekrete edilen proteinlerini kodlayan genler arasında önemli derecede farklılıklar olması dikkat çekicidir. Lipoproteini kodlayan genlerdeki farklılık karşılaştırıldığında *M. bovis* genomunda **lppO**, **lpgT**, **lpgG** ve **lprM** geni delesyon ya da frameshift mutasyona uğramasına rağmen, **lppA** geni çift kopya olarak bulunmaktadır. Benzer şekilde *M. bovis*’de **rpfa** geninin kodladığı sekrete edilen protein büyümeyen veya dormant haldeki basilin yeniden canlanmasını sağlar⁴⁷.

M. bovis’in genomunda delesyonla daha çok etkilendiği bilinen antijenler grubu ESAT-6 familyasıdır. *M. tuberculosis* tarafından sekrete edilen **ESAT-6** proteini 20’nin üzerinde üyesi bulunan kuvvetli T hücre mutajeni proteinler ailesi mensubu bir antijendir. *M. tuberculosis*’te **ESAT-6** proteinini kodlayan **Rv2346c**, **Rv2347c**,

Rv3619c, **Rv3620c**, **Rv3890c** (**Mb3919c**) ve **Rv3905c** (**Mb3935c**) geni *M. bovis*'te değişmiş veya kaybolmuştur. Bu değişiklikler antijen yükü konusunda tek veya kombinasyon halde etki etmesine karşın bu genlerdeki kaybın önceden bilinmesi zordur. Sekretomdaki etkileyici derecedeki varyasyonlar sığır basilindeki MPB70 ve MPB83 serodominant antijen ekspresyonunu artırır⁴⁸.

Mangan'ın (Mn^{++}) transportunu sağlayan proteinleri kodlayan **mntH** geninin inaktivasyonu *M. tuberculosis*'in virulansını etkilemediği halde *M. bovis* için Mn^{+} dinlenme evresi veya olumsuz şartlarda düzenleyici fonksiyonlar için gereklidir. Ayrıca Mn^{+2} ve fosfat transportunda meydana gelebilecek değişikliğin tüm gen regülasyonunu etkileyebileceği dřnlmektedir⁴⁹.

M. bovis ile *M. tuberculosis* arasında invitro farklardan birisi de *M. tuberculosis* için tek karbon kaynağı gliserol iken *M. bovis*'in pruvata ihtiyaç duymasıdır³¹. Bu, muhtemelen *M. bovis* 'in gliserol metabolizmasındaki kusurun etkileri ile olmaktadır. *M. bovis* AF2122/97 suşunun **glpK** geni gliserol kinazı kodlayan bir pseudogendir ve gliserolün fosforilasyonunu engeller ve böylece karbon kaynağı olarak kullanır. **ugpA** geni de ATP-binding kasetinin gliserol 3 fosfatın transferini sağlayan bölümünü kodlar. **frdB** (Iron sulfure protein) ve **frdC** (fumarat redüktazın membran spanning domaini) geninde oluşan frameshift membrandaki önemli anaeorobik enzimin pozisyonunu etkileyebilir. Piruvat kinaz fosfofenol piruvatın piruvata defosforilasyonunu katalizler. Bu glikolizisin dönüşümsüz son adımıdır. Böylece *M. bovis*'te oksidatif metabolizmadaki glikolitik ara ürünler bloke edilmiş olur. Alanin dehidrogenaz enzimini kodlayan pseudogen olan piruvat **ald** geninin bloke olması da alaninden piruvat oluşumunu engeller. *M. bovis* BCG suşunda **glpK**, **ugpA** ve **pykA** mutasyonları bulunmamaktadır ve gliserinli besi yerine piruvat ilavesine ihtiyaç duymamaktadır^{31,35}. *M. bovis* genomu %99,95 oranında nükleotid düzeyinde *M. tuberculosis* genomuna benzerlik gösterir ancak yaygın olarak translokasyon, duplikasyon ve inversion gstermez³¹.

2.5. Üreme zellikleri

M. bovis katı ve sıvı besiyerlerinde, aerob şartlarda 6-8 haftada rer. Katı besiyerinde R veya S tipi koloni yapar^{50,51}.

M.bovis üretme özelliği en iyi olan besi yerlerinde bile *M.tuberculosis*'ten daha geç ürer. Yumurtalı besi yerinde kolonileri ortalama 4. haftadan sonra oluşmaya başlar. Bu besi yerinde küçük, yuvarlak, düz veya hafif kabarık, nemli ve beyazımtırak koloniler yaparak ürer. 1-10 µm uzunlukta ve 0,2-0,6 µm çaplı, kapsülsüz, sporsuz, hareketsiz olup niasin ve nitrat redüksiyon testleri negatiftir. TCH'ya duyarlıdırlar. Güçlü katalaz aktivitesi gösterir. Bu özellikleri diğer mikobakterilerden ayrılmalarda kullanılır. *M. bovis subsp.bovis* (pirazinamide direçli) ve *M. bovis subsp.caprea* (pirazinamide duyarlı) olmak üzere 2 alt türü bulunmaktadır⁵².

Gliserin *M. bovis* üremesini *M.tuberculosis*'in aksine olumsuz etkiler hatta durdurabilir. Bu nedenle *M. bovis* izolasyonunda gliserinsiz ve sodyum piruvatla zenginleştirilmiş besiyeri tercih edilmelidir^{52,53,54}.

Hücre duvar yapısındaki yüksek oranda bulunan lipid sebebiyle dezenfektanlara ve çevresel faktörlere karşı dirençlidir. Toprak ve sularda 4-5 ay yaşayabilirler. 37 °C besiyerinde 12 yıl canlı ve virulan kalabildikleri gösterilmiştir. Güneş ışığı olmadığı sürece sokak tozlarında 10 gün canlı kalabilirler. Soğuğa karşı dirençlidirler^{17,55}.

Yapılan çalışmalar % 2'lik gluteraldehitin 20 °C de ve ancak 30 dakikadan daha fazla süre tutulduğunda *M. bovis* BCG ve *M. tuberculosis* üzerine tüberkülosidal etkili olduğunu göstermiştir. Serbest iyodun oda sıcaklığında % 0,0625 ve daha yüksek konsantrasyonlarının 5 dakikalık sürede tüberkülosidal etkili olduğu bilinmektedir. Sodyum hipoklorit (% 5) ve %3-8 formaldehit 10-30 dakikada tüberkülosidal etkilidir. 60 °C'de 15-20 dakikada canlılıkları kaybolur. Direk etki eden güneş ışığına, ultraviyole ışınlarına, basınçlı buharla sterilizasyona ve pastörizasyona duyarlıdırlar¹⁷.

2.6. Antijenik Yapı ve Direnç

Mikobakterilerde, güçlü antijenik özellik gösteren hücre duvarında yer alan çok sayıda protein, lipoprotein ve lipid yapıda epitoplara ile hücre dışına sekrete edilen enzimler bulunmaktadır.

2.6.1. Mikobakteriyel Proteinler

2.6.1.1. Old Tüberkülin (OT)

Önceleri intradermal deri testinde kullanılmış olan kültür edilmiş basilinin ısıyla inaktive edilmiş protein ekstraktıdır⁵⁶.

2.6.1.2. Saflaştırılmış Protein Türevi (PPD)

Old tüberkülinin içerdiği farklı proteinleri uzaklaştırmak için filtre edildikten sonra amonyum sülfatla çöktürülmesi sonucu elde edilmiştir⁵⁷.

2.6.1.3. Isı Şok Proteinleri - HspX (65Kda, 38 Kda, 12 Kda)

Th1 cevabını başlattığı düşünülen şeparon benzeri proteinlerdir^{58,59}.

2.6.1.4. 65 kDa Protein

Tüberküloz granülomlarında tipik olarak görülen kazeifikasyon ve likefaksiyon nekrozunu oluşturduğu düşünülmektedir^{60,61}.

2.6.1.5. 19 kDa Lipoprotein

Nitrojen ara ürünlerinin üretimini ve MHC-I'in antijen bağlamasını inhibe eder. Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve IL-12 sentezini azaltır. İnterferon gama (INF γ) sentezini kodlayan genleri ve makrofajların INF γ reseptörünü inhibe eder⁶².

2.6.1.6. ESAT-6 (Early secretory antigenic target) ve CFP-10 (Culture filtrat protein)

Sayıları 200 kadar olan kültür filtrat proteinlerinin üretim mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Konak hücre içerisinde üreme ile ilişkisi olan **Erp** proteini, mikobakteriyel mikoserosik asit sentezinde rol alan **Mas** proteini, yağ asidi metabolizmasına katkıda bulunan **FadD26** ve **Fad28** proteinleri, **FbpA** proteini, porin benzeri bir protein olan **OmpA** proteini bu grupta sayılabilir. Mikobakterilerde **SecA** proteininin **SecA1** ve **SecA2** gibi farklı varyasyonları bulunur. **SecA2** gen bölgesinden yoksun hale getirilen tüberküloz suşlarının kültür ortamlarında üredikleri ancak virulanslarını yitirdikleri belirtilmiştir⁶³.

2.6.2. Mikobakteriyel Lipidler:

2.6.2.1. Trehaloz-6,6 Dimikolat (Kord Faktör)

Mikobakteriler için önemli bir virulans faktörüdür. Komplemanı aktive eder. Nötrofil göçünü durdurarak granülom oluşumunda rol oynar. Konakçı mitokondriyal membranın geçirgenliğini değiştirerek hücre solunumunu ve oksidatif fosforilasyonu bozar^{56,61}.

2.6.2.2. Süfolipidler (Sülfatidler)

Mikobakteriyi fagosit eden makrofaj içinde fagolizozom oluşumunu engelleyerek, basili lizozomal enzimlerce sindirilmekten korur⁶¹.

2.6.2.3. WaxD

Peptidoglikolipid yapısındadır. BCG aşısının tümörlerde gerilemeye neden olan immünoterapötik etkisinde rolü vardır⁶¹.

2.6.2.4. Lipoarabinomannan

Patojen mikobakterilerde bulunan arabinan terminaline mannoz bağlı ManLAM ve hızlı üreyen apatojen mikobakterilerde bulunan fosfomyoinozitol bağlı LAM ve arabinan terminaline mannoz bağlı olmayan AraLAM olmak üzere üç tipi tespit edilmiştir. ManLAM monositleri inaktive edici bir sitokin olan TGF- β 'nın ekspresyonunu indüklediği bilinmektedir^{56,64,65}.

2.6.2.5. Fosfatidil İnozitol Mannozyd (PIM)

Lipid yapısındadır. Çapraz koruyucu immünitede rolünün olabileceği düşünülmektedir⁶¹.

2.6.3. Mikobakteriyel Enzimler

Mikobakteriler, lipid metabolizmalarında görevli, izositrat liyaz (Icl), lipaz/esteraz (**LipF**), açıl-CoA sentaz (**FadD33**) ve fosfolipaz-C gibi enzimler ile, isopropilmalat izomeraz (**LeuD**), antranilat fosforibozil transferaz (**TrpD**), pyrolin-5-karboksilat redüktaz (**ProC**) ve 1-fosforibozil aminoimidazol-süksinokarboksamid

sentaz (**PurC**) gibi aminoasit ve pirolin sentezinde rol oynayanlar enzimlere, nitroredüktaz (**NarG**), katalaz-peroksidaz (**KatG**), alkil hidroperoksid redüktaz (**AhpC**), demir ile güçlendirilmiş süperoksit dismutaz (**SodA**) ve Cu, Zn ile güçlendirilmiş süperoksit dismutaz (**SodC**) gibi solunum enzimlerine sahiptirler⁶⁶.

2.6.4. Transkript Regülatörleri

Mikobakterilerin housekeeping genlerin ekspresyonunu düzenleyen sigma A, latent enfeksiyonlarda basilin metabolizmasını bazal düzeye indiren sigma-F, dış ortamdaki ısı artışı veya dezenfektanların varlığını algılayarak gen düzenlemeleri yapan sigma-E ve oksidatif strese cevap olarak ekspresyonu artan sigma-H gibi sigma faktörlerine sahip olduğu değişik çalışmalarda gösterilmiştir⁶⁷.

2.7. İmmünite

Tüberküloz enfeksiyonu esnasında konakta doğal ve kazanılmış immünite oluşmaktadır.

2.7. 1. Tüberkülozda Doğal İmmünite

Tüberküloza karşı konağın doğal savunmasında; üst solunum yolunun fiziksel engeli, fagositoz, fagositik hücrelerin reaktif nitrojen ve oksijen ürünleri, inflamatuvar hücreler ve salgıladıkları sitokinler, alveoler makrofajların kimyasal yapısını değiştirmesi, apoptozis, genetik faktörler, solunum sisteminin mikrobiyal florası rol almaktadır^{41,64}.

2.7.1.1. Üst Solunum Yolunun Fiziksel Engeli

Üst solunum yolunun silialı epitelleri etken içeren molekülleri tutarak alt solunum yollarına inmesini engellerler^{41,64,68}. Üst solunum sistemi, ince rulo tarzındaki anatomisi ile turbinatlarda havanın geçişi sırasında bir turbulans oluşturur. Hava turbulansı mikroorganizmaları ve yabancı partikülleri mukozal duvarlara doğru iterek mukusa yapışmalarına sebep olur. Solunum sistemi mukozasındaki *Goblet* hücrelerinden salgılanan IgA türü antikorlar da koruyucu immunitenin önemli bir parçasıdır⁶⁸.

2.7.1.2. Fagositoz

Üst solunum yolu bariyerini aşarak alveollere ulaşan mikobakteriler alveoler makrofajlar ve monositlerce fagosit edilirler⁴⁴. Hücre stoplazmasında fagolizozomal füzyon gerçekleşir ve fagolizozom içerisindeki etkenler pH'nın düşmesi, proteolitik enzimler, fagositik hücrelerce üretilen reaktif oksijen (H_2O_2) ve nitrojen ara ürünleri ile yok edilmeye çalışılır^{69,70}. Mikobakteri fagositozunda hücre duvarında bulunan lipidlerin önemi büyüktür. Lipoarabinomannan (LAM), sulfolipitler, glikolipitler, 19 kDa lipoprotein bunlardan bazılarıdır⁷⁰. ManLAM (arabinan terminaline mannoz bağlı), AraLAM (arabinan terminalinde mannoz olmayan) ve fosfo-myo-inositol bağlı LAM olmak üzere üç tip LAM vardır. ManLAM virulansı yüksek türlerde bulunur ve makrofaj cevabını inhibe ederek mikobakterilerin hücre içinde yaşamasını sağlar^{30,44,71}. Mikobakterilerin, virulans faktörlerine bağlı olarak makrofaj aktivitesi yetersiz gelişirse veya fagolizozom oluşturulamazsa etkenler sindirilmeyen ve hücre içinde çoğalırlar. Fagolizozomun oluştuğu durumlarda, fagolizozomdaki düşük pH sebebiyle nötralize edilmesi, basil duvarında bulunan büyük molekül ağırlıklı lipidler sebebiyle lizozomal hidrolitik enzimlere direnç gelişmesi, reaktif oksijen ara ürünlerinin (H_2O_2) sentezinin önlenmesiyle fagolizozomun öldürücü etkisinden korunurlar. Fagositozdan kurtulan etkenler makrofajlar içinde çoğalarak fagositleri parçalar veya latent olarak kalırlar. Parçalanan fagositlerden dağılan basiller, alveoler boşluklarda çoğalır ve komşu lenf bezlerine ve diğer organlara taşınarak yeni enfeksiyon odakları oluştururlar^{72,73}. Alveoler makrofajlar içindeki mikobakteriler, *isocitrate lyase* salgılayarak yağ asitlerini alternatif besin kaynağı olarak kullanmaya başlarlar. Bu sayede, yıllarca makrofajlar içinde persiste olarak kalır⁷⁰. Mikobakteri antijenleri tarafından uyarılan makrofajlardan IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ , TNF- α (tümör nekroz faktör) gibi proinflamatuvar ve inflamatuvar sitokinler salgılanır⁷⁴.

2.7. 2. Tüberkülozda Kazanılan İmmünite

Mikobakterilerin çoğaldığı alanda makrofajlar ve dentritik hücreler T lenfositler ve fagositlerin göçünü, granülomların oluşumunu sağlayan sitokin ve kemokinler üreterek kazanılmış immün cevabı tetiklerler⁷⁵. Kazanılmış immün cevap, tüberküloz etkenlerinin enfeksiyon odağında lokalize olmasını sağlar. Mikobakteriumlar ile enfekte makrofajlardan, TNF- α ve IL-12 gibi immün koruyucu ve NK hücreleri aktive edici

IL-2 ve TNF- α sitokinleri salınır. TNF- α ile IL-12, T0 ve CD4⁺Th2 lenfositlerin CD8Tc fenotipe dönüşümünü başlatırlar. Th1 lenfositleri IL-2, TNF- α ve IFN- γ salgılar. IFN- γ ; makrofaj aktivatörü olup fagositoz hızını ve makrofajlardan IL-12 ile TNF- α sentezini artırmaktadır. IL-2 ve TNF- α , NK ve CD8⁺Tc lenfositleri aktive eder. Aktive olan makrofajlar Mikobakterileri parçalarken, NK ve CD8⁺Tc lenfositleri stoplazmasında etken bulunduran makrofajları öldürerek etken sayısını azaltır^{69,76}. Makrofajlar veya dendritik hücreler tarafından CD4⁺Th veya CD8⁺Tc lenfositlerine mikobakteriyel antijenler sunulduktan sonra, hücrel immünite ile birlikte tüberkülin testiyle belirlenebilen tüberkülin tipi gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu gelişir⁷⁷.

2.7. 2. 1. Gecikmiş Tip Aşırı Duyarlılık Reaksiyonu

Gecikmiş tip aşırı duyarlılık, konağın antijenlere karşı oluşturduğu bir inflamatuvar cevap olup, yavaş meydana gelmekte ve uzun süre devam etmektedir. Lokal makrofajlar patojene ait antijenik peptitleri MHC-II molekülleri ile Th1 lenfositlerine sunarlar. Antijene özgül olarak aktive olan CD4⁺Th1 lenfositleri tarafından, ölü veya canlı aynı antijenle tekrar karşılaştığı zaman, INF- γ , TNF- α , GM-CS-F (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*) gibi yangı mediatörleri salınır. GM-CS-F makrofajların kemotaksisini, INF- γ makrofajların aktivasyonunu, TNF- α enfekte makrofajların ölümünü sağlamaktadır. Bu mediatörlerin salınmasıyla gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşmakta, olay ilerledikçe granümatöz tip reaksiyon gelişmektedir. Pasif olarak aktarılamayan bir reaksiyon olan gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu, hücrel immün yanıtı takip etmektedir^{68,78}.

PPD (pürifiye protein derivatı) reaksiyonu, tipik bir gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonudur⁷⁹. Lenfositlerin aktivasyonu ile salınan lenfokin ve kemotaktik faktörlerin etkisiyle yangı hücrelerin toplanmasına neden olur ve bunun sonucunda doku hasarı ve nekroz gelişir⁸⁰. Gecikmiş tip aşırı duyarlılıktan, 10 kDa'luk küçük proteinlerin karışımı olan tüberkülinde başka, CD1 molekülleri üzerinden T lenfositlerine sunulan lipoarabinomannan ve glikolipit (kord faktörü) gibi antijenler de sorumludur^{44,64}. Tüberkülozda gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu, konağın doku hasarına sebep olan bir cevap olup, kazeöz nekroz ve kavite oluşumuna yol açar^{74,77}. Tüberkülozda gözlenen kazeifikasyon, likeifikasyon ve kavitasyon gibi, akciğer hasarı konağın gecikmiş tip aşırı duyarlılık cevabı ile ortaya çıkmaktadır^{81,82}. Konakta oluşan

hücrel immünite ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık cevabı, tüberküloz basillerinin çoğalmasını eşit düzeylerde baskılar. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu ile oluşturulan yerel nekroz, hücrel immüitenin yerel makrofaj aktivasyonu sağlaması için konağa zaman kazandırır. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu sırasında oluşturulan nekrotik bölgeden sızan basiller, yerel makrofajlar tarafından tutulurlar. Yerel makrofajlar aktive olmuş ise fagosite ettikleri basilleri inaktive ederler, aktive edilmemiş ise içlerinde basiller tekrar çoğalmaya başlar ve çoğalmayı önlemek için gecikmiş tip aşırı duyarlılık cevap tekrarlanarak kazeöz nekroz alanları genişler^{64,75}.

2.7. 3. Granülom Oluşumu

Enfeksiyonun başlamasından 2-6 hafta sonra hücrel immün cevap ve lezyon bölgesinde aktif alveoller makrofajlar ile lenfositlerin (CD4⁺Th ve CD8⁺Tc) toplanmasıyla granülom oluşur. Granülom oluşumunda, mikobakterium lipidlerinin uyarımı ile enfekte makrofajlar tarafından salınan kemokinlerin (IL-8, MCP-1) rolü vardır^{74,83}. Granülom oluşumu ile alveoller makrofajlar tarafından fagosite edilen ve elimine edilemeyen mikobakterilerin çoğalması ve enfeksiyonun ilerlemesi durdurulmaya çalışılır. Tüberküloz enfeksiyonuna karşı gelişen bu konakçı cevabı, etkenin başlangıçta çoğalmasını ve yayılmasını sınırlar. Konağın bu etkinliğinin başarısı etkenin virulans faktörlerine ve sayısına göre değişmektedir. Granülom içinde uzun süre canlı kalabilen basiller, hücrel immün cevap baskılandığı zaman aktive olabilmektedir^{44,64,74,77}.

2.8. Patogenez

Hasta hayvanlar öksürük, süt, dışkı, idrar, vaginal sekresyonlar ve sperma ile tüberküloz etkenleri çevreye yayarlar. Sığırlarda tüberküloz basilini içeren damlacıkların solunum yolu ile alınması bulaşmada en önemli rolü oynar⁸⁴. Enfeksiyonunun başlayabilmesi için mikobakterileri içeren küçük damlacıkların (~1-2 mm) alveoler yüzeylere ulaşması gerekmektedir. Sindirim yolu ile bulaşma buzağılarda oldukça önemlidir. Genital ve kongenital yolla da bulaşmalar olabilmektedir. Sığırlardan kedi ve köpeklere ektoparazitler ile hastalığın taşındığı bildirilmiştir⁸⁵.

M. bovis'in insanlara bulaşı, sıklıkla enfekte süt ve süt ürünleri ile hasta hayvan etlerinin, enfekte süt, idrar ve gaita ile bulaşık su ve gıdaların tüketilmesi sonucu

sindirim yolu ile olmaktadır⁸⁶. Enfekte materyaller ile temas sonucu deri yolu ile, enfekte hayvanlar ile yakın temasta bulunan insanlarda solunum yolu ile bulaşmalar oluşabilmektedir⁸⁷.

Hayvanlarda hastalığın oluşumunda konağın yaşı, davranışı, çevre, iklim ve çiftlik uygulamalarının rolü oldukça önemlidir⁸².

Etkeni alan canlıda tüberkülozun başlaması üç faktöre bağlıdır. Bunlar; alınan etken miktarı, konakçının bağışıklık durumu ve etkenin virulansıdır^{44,88}. Vücuda alınan etkenler, alveoller makrofajlar tarafından fagosite edilerek etken yok edilir ise enfeksiyon meydana gelmez, ancak fagosite edilen etken makrofajlarda çoğalır ve makrofajları inaktive eder ise enfeksiyon şekillenmektedir^{83,89}.

Sığır tüberkülozunda enfektif doz tam olarak bilinmemektedir⁷⁷. Deneysel olarak 1-3 virulent etken içeren tek bir damlacık ile enfekte edilen duyarlı tavşan ve kobaylarda enfeksiyon şekillenmiştir. Ancak insanlarda ve diğer hayvanlarda enfektif doz bilinmemektedir⁹⁰. Üst solunum yollarındaki mukosilier bariyerden geçerek alveoller boşluğa ulaşabilen etken burada hücrel dejenerasyona veya nekroza neden olur (*primer efekt*). Burada bakteriler ya makrofajlarca fagosite edilerek veya bağımsız olarak bu organlardaki lenf yumrularına giderek *primer complex* olarak tanımlanan lenf nodu tüberkellerinin oluşmasına neden olur. Primer kompleks genellikle canlının ilk enfeksiyonunda görülür. Canlının yaşına ve direncine bağlı olarak bu lezyonlar kendiliğinden iyileşebileceği veya lokalize kalabileceği gibi, ki bu tam olmayan *primer complex* olarak tanımlanır, direncin zayıfladığı durumlarda basiller lokalize oldukları bu odaklarda yeniden üremeye başlayarak kan yoluyla diğer organ ve dokulara yayılabilmekte ve bu organlarda çok sayıda küçük tüberkellerin oluşması ile karakterize *milier tuberculosis* tablosunun oluşmasına neden olurlar^{41,55,77}. Vücutlarında primer kompleks bulunan bireyler yeniden mikroorganizma ile enfekte olabilirler ve kronik organ tüberkülozu şekillenebilir. Vücut direnci zayıf bireylerde şekillenebilen bu tip geç generalizasyonlarda hastalık hızla gelişerek bireyin ölümüne neden olabilmektedir^{41,55,78,91,92}.

2.9. Tanı ve Ayırıcı Tanı

İnsanlarda *M. bovis* 'in tanısında sıklıkla alınan balgam, bronkoalveoler lavaj ve ince iğne aspirasyon sıvısı, hayvanlarda ise sıklıkla post mortem lezyonlu organ

parçaları kullanılır. Vidalı kapaklı özel taşıma kapları içerisine alınan örnekler oda ısısında 2 saat içerisinde laboratuara taşınmalıdır⁴⁰.

OIE'ye göre sığır tüberkülozunun antemortem teşhisinde tüberkülin deri testi, alternatif olarak gamma interferon testi, posmortem teşhisinde; Ziehl–Neelsen, Floresans boyama, İmmunperoksidaz gibi boyalı preparatlarla bakteriyoskopik ve histopatolojik muayene, kültür ve moleküler metotlar önerilmektedir⁸⁶.

2.9.1. PPD Tüberkülin Deri Testi

Tüberküloz enfeksiyonu sonucu oluşan geç ve hücresel tipteki bağışıklığı yani aşırı duyarlılığı belirlemek için kullanılan bir testtir. Enfeksiyon sonucu ilk duyarlılaşma bölgesel lenf düğümlerinde gelişip kan dolaşımına giren duyarlı T-lenfositleri ile 6-9 hafta içinde oluşur. Bu lenfositlerin, deri içine tüberkülin enjeksiyonu ile tekrar uyarılması sonucu, aşırı duyarlılık reaksiyonu gelişir^{44,50,68,79,80}. PPD'nin deri içi enjeksiyonunu takiben antijen derideki dendritik hücreler, Langerhans hücreleri, tarafından alınarak bölgesel lenf düğümlerine taşınırlar. Lenf düğümlerindeki ve dolaşımdaki duyarlı Th1 hücreleri antijeni tanır, aktive olur ve enjeksiyon bölgesinde toplanır. Bölgeye toplanan T-lenfositleri IFN- γ , IL-2, IL-8, serotonin, lenfotaktin gibi maddeler salgırlar. Bu sitokinler bölgeye bazofil ve makrofaj göçünü artırır. Bu hücrelerden salınan sitokinler bölgeye daha fazla lenfosit göçüne neden olur. Meydana gelen bu reaksiyonlar sonucu hücresel düzeyde inflamasyon oluşur. Meydana gelen aşırı duyarlılık reaksiyonu sonucu enjeksiyon bölgesinde endurasyon olarak tanımlanan ödem, kızarıklık, ısı artışı ve ağrı meydana gelmektedir^{41,51,68}.

Tüberkülin deri testinde antijen olarak tüberküloz basillerinin antijenik proteinleri kullanılmaktadır. Old tüberkülin, HSCM (ısı ile konsantre edilmiş sentetik besiyeri) tüberkülin ve PPD tüberkülin olmak üzere üç tipi bulunmaktadır. Ancak günümüzde PPD tüberkülin kullanılmaktadır⁹³.

Sığırlarda tüberküloz teşhisinde kullanılan PPD, *M. bovis* AN5 suşundan, insanlarda, *M. tuberculosis*'den hazırlanmaktadır⁹⁴.

2.9.2. Gamma İnterferon (IFN- γ) Testi

IFN- γ testi, sığır tüberkülozunun teşhisi amacıyla 1980 yılında Avusturalya'da geliştirilen, hücresel bağışıklığın ölçüldüğü in vitro, kan temelli bir testtir⁹⁵. Testte,

Bovine (B) ve Avian (A) PPD ya da diğerk mikobakteriyel antijenler ile uyarılan tam kan ya da mononükleer hücre kültüründe, 16-24 saat süre içinde duyarlı lenfositlerden salınan interferon gamma düzeyi, monoklonal anti-bovine IFN- γ antikorlar kullanılarak sandwich ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) ile ölçülmektedir¹⁰. Sığırlarda, *M. bovis* ile enfeksiyondan 1-4 hafta sonra, tam kan hücre kültüründeki T-lenfositleri PPD B ile uyarıldığında yüksek düzeyde IFN- γ salınımı şekillenmektedir. Deneysel olarak *M. bovis* ile enfekte edilen sığırlar, 14. günde IFN- γ testi ile teşhis edilebilmektedir⁹⁶.

2.9. 3. Bakteriyoskopi ve Kültür

Mikobakterilerin, Ziehl Neelsen ile boyanma prensibi, hücre duvarlarındaki mikolik asitin karbol fuksini tutması ve asit alkolle muameleden sonra boyalı kalması esasına dayanmaktadır⁹⁷.

Ziehl Neelsen boyama yöntemi özellikle insanlarda pulmoner tüberkülozun teşhisinde kolay uygulanabilir ve ucuz olması sebebi ile referans metottur^{71,97,98}. Asidorezistans bakterilerin mikroskopik olarak teşhisi DSÖ'nün önerdiği ve yaygın olarak kullanılan bir metottur. Ancak mikroskopik teşhiste örnekteki bakteri sayısının azlığına bağlı olarak yalancı negatif sonuçlar alınabilmektedir⁷¹. Bakteriyoskopide etkenlerin görülebilmesi için örneğin 1 ml'sinde en az 5000-10.000 bakteri bulunması gerekmektedir⁹⁹.

Tüberküloz enfeksiyonunun teşhisinde kültür altın standarttır^{86,100}. Kültürün uzun süre alması, Biyogüvenlik Seviyesi 3 (BSL 3) laboratuara ihtiyaç duyulması kültür yönteminin dezavantajlarındanıdır⁷¹.

İlk izolasyonunda genellikle Lowenstein Jensen, Coletsos base, Stonebrinks gibi yumurta bazlı ya da Middlebrook 7H10, Middlebrook 7H11 gibi agar bazlı besiyerleri kullanılmaktadır. *M. bovis*, gliserin içermeyen Lowenstein Jensen besiyerinde 3-6 haftada üreme göstermekte olup üreme, besiyerlerinin makroskopik muayenesi ve Ziehl-Neelsen boyama ile belirlenmektedir. Ayrıca besi yerine sodyum piruvat (4gr/l) ilavesi üremeyi olumlu yönde etkilemektedir⁵⁴. Karakteristik üreme süreci ve koloni morfolojisi *M. bovis* için ön tanı sağlarken diğerk *M. tuberculosis* kompleks türlerinden ayırt edilmesi gerekmektedir⁸⁶.

M. bovis katı besiyerlerinde, beyaz renkte, kuru, kabarık, kenarları düzensiz, granüllü, R tipi, *M. tuberculosis*, 4-5 hafta sürede sarı, turuncu renkte kuru, kabarık, üzeri grintili, R tipi, *M. avium* 2-3 hafta sürede, pigmentsiz, düz, S tipi koloniler oluştururlar¹⁰¹.

2.9.4. Lenfosit Proliferasyon Testi

Sensitivite ve spesifitesi yüksek bir testtir. Bu testte PPD Bovine ve PPD Avian antijenlerine karşı lenfositlerin vermiş olduğu invitro hücresel bağışıklık reaksiyonu karşılaştırılmaktadır. Test tam kanda ya da purifiye lenfositler ile gerçekleştirilmektedir. Lenfosit proliferasyon testi çevresel mikobakterilerden kaynaklanan çapraz antijenlere lenfositlerin cevabını elimine ederek spesifiteyi artırmaktadır⁹⁴.

Lenfosit proliferasyon testinin uygulanabilmesi için kan örnekleri alındıktan sonra kısa süre içerisinde laboratuara ulaştırılmalıdır. Bu test özel laboratuvar ekipmanlarına ihtiyaç duyulması, uzun inkübasyon periyodu, radyoaktif nükleotidlerin kullanımının gerekmesi ve laboratuvarlar arası standardizasyonun sağlanamaması sebebi ile bilimsel çalışmalar dışında rutin olarak kullanılmamaktadır⁹⁴.

2.9.5. Humoral Bağışıklığın Ölçülmesi

Tüberkülozun serolojik teşhisinde ilk olarak aglutinasyon testi kullanılmış ve daha sonra bu teste ilave olarak komplement fiksasyon (CFT), pasif hemaglutinasyon, jel presipitasyon, immunelektroforez, immunfloresan testi gibi yöntemler tanımlanmıştır. Ancak tüberkülozisin teşhisinde kullanılan serolojik testlerin yetersiz olduğu görülmüştür^{102,103}.

Mikobakteriler ile enfekte canlılarda oluşan antikor cevabı, bakteriyel yükün ve patolojik değişikliklerin çoğaldığı enfeksiyonun geç döneminde artmaktadır^{88,104}. Bu yüzden tüberküloz enfeksiyonunda hücresel bağışıklığı ölçen testler hastalığı, antikor temelli testlere göre daha erken dönemde ve yüksek sensitivite ve spesifite ile belirleyebilmektedir⁸⁸.

Kan veya vücut sıvılarındaki antikor ya da antijenleri belirlemek için kullanılan serolojik testlerde yüksek doğruluk ile sonuç alabilmek için, *Mycobacterium* türleri için immünodominant olan antijenlerin kullanılması gerekmektedir¹⁰⁵. Tüberkülozun ELISA ile teşhisinde, *M. tuberculosis* ve *M. bovis* kültür filtratları, sonike ekstraktları, PPD,

M. bovis BCG'den elde edilen A60 gibi antijenler kullanılmıştır. Ancak bu antijenlerin çevresel mikobakteriler ve diğer asidorezistans bakteriler ile çapraz reaksiyonlar vermeleri sebebi ile spesifiteleri düşük kalmıştır¹⁰⁶. Rekombinant proteinlerin spesifiteleri kısmen yüksek olarak belirlenirken sensitiviteleri düşük bulunmuştur¹⁰⁷.

2.9.6. Moleküler Metodlar

Moleküler tiplendirme yöntemlerinin fenotipe dayalı yöntemlerle birlikte kullanımı; suşların birbirinden kesin olarak ayrılmasının yanısıra, mikobakterilerin toplum içinde bulaş ve yayılma nedenlerinin ayrıntılarının daha iyi anlaşılması, kaynak olguların belirlenmesi, laboratuvarlardaki kros-kontaminasyonlar ile reaktivasyon ve reinfeksiyon arasındaki farkın tespiti gibi epidemiyolojik yönden son derece değerli olan bilgilere ulaşılmasını sağlamıştır¹⁰⁸.

MTK'nın tanısında 16S rRNA gen bölgesi diziliminin belirlenmesine yönelik gen problemlerinin kullanılması ile Mikobakterilerin tanımlanmasında moleküler yöntemler kullanılmaya başlamıştır. Ancak bu problemlerle yapılan tanımlama tür düzeyinde olmadığı için, sistem modifiye edilerek 16S-23S rRNA bölge amplifikasyonu ve reverse hibridizasyon metodunu baz alan INNO-Lipa gibi metotlar geliştirilerek tür düzeyinde tanımlama yapılabilmektedir. Mikobakterilerin tanımlanmasında 23S rRNA gen bölgesini hedef alan DNA strip test Geno Type MTBC de kullanılmıştır. Yine basilin genomunda Exact Tandem Repeat-D (ETR-D; Mikobakteriyel Serpiştirilmiş Tekrarlayan Ünite 4) olarak adlandırılan tekrar dizilerinin polimorfizminin kompleks üyelerinin, tür düzeyinde tanımlanmasında yüksek duyarlılıkta sonuç veren moleküler markerlar olduğu da gösterilmiştir⁴⁰.

Mikobakterilerin genomu homojen ve stabildir. Genomunda çok az sayıda sessiz mutasyon meydana gelmekte ve genetik rekombinasyonlar genellikle transpozonlar gibi mobil elementler yoluyla veya tekrarlayan dizilerin polimorfizmi ile gerçekleşmektedir. En basit transpozon, insertion sequence'dir (IS). Genom üzerinde 14'den fazla farklı IS elementi belirlenmiştir^{40,109}. IS ve tekrarlayan diziler farklı tür, dal ve alt dallarda farklı sayıda ve genomun farklı yerlerinde yerleşerek genetik polimorfizmin oluşumunu sağladıkları kabul edilmektedir. Bu nedenle IS elementlerinin genom üzerindeki dağılımları farklı suşlar arasındaki ayırimda sıklıkla kullanılmaktadır⁴⁰.

Bugüne kadar çok sayıda tekrarlayan dizi ve mobil element tespit edilmiş olmasına rağmen, bugün en çok kabul gören ve en sık kullanılan tekrarlayıcı elemanlar IS6110, DR (Direct repeat) ve MIRU'dur (Mycobacterial interspersed repetitive units)^{110,111}.

2.9.6.1. IS6110 Restriction Fragment Length Polimorfizm (RFLP)

IS6110 RFLP metodu 1990'larda *M. tuberculosis* epidemiyolojisinde standart tiplendirme yöntemi olarak kabul edilmiştir. MTK izolatlarında insertion sequence IS6110 farklı kopya sayısında ve farklı kromozomal entegrasyon bölgelerinde bulunmaktadır. IS6110 fragmentine dayalı epidemiyolojik çalışmalar yüksek derecede polimorfik olsa da yeterince kararlı ve güvenilirdir. Düşük kopya sayılı suşlar daha homojen ve epidemiyolojik ilişkili fingerprint analizi yüksek kopya içeren suşlar kadar güvenilir değildir. RFLP yönteminde genomik DNA, *PvuII* restriksiyon endonükleaz ile kesim sonrası DNA fragmentleri jel elektroforezi ile ayrılır, daha sonra southern blot tekniği ile bir naylon membrana transfer edilir. Membrana hibridize olan fragmentler bir IS6110 prob ve kemiluminesan kit kullanılarak görülür hale getirilir. Yöntem yüksek ayırım gücü ve tekrarlanabilirliği nedeniyle geçtiğimiz yıllar için referans standart metod olarak uygulanmaktaydı ancak yoğun üretilmiş kültüre ihtiyaç duyması, büyük miktarda DNA gerektirmesi, uzun zaman ve yoğun emek istemesi RFLP yönteminin kullanımını kısıtlamıştır^{40,112}. Ayrıca *M.bovis* suşlarında IS6110 kopya sayısının az olması bu suşlarla yapılacak moleküler epidemiyoloji çalışmalarında kullanımını sınırlamıştır¹¹².

2.9.6.2. Spoligotyping

MTK Direct Repeat lokusu CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-düzenli kümelenmiş spacer arası kısa palindromik tekrarlar) dizilim ailesi üyesidir¹¹³. Spoligotyping yaygın kullanılan PCR bazlı reverse dot blot hibridizasyon metodu olup hızlı, basit, tekrarlanabilir bir yöntemdir. *M. tuberculosis* kompleksi genomu farklı sayıda 36 baz çiftlik DR lokus içerir. DR lokuslarının aralarında 35-41 baz çifti uzunluğunda aralık oluşturan *spacer* olarak adlandırılan dizilimler bulunmaktadır. DR'lerin kopya sayıları ve spacer dizilimlerin varlığı suşlar arası değişim gösterir. Yöntem DR lokusunun polimorfizmine dayanmaktadır, bu polimorfizmler multiple direct variable repeat'leri (DVR) oluşturur. Her DVR, 36 baz

çift içeren DR lokusu ve DR bölgelerinin arasında bulunan tekrarlanmayan kısa dizilimler olan spacer bölgelerini içermektedir⁵³.

Bu yöntemde DR lokusunu hedef alan biotinle işaretlenmiş primerler kullanılarak spacer bölgeler amplifiye edilmektedir. Amplifikasyon sonrası PCR ürünleri denatüre edilir. Denatüre ampikonlar, membrana bağlanmış olan ve farklı spacer bölgelere komplementer olan 43 farklı sentetik spacer oligonükleotidin kovalent bağlarla immobilize edildiği bir membrana aktararak hibridize edilir. Spacer dizilimlerin varlığı veya yokluğu dijital olarak gözlenmektedir. Hibridizasyon sinyalleri kemifloresan (ECF) veya kemilüminesan (ECL) kit kullanılarak membranının sabitleşme yüzeyinde leke şeklinde görülmektedir. Streptavidin alkalin fosfat (ECF) veya Streptavidin horseradish peroksidaz (ECL) enzimi kullanılır. Streptavidin alkalin fosfat enzimine fosfat grubu içeren substrat eklenir. Enzim primerde bulunan biotin grubuna bağlanır, substrat eklenmesi sonrası alkalin fosfat enzimi substratın fosfat grubunu ayırır ve 450-470 nm dalga boyuna sahip floresan sinyalleri açığa çıkar¹⁰⁸. Spoligotyping metodunun major filogenetik dal ayrımı için 1999 yılında Spoligotyping Database1(SpolDB1), 2001’de SpolDB2 ve 2003’de SpolDB3 olmak üzere 3 uluslararası spoligotyping veritabanı oluşturulmuş ve bu veri tabanları baz alınarak MTK’nın küresel ve yerel coğrafi yapısı kısmen ortaya çıkarılmıştır. Bu veri tabanları yeni suşların tanımlanmasında yetersiz kalmasından dolayı 2006 yılında düzenlenen 4. uluslararası spoligotyping veritabanı SpolDB4’te; 122 ülkeden toplanan 39.295 suşun bilgilerinin kullanıldığı yeni bir veri tabanı oluşturulmuştur.

2.9.6.3. MIRU-VNTR

(Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number of tandem repeat) MIRU-VNTR tiplendirme yöntemi, spesivitesinin yüksek oluşu ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği gibi avantajlara sahip, MTK üyelerinin epidemiyolojik özelliklerini belirlemede kullanılan standardize edilmiş en hızlı yöntemlerdendir. PCR için hedef dizilimler olan MIRU lokuslarını içerisine alan komşu bölgeleri tanıyan primerler kullanılarak yapılan PCR ile elde edilen ampikonların büyüklükleri bu bölgelerdeki tekrar sayısının belirlenmesinde kullanılır^{114,115}. Tanımlama, hedef VNTR bölgesi için kopya sayıları baz alınarak yapılan numerik kodlama ile yapılır. Klonal düzeyde tanı çalışmalarında oldukça kullanışlı olan VNTR metodunun ayırım gücü IS6110 RFLP ve

spoligotyping metoduna göre yüksek olmasına rağmen epidemiyolojik çalışmalarda diğer moleküler tiplendirme metotları ile kombinasyonu faydalı olacaktır^{40,116}. Bu metot ile suş tiplendirmede ilk olarak 12 lokus MIRU-VNTR yöntemi kullanılmış olup daha sonra 15 ve 24 lokustan oluşan standart MIRU-VNTR formatları geliştirilmiştir^{114,117,118,119}.

2.10. Epidemiyoloji

Olgu sunumlarına ve yapılan teşhis sayılarına bakılarak insanlarda *M. bovis* enfeksiyonunun oldukça nadir görüldüğü düşünülebilir ancak rutin teşhis yapılan laboratuvarlarda fenotipik yöntemlerle *M. bovis*'in tanımlanması yapılmadığı ve teşhisin sadece MTK olarak belirtildiği göz önünde bulundurulduğunda *M. bovis*'in yaygınlığı konusundaki bilgilerin oldukça sınırlı kalacağı anlaşılmaktadır. Ayrıca, *M.bovis* enfeksiyonları genellikle gastrointestinal sistem, deri ve lokalize organlar gibi ekstrapulmoner yerleşimli olduğundan ve tanıda multidisipliner yaklaşım yöntemleri uygulanmadığı zaman sıklıkla gözden kaçırılmaktadır. *M. bovis* halk sağlığı yönünden risk 3 patojen olarak sınıflandırılmıştır³⁷. Gelişmiş ülkelerde yapılan eradikasyon ve kontrol çalışmaları bTB'nin prevalansını önemli ölçüde azaltmıştır^{7,44}.

İngiltere'de 1942 yılında ineklerin % 40'ı sığır tüberkülozu ile enfekte iken bu oran eradikasyon çalışmaları sonucunda % 0.6' ya kadar düşürülmüş ancak 1984 yılından itibaren hastalığın insidansı artma eğilimine girmiştir. İngiltere'de sığır tüberkülozuna bağlı ekonomik kayıpların 1 milyar dolara ulaşacağı düşünülmektedir^{7,86}.

Sığır tüberkülozunun Almanya'da eradikasyon çalışmaları 1950'li yılların başından bu yana sürdürülmektedir. Hastalığın insidansı kademeli olarak % 40 (1952) dan % 1.7 (1961), % 0.32 (1971), % 0.044 (1981) ve % 0.025 (1988)'e kadar düşürülmüştür¹²⁰.

İtalya'da 1942 yılında 544 süt örneğinden yapılan bir çalışmada sığır tüberkülozunun prevalansı % 6.8 bulunmuştur. İtalya'da 1979 yılında eradikasyon programı uygulanmaya konularak sığır tüberkülozunun insidansı % 3.9'dan 1991 yılında % 1.89'a düşürülmüştür¹²⁰.

Amerika'da 1901 yılında sığır tüberkülozunun insidansı tüberkülin test sonuçlarına göre % 4 ile % 50 arasında bildirilmiştir. Bu ülkede 1951 yılında 8.847.228 sığıra tüberkülin testi uygulandığı, aynı yıl 12.570.825 sığırın postmortem

muayenesinde 1887 tanesinde (% 0.15) tüberküloz lezyonuna rastlandığı bildirilmiştir. ABD’de 1969’da uygulamaya konulan eradikasyon programıyla *M. bovis* insidansı % 0.03’e düşürülmüş, bu oran 1993’de % 0.6 olmuş ve günümüzde ise insidansın % 0.02 olduğu açıklanmıştır¹²⁰.

Macaristan’da 1964 yılında % 25 olan *M. bovis* insidansının, 17 yıllık bir eradikasyon çalışmasından sonra 1981’de, sığır tüberkülozunun tamamen eradikasyonu sonucu, “0”a çekildiği bildirilmiştir¹²⁰.

Polonya’da hastalığın insidansının 1959’da % 44.7 iken 16 yıllık bir eradikasyon programıyla 1974’de % 1.3’e indiği ve bugün ise % 0.3’e düşürüldüğü bildirilmiştir⁹⁴.

Sığır tüberkülozu, bütün dünya için önemli bir hastalık olduğu kadar, ülkemizde de öncelikle üzerinde durulması gereken zoonozlardan birisidir. Bu nedenle dünyada uygulanan tüberküloz eradikasyonuna ilişkin proje ve programlara benzer şekilde ülkemizde de eradikasyon programları uygulamaya konulmuştur. Bu proje ve programlara “3.10.1978 tarih ve 12 sayılı Sığır Tüberkülozu Yönetmeliği” dayanak teşkil etmiştir.

Ülkemizde 1980-1985 yılları arasında 161.022 adet hayvana tüberkülin testi uygulanmış, 50 mihrakta toplam 82 hayvanda tüberküloz tespit edilmiştir. 1986 yılında “Türkiye Tüberküloz Mücadele Projesi” başlatılmış ve Türkiye 5 bölgeye ayrılarak 1. bölgeden başlamak üzere ilk yıl hayvan varlığının % 20’si, 2. ve 3. yıl % 40’ı mücadele kapsamına alınmıştır. Bu projeye göre 1986 yılında 250.000 adet sığıra tüberkülin uygulanmış ve 153 mihrakta toplam 1983 hayvanda tüberküloz tespit edilmiştir. Ancak bu hastalığın HSZ Kanun’una göre tazminatlı bir hastalık olması nedeniyle projenin uygulanmasında finansal sorunlar ortaya çıkmış ve 1987 yılında programda 591.000 sığıra tüberkülin uygulanması planlanmışken 64.000 sığıra tüberkülin uygulanabilmiş ve 96 mihrakta 252 hayvanda tüberküloz bulunmuştur. Sığır tüberkülozunun eradikasyonuna yönelik 1986 yılından bugüne kadar ülkesel bir eradikasyon projesi uygulanmamasına karşın uzun yıllardır çeşitli resmi kurum ve kuruluşlardaki hayvanlarda tüberküloz mücadelesi sürdürülmektedir.

1988-1995 yılları arasında ülkemizde tüberkülin testi uygulanan hayvanlar ve sonuçları ile ilgili sayısal bilgiler Tablo 3’de verilmiştir⁷⁸.

Tablo 3: 1988-1995 yılları arasında tüberkülin test uygulamaları ve sonuçları⁷⁸

Yıl	Bölge sayısı	Tüberkülin testi yapılması gerekli hayvan sayısı	Tüberkülin testi yapılan hayvan sayısı	Tüberküloz pozitif hayvan sayısı
1988	12	73.000	15.000	49
1989	50	22.000	41.000	159
1990	62	27.409	24.373	365
1991	54	36.275	23.342	282
1992	44	80.000	8.292	208
1993	30	11.000	2.790	379
1994	3	2.000	1.227	17
1995	8	1.000	1.574	15

Hayvan hastalık ve zararlıları ile mücadele programı 2005 yılı uygulamaları gereğince süt sektörümüzün Avrupa Birliği Ülkelerine süt ve süt ürünleri ihracatı yapabilmesi için TB'den ari süt işletmeleri oluşturulması kararı alınarak bu amaca yönelik olarak; Balıkesir, Edirne, İstanbul, İzmir, Kırklareli, Kahramanmaraş, Tekirdağ, Eskişehir ve Konya illerinde süt tesislerinin sütü temin ettiği işletmelerdeki hayvanlara tüberkülin testi uygulamasına geçilmiştir⁷. Aynı yıl 150 mihrakta TB hastalığı tespit edilmiş, ari işletmeler dışında 5.976 büyükbaş hayvana tüberkülin testi uygulanmış, pozitif çıkan 768 büyükbaş hayvan zorunlu kesime sevk edilmiştir. Yapılan çalışmalarda ülkemizde sığırlarda TB'nin prevalansı % 10 olarak belirlenmiştir^{121,122}.

M. bovis'ten kaynaklanan insan tüberkülozu vakaları 1960'lı yıllardan itibaren bir çok Avrupa ülkesinde bildirilmiştir^{123,124,125}. Benzer şekilde ve Kuzey Afrika ve Güney Amerika'da da bTB ile ilgili araştırma raporları sunulmuştur.^{126,127,128}

Sığır tüberkülozunun eradike edildiği bölgelerde, 1970'lerin sonlarında, *M. bovis* kökenli yeni bildirilen insan bTB vakalarının endojen reaktivasyonlar sonucu oluştuğu belirlenmiş ve kortikosteroid veya immunsistemi baskılayan ilaçlarla tedavi gören yaşlı bireylerde bu durumun tipik olduğu vurgulanmıştır¹²⁹.

Güneydoğu İngiltere'de yapılan bir çalışmada tüm insan tüberküloz olgularının içerisinde bTB oranının % 2,8 olduğu belirlenmiş ve *M. bovis*'in *M. tuberculosis*'e

kıyasla lenfadenit oluşturma eğilimin fazla olduğu ve daha çok yaşlılarda görüldüğü, muhtemelen de çoğu vakanın reaktivasyonla şekillendiği belirtilmiştir¹³⁰.

Doğu Almanya'da 1982 yılında yapılan bir başka çalışmada tüberkülozlu insanlarda bTB oranının % 4,6 olduğu belirlenmiştir¹³¹. Benzer şekilde Nijerya'da 102 izolatta % 4 bTB, 1982'de Arjantin'de HIV olmayan pulmoner örneklerde % 8 oranında bTB olduğu belirlenmiştir^{132,133,134}.

Ülkemizde insanlarda Ağaçayak A. ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada tüberküloz şüpheli hastaların balgam örneklerinden tespit ettikleri 60 Mikobakteri izolatının PZR ve restriction fragment length polymorphism (RFLP) ile analizi sonrası 44 izolat (% 86.3) MTK üyesi, bunların da 34'ü (% 77) *M. tuberculosis*, sekizi (% 18) *M. bovis*, biri (% 2) *M. microti* ve yine biri (% 2) *M. africanum* olarak değerlendirilmiştir¹³⁵. Çavusoğlu C. ve arkadaşları tarafından ise interferon-gama (IFN- γ) reseptör defekti olan dokuz aylık bir bebekte *M. bovis* BCG aşı suşu izolasyonu bildirmiştir¹³.

FAO raporlarına göre Kıbrıs'ın tamamı 1928'den, İsrail 1972-1983 ve Suriye 1988'den itibaren sığır tüberkülozundan arı ülkelerdir^{86,120}.

Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın Sığır Tüberkülozu ile ilgili mücadele programı çerçevesinde yapılan çalışmalar Tablo 4'te verilmiştir¹³⁶.

Tablo 4: 2000-2011 yılları arasında Türkiye'de sığırlarda belirlenen tüberküloz sayıları¹³⁶

Yıllar	Tarama sayısı	Pozitif Vaka Sayısı	Ödenen Tazminat Miktarı (TL)
2000	7325	261	64.226.562.810
2001	6521	342	154.628.403.000
2002	3375	101	55.752.575.000
2003	3827	213	211.811.392.000
2004	6364	880	1.346.589.000
2005	5976	1330	2.168.200.940
2006	11615	2280	3.961.536,02
2007	19626	2444	3.942.352,76
2008	36052	3876	6.541.977,35
2009	73499	3118	5.711.343,66
2010	70878	2010	6.491.024,66
2011	-	1569	5.547.650,45

2.11. Tedavi

Günümüzde tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar, birinci seçenek veya primer veya major ilaçlar ve ikinci seçenek veya sekonder veya minör ilaçlar olarak ikiye ayrılmaktadır¹³⁷.

2.11.1. Birinci Seçenek İlaçlar

İzoniazid, rifampisin, streptomisin, etambutol içeren bu ilaçların toksisiteleri düşüktür ve kombine kullanılmaları durumunda oldukça etkilidirler. bTB tedavisinde pirazinamid direnci unutulmamalıdır. Basiller duyarlı olduğu sürece tüberküloz tedavisi bu ilaçlardan oluşan tedavi rejimleri ile yapılmalıdır^{138,139}.

2.11.2. İkinci Seçenek İlaçlar

PAS (Para-amino salisilik asit), kanamisin, amikasin, ofloksasin, siprofloksasin, kapreomisin, etionamid, tiasetazon ve sikloserinden oluşmaktadır. Bu grup ilaçlar, birinci seçeneklere göre daha az etkili, daha toksik, daha pahalı ve daha az tolere edilebilen ilaçlardır. Birinci seçenek ilaçlara karşı direnç geliştiği ya da toksik etki meydana geldiği hallerde kullanılırlar¹³⁷.

2.12. Korunma

İnsan ve hayvanlarda tüberkülozdan korunmak için kullanılan tek aşı *M. bovis* suşundan hazırlanan *M. bovis* BCG aşısıdır. Bu aşının sağladığı bağışıklık ve enfeksiyona karşı koruma gücü değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle tüberküloz enfeksiyonuna karşı yeni aşı geliştirme çalışmalarının yapılması gerekmektedir^{96,140}.

BCG aşısına alternatif olarak DNA, subunit protein, attenüe *M. bovis*, ölü non tüberküloz mikobakteri, mutant BCG, viral vektör aşılı ve bunların BCG ile kombinasyonları hayvan ve insanlarda denenmektedir^{141,142}. Haile M. *Lipoarabinomannan* ile hazırladığı aşığı farelere burun yolu ile uygulayarak farelerde BCG aşısı kadar bağışıklık elde ettiğini rapor etmiştir¹⁴³.

Sığır tüberkülozunun insanlara doğrudan bulaşabileceği gibi et, süt hayvansal ürünlerden de bulaşabildiği düşünüldüğünde öncelikle;

1. Tüberkülin testi ile portör hayvanların belirlenerek imha edilmesi,
2. Sağlam hayvanlara sağlık sertifikası verilmesi ve bu sertifikanın alım satımda mutlaka aranması,
3. Mezbahalarda kesimden sonra tüberkülozlu hayvanların belirlenmesi ve bunların geldiği sürülerin öncelikle izlenerek başka portörlerin varlığının araştırılması,
4. Sütlerin herhangi bir bulaşmaya neden olmaması için uygun pastörizasyon veya sterilizasyona tabi tutulup tutulmadığının işletmelerde izlenmesi ve sokak sütçülüğünün engellenmesi,
5. Yurt dışından kaçak hayvan gelişinin önlenmesi, hayvan ithalatının Tüberküloz ari ülke veya bölgelerden seçilmesi,
6. Sığır tüberkülozunu yok etmek için ülkesel proje ve programların kar zarar hesabına göre değil, insan sağlığı ön planda tutularak hazırlanması,
7. Yaban hayatındaki hayvanların da tüberküloz bulaşında rollerinin unutulmaması ve portörlerle mücadele edilmesi,
8. Ülkede sığır tüberkülozu ile mücadele edilirken insan tüberkülozu ile de eş zamanlı mücadele edilerek insan kaynaklı tüberkülozun da hayvanlara bulaşının önlenmesi gerekmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

M. bovis'in bölgemizdeki epidemiyolojik özelliklerini tespit amacı ile Mart 2011-Haziran 2012 yılları arasında Çukurova bölgesinde bulunan mezbahalarda et üretim amaçlı kesimi yapılan 5018 adet sığırdan kesim sonrası granülatöz pnömoni tespit edilen ve bakteriyolojik ekimler için steril şartlarda laboratuvara ulaştırılan 95 adet hayvana ait doku ve organ parçalarından kültür yöntemleri ile izole ve identifiye edilen 32 *M. bovis* izolatu ile aynı dönemde akciğer tüberkülozu ön tanısı alıp klinik örnekleri tüberküloz tanısı amacı ile Ç.Ü. THAUM Bölge Tüberküloz Laboratuvarına gönderilen hastaların balgam örneklerinden izole edilerek *M. bovis* tanısı alan 10 izolat, 12 lokus MIRU-VNTR ve spoligotyping yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır.

3.1. Kültür

Mezbahalarda kesimi yapılan büyükbaş hayvanlara ait akciğer ve lenf nodlarında gözlenen tüberküloz kuşkulu lezyonlardan steril şartlarda alınarak laboratuara ulaştırılan doku örnekleri Petroff'un aşağıda belirtilen protokolüne uygun olarak dekontamine edildi¹⁴⁴.

1. 3 gr doku örneği 10 ml % 0,85 fizyolojik tuzlu suda stomacher ile 1 dakika parçalandı.
2. Homojenizattan 1.0 ml alınarak üzerine 1.0 ml % 4 NaOH ve 2 damla fenol kırmızısı ilave edildi. 37 °C de 20 dakika inkube edildi. 1 N HCl ile pH 6.5-7.0 ye ayarlandı.
3. 2500 rpm de 20 dakika santrifüj edildi.
4. % 0.85 serum fizyolojik ile resüspanse edildi.
5. Her bir örnekten 2 ayrı Pruvatlı (4 gr/l) LJ besi yerine ekimi yapılarak 37 °C de inkubasyona bırakıldı^{144,54}. İnkubasyon süresi sonunda üreyen kolonilerden ayrıca Middlebrook 7H9 sıvı besi yerine pasajları yapıldı.
6. Sıvı kültür sonrası üreme olan örneklerden EZN boyalı prepartlar hazırlandı. ARB yönünden pozitif olan üremelere biyokimyasal testleri yapıldı⁴².

7. LJ besiyerinde üreyen koloni morfolojisi olarak dysgonik üreme özelliği gösteren, niasin birikim testi (-), nitrat redüksiyon reaksiyonu (-), bromcresol mediumda renk değişikliği oluşturmeyan suşlar *M. bovis* olarak değerlendirildi⁴².

3.2. DNA Ekstraksiyonu

Spoligotyping ve MIRU-VNTR yöntemlerinde kullanılmak üzere seçilen 42 adet *M. bovis* izolatının DNA'sının elde edilmesi için Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinden ve LJ besi yerinden Mickle cihazı (Mickle tissue disintegrator) kullanılarak ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon sonrası spektrofotometre (CHEBIOS) ile DNA ölçümü yapılarak yeterli ve eşit miktarda DNA bulunduğu kontrol edildi.

3.2.1. Sıvı besiyerinden DNA Ekstraksiyonu

1. Üreme tespit edilen Middlebrook 7H9 besiyerinden 0.5ml mikrosantrifüj tüpüne alındı.
2. 80 °C'de 30 dakika bekletilerek bakterilerin inaktivasyonu sağlandı.
3. 15000xG'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
4. 0.5ml 1xTE buffer eklendi.
5. 15000xG'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
6. 0.25ml 1xTE buffer eklendi.
7. Tüpe 50-100µl cam boncuk (SIGMA acid washed glass beads) eklendi.
8. 2 dakika Mickle cihazında hücre parçalama işlemi uygulandı.
9. 15000xG'de 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant kısım çalışmalar yapılınca kadar kullanılmak üzere yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak -20 °C'de saklandı.

3.2.2. Koloniden DNA ekstraksiyonu

1. Bir öze dolusu koloni 0.5ml 1xTE buffer içinde süspanse edildi.
2. Yukarıda yazılan prosedürün 2. basamağından devam edildi.

3.3. Spoligotyping

Seçilen 42 *M. bovis* izolatına ekstraksiyon sonrasında spoligotyping metodu uygulandı^{32,145}.

3.3.1. PCR

DRa : 5'-GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3' (5'-ucundan biotin ile işaretli)

DRb : 5'-CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3'

DR bölgesini hedef alan primer sentezletildi. Her çalışmada pozitif (*M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* H37Rv, veya genotipi bilinen klinik izolat) ve negatif kontrol (dH₂O) kullanıldı. Her bir suş için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı.

8.5µl	dH ₂ O
1.0 µl	DMSO
12.5µl	2x PCR Master Mix (Fermantas)
0.25µl	DRa (25pmol/µl)
0.25µl	DRb (25pmol/µl)
2.50µl	Kalıp DNA

PCR reaksiyon karışımı içeren tüpler Termal Cycler Cihazına (Applied Biosystem AB) yerleştirilerek aşağıdaki programda çalıştırıldı;

95°C 5 dak.

94°C 1 dak.	}	40 siklus
55°C 1 dak.		
72°C 45 sn.		

72 °C 10 dak.

4 °C ∞

PCR reaksiyon karışımı mikobakteri DNA'sı içermeyen temiz bir odada hazırlandı. DRa primeri biotinle işaretli olduğu için +4°C'de saklandı. DRb primeri küçük miktarlara bölünerek -20°C'de saklandı.

3.3.2. Spoligotyping Metodunda Kullanılacak Çözeltiler

Spoligotyping metodunda kullanılacak çözeltiler laboratuvarımızda aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

3.3.2.1. 0.5M EDTA (pH 8,0)

EDTA	46,53g
dH ₂ O	250ml
pH 8,0'e ayarlandı ve otoklavlandı.	

3.3.2.2. 20mM EDTA (pH 8,0)

dH ₂ O	960ml
0.5M EDTA	40ml

3.3.2.3. 20x SSPE (pH 7,4)

0,2M Na ₂ HPO ₄	28,39gr/L
3,6M NaCl	210,24gr/L
dH ₂ O	960ml
0,5M EDTA	40ml (Otoklavlandı)

3.3.2.4. 2xSSPE

20 × SSPE	100ml
dH ₂ O	900ml

3.3.2.5. %10 SDS

Önceden ısıtılmış (60°C) dH ₂ O	250ml
SDS	25gr

3.3.2.6. 2xSSPE / %0.1SDS

dH ₂ O	890ml
20 × SSPE	100ml
% 10 SDS	10ml

SSPE solüsyonu ve SDS solüsyonu için ayrı ayrı ölçü kapları kullanıldı.

3.3.2.7. 2xSSPE / %0.5SDS solüsyonu

dH ₂ O	850ml
20 × SSPE	100ml
% 10 SDS	50ml

3.3.2.8. %1 SDS

% 10 SDS	100ml
dH ₂ O	900ml

3.3.2.9. 10 × TE

Tris HCl	15,764g (100mM)
0,5M EDTA	20ml (10mM)
dH ₂ O	980ml

3.3.3. PCR Ürününün Hibridizasyonu ve Görünür Hale Getirilmesi

Biotin işaretli primerler kullanılarak ve DR bölgesi hedef alınarak yapılan PCR sonrası ampikonların hibridizasyonu gerçekleştirildi. Hibridizasyon ve hibridizasyon sonrası ürünlerin streptavidin alkalin fosfat enzimi ve fosfatlı kemifloresan substratı eklenerek görünür hale getirilme esasına dayanan prosedür aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

1) Bütün tampon çözeltiler önceden çalışılmak istenen ısıya getirildi.

Bir membran için gereken miktarlar;

80ml 2xSSPE / % 0,1 SDS, 60°C
160ml 2xSSPE / % 0,5 SDS, 60°C
160ml 2xSSPE / % 0,5 SDS, 42°C
160ml 2xSSPE, oda sıcaklığı

- 2) 150µl 2xSSPE / % 0,1 SDS üzerine 20µl PCR ürünü ilave edildi.
- 3) PCR ürünlerini 99 °C 10 dakika boyunca denatüre edildi.
- 4) PCR ürünleri denatüre edilirken, membran (ISOGEN) 80ml 2xSSPE / % 0,1 SDS ile 60 °C'de 5 dakika yıkandı.
- 5) Sünger yastığı (İmmunetiks Plastic Cushion PC200) ve membranı miniblottter'a (Miniblottter- 3024) yerleştirirken, miniblottter'ın slotlarının membrana çizgi şeklinde bağlanmış oligonukleotidlere dikey konumda olmasına dikkat edildi.
- 6) Slotlarda kalan sıvı aspirasyonla uzaklaştırıldı.
- 7) Slotlar dilüe edilmiş sıcak PCR ürünü ile dolduruldu. Miniblottter (FİNEPCR-combi-SV120) horizontal konumda 60 °C'de 60 dakika hibridize edildi.
- 8) Örnekler slotlardan aspire edildi ve plastik penset kullanarak membran miniblottter'dan çıkarıldı.
- 9) Membran iki kez 80ml 2xSSPE / % 0,5 SDS ile 60 °C'de 10 dakika yıkandı.
- 10) Membran bir poşet dosya içine konuldu.
- 11) 5ml 2xSSPE / % 0,5 SDS üzerine 1,25µl streptavidin-alkalen fosfataz konjugatı (500U/ml) (Promega) ilave edildi, karışım üç tarafı kapatılmış poşet dosya içindeki membrana döküldü, hava kabarcıkları uzaklaştırılarak, poşet dosyanın açık kenarı ısıtılarak kapatıldı. 45-60 dakika boyunca 42 °C'de enkübe edildi.
- 12) Membran iki kez 80ml 2xSSPE / % 0,5 SDS ile 10 dak 42 °C'de enkübe edildi, 80ml 2xSSPE ile 5 dakika oda sıcaklığında durulandı.
- 14) Membran üzerine 5ml ECF substratı (Attaphos AP Flourescent Substrate, Promega) ilave edildi, poşet dosya içinde 60 dakika boyunca enkübe edildi.
- 15) Membran stretch film ile sarılarak uygun illuminasyon kasetinde (450nm) 20 saniye expose edilerek (QUANTUM-ST4 3020-WL/BLUE/20M) görüntü alındı.

3.3.4. Membranın Regenerasyonu

Membranın hibridizasyon ve görüntüleme sonrasında tekrar kullanılabilmesi için aşağıdaki yıkama ve regenerasyon aşamaları uygulandı.

- 1) Membran iki kez % 1 SDS ile 80 °C’de 30 dakika enkübe edildi.
- 2) Membran 20mM EDTA (pH 8) ile 15 dakika oda sıcaklığında enkübe edildi.
- 3) Membran 20mM EDTA (pH 8) içinde poşet dosya içinde, kullanım sayısı ve tarih yazılarak +4 °C’de saklandı.

3.3.5. Yorumlama

Spoligotyping metodu sonuçların yorumlanması aşamasında spacer oligonükleotidlerin kovalent bağlandığı membranla PCR ürünü hibridizasyonu sonucu, oluşan blotlanmalar dikkate alınarak spacer bölgelerinin varlığı değerlendirildi. Sonuçlar aşağıda belirtilen Oktal kodlama anahtarı kullanılarak 0-7 arasında 15 rakamdan oluşan “Oktal kod” formatına çevrildi. Elde edilen veriler aşağıda belirtilen veritabanları kullanılarak kümeler ve familyalar (clade) belirlendi.

Database adres:

<http://www.pasteurguadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/outilsConsultation.jsp>

<http://www.miru-vntrplus.org>

<http://www.mbovis.org>

Spoligotyping sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan oktal kodlar aşağıda verilmiştir.

□□□ = 0	□□■ = 1	□■□ = 2	□■■ = 3
■□□ = 4	■□■ = 5	■■□ = 6	■■■ = 7
■ = 1	□ = 0	Spacer 43	

3.4. MIRU-VNTR

Bu çalışmada 12 lokus MIRU-VNTR yöntemi kullanıldı. Hedeflenen MIRU lokusları için Tablo-5’de verilen primerler kullanıldı. Her bir suşa özgü 12 MIRU lokusunun VNTR sayısının belirlenmesi için 12 PCR reaksiyonu gerçekleştirildi
109,118,146

PCR için reaksiyon karışımı aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

dH ₂ O	2,170µl
DMSO	0,250µl
2X PCR Master mix	3,125µl
Forward Primer	0,040µl
Rewerse Primer	0,040µl
<u>DNA</u>	<u>0,625µl</u>
Toplam	6,250µl

2X PCR MasterMix:

4 mM	MgCl ₂
1,6 mM	dNTP mix (her bir dNTP 0,4 mM)
0,05 u/ µl	Taq DNA Polimeraz içermektedir.

Hazırlanan reaksiyon karışımı thermal cycler’da aşağıda belirtilen ısı, döngü, süre ve sayısında amplifiye edildi.

94 °C 5 dak.	
95 °C 30 sn.	} 40 siklus
62 °C 60 sn.	
72 °C 90 sn.	
72 °C 10 dak.	
+4 °C ∞	

Tablo 5: 12 Lokus MIRU VNTR metodu için kullanılan primerler

Hedef Bölge	PCR 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'

Amplikonlar 120 Voltta, 60 dakika, etidyum bromürlü % 2 lik agaroz (SIGMA) jel elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez sonrası jel görüntüleme sistemi (QUANTUM-ST4 3020-WL/BLUE/20M) ile görüntülendi. Bant büyüklüğünün tespitinde 50-1000 bp lik marker (Fermantas) kullanıldı. Bant büyüklüklerine dayanarak

12 lokus MIRU-VNTR tiplene sonucunda her bir MIRU lokusunda bulunan allel tekrar sayısı belirlendi (Tablo 6).

Tablo 6: MIRU lokuslarının MIRU-VNTR tekrar sayıları ve ampikon boyutları

Allel Tekrarı	MIRU											
	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

4. BULGULAR

Mart 2011- Haziran 2012 yılları arasında Çukurova bölgesinde bulunan mezbahalarda kesilen 5018 adet sığırdan kesim sonrası granülamatöz pnömoni tespit edilen ve bakteriyolojik ekimler için steril şartlarda laboratuara ulaştırılan 95 adet hayvana ait doku ve organ parçalarından konvansiyonel yöntemlerle *M. bovis* olarak tanımlanan 32 adet izolat ile bölgemizde bulunan tüberküloz hastalarından izole edilen 10 adet *M. bovis* izolatının moleküler epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla izolatlar spoligotyping ve 12 lokus MIRU-VNTR yöntemi ile değerlendirildiği çalışmada; Gerek insan kökenli gerekse sığır kökenli izolatların 4 profil içerisinde toplandıkları, en sık karşılaşılan profilin SB0120 olduğu, ilginç olarak sığır kökenli izolatlar arasında *M.bovis ssp. caprae* suşlarının olduğu (Şekil-4, Tablo-7),

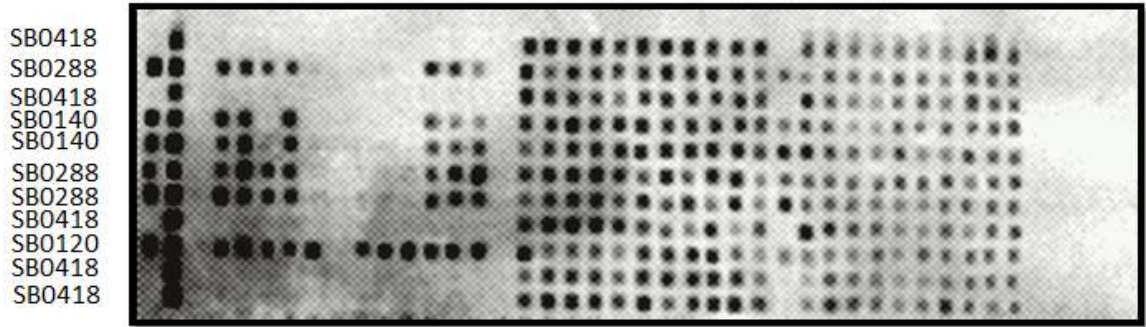
Tablo 7: 42 *M. bovis* izolatına ait spoligotyping paternleri

[illegible]

çalışmadaki 42 izolatın spoligotyping yöntemi ile klonal grup dağılımı incelendiğinde, 40 suşun (% 95,2) 4 küme içerisinde yoğunlaştığı, insan kökenli iki *M. bovis* BCG izolatlarının da dahil olduğu toplam 18 (% 42,85) izolatın en sık karşılaşılan spoligotip paternine, SB0120, ait olduğu en az üyeli spoligo paterninin ise 4 izolat (% 9,52) içeren SB0288 spoligopaternalarının olduğu belirlenmiş, 2 izolatın (% 4,76) ise çalışmada kullanılan veri tabanlarındaki suşlarla karşılaştırılması sonucunda bilinen hiçbir kümeye uymayan orphan suşlar oldukları görülmüş, (Tablo-8)

Tablo 8: 42 *M. bovis* suşuna ait Spoligotyping aileleri ve görülme oranları

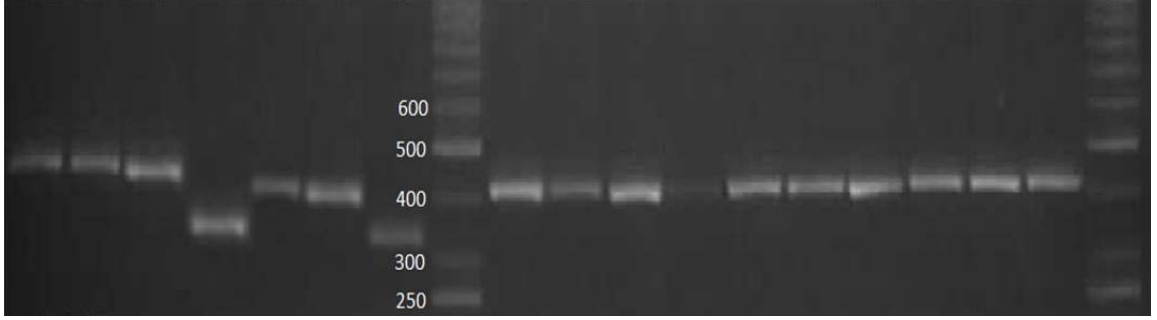
Spoligotyping Aile	Suş Sayısı	Görülme Sıklığı (%)
SB0120/SIT482	18	42,85
SB0140/SIT683	11	26,19
SB0418/SIT647	7	16,66
SB0288/SIT685	4	9,52
Unique	2	4,76



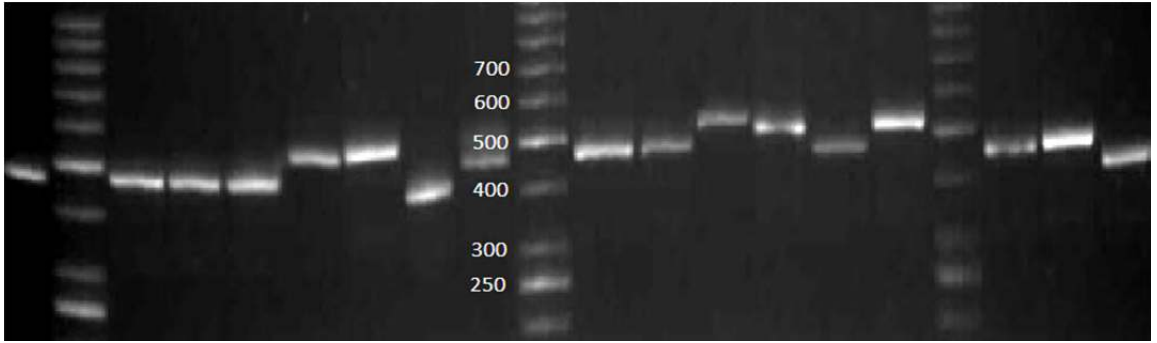
Şekil 4: Spoligotyping görüntüsü

12 lokus MIRU-VNTR yöntemiyle yapılan klonal düzeydeki genotiplendirmede; izolatların tamamında MIRU2 (2), MIRU10 (2), MIRU16 (3), MIRU20 (2), MIRU23 (4), MIRU24 (2), MIRU27 (4) ve MIRU39 (2) lokuslarının tekrar sayılarında fark olmadığı ancak MIRU4, MIRU26, MIRU31 ve MIRU40 lokuslarındaki tekrar sayılarının izolatlar arasında farklılık gösterdiği (Şekil-5, Şekil-6, Tablo-9), bu

farklılıklar dikkate alındığında % 100 ilişkili 10 MIRU-VNTR profilinin elde edildiği (Tablo-10),



Şekil 5: MIRU4 jel görüntüsü



Şekil 6:MIRU40 jel görüntüsü

Tablo 9: 42 *M. bovis* izolatın 12 lokus MIRU-VNTR profilleri

İzolat no	İdentifikasyon	12 Lokus MIRU-VNTR
H-1	<i>M.bovis BCG</i>	232324244222
H-2	<i>M.bovis BCG</i>	232324254322
H-3	<i>M.bovis</i>	232324254322
H-4	<i>M.bovis</i>	232324254323
H-5	<i>M.bovis</i>	232324254321
H-6	<i>M.bovis</i>	232324254322
H-7	<i>M.bovis</i>	232324254321
H-8	<i>M.bovis</i>	232324244423
H-9	<i>M.bovis</i>	232324254323
H-10	<i>M.bovis</i>	232324244222
B-1	<i>M.bovis subsp.caprae</i>	232324254321
B-2	<i>M.bovis</i>	222324254423
B-3	<i>M.bovis subsp.caprae</i>	232324244322
B-4	<i>M.bovis</i>	232324254323
B-5	<i>M.bovis</i>	232324254323
B-6	<i>M.bovis</i>	222324254322
B-7	<i>M.bovis</i>	232324254222
B-8	<i>M.bovis subsp.caprae</i>	232324254422
B-9	<i>M.bovis</i>	232324254323
B-10	<i>M.bovis</i>	232324254422
B-11	<i>M.bovis</i>	232324254422
B-12	<i>M.bovis subsp.caprae</i>	232324244322
B-13	<i>M.bovis</i>	232324254323
B-14	<i>M.bovis subsp.caprae</i>	232324254222
B-15	<i>M.bovis</i>	232324254322
B-16	<i>M.bovis</i>	232324254422
B-17	<i>M.bovis</i>	232324254222
B-18	<i>M.bovis</i>	232324254323
B-19	<i>Unique</i>	232324254322
B-20	<i>M.bovis</i>	232324254322
B-21	<i>M.bovis</i>	232324244322
B-22	<i>M.bovis</i>	232324254222
B-23	<i>M.bovis</i>	232324254222
B-24	<i>M.bovis</i>	232324254223
B-25	<i>M.bovis subsp.caprae</i>	232324244223
B-26	<i>Unique</i>	232324254223
B-27	<i>M.bovis</i>	232324254322
B-28	<i>M.bovis</i>	232324254322
B-29	<i>M.bovis</i>	232324244222
B-30	<i>M.bovis</i>	232324254222
B-31	<i>M.bovis subsp.caprae</i>	232324254223
B-32	<i>M.bovis</i>	232324254322

Tablo 10: 42 *M. bovis* izolatının 12 lokus MIRU-VNTR tekrar sayısı ve oranları

MIRU-VNTR Bölgesi	Tekrar Kopya Sayıları ve Oranları
MIRU 2	2 (42/42)
MIRU 4	2(2/42), 3(40/42)
MIRU 10	2(42/42)
MIRU 16	3(42/42)
MIRU 20	2(42/42)
MIRU 23	4(42/42)
MIRU 24	2(42/42)
MIRU 26	4(8/42), 5(34/42)
MIRU 27	4(42/42)
MIRU 31	2(13/42), 3(20/42), 4(9/42)
MIRU 39	2(42/42)
MIRU 40	1(3/42), 2(26/42), 3(13/42)

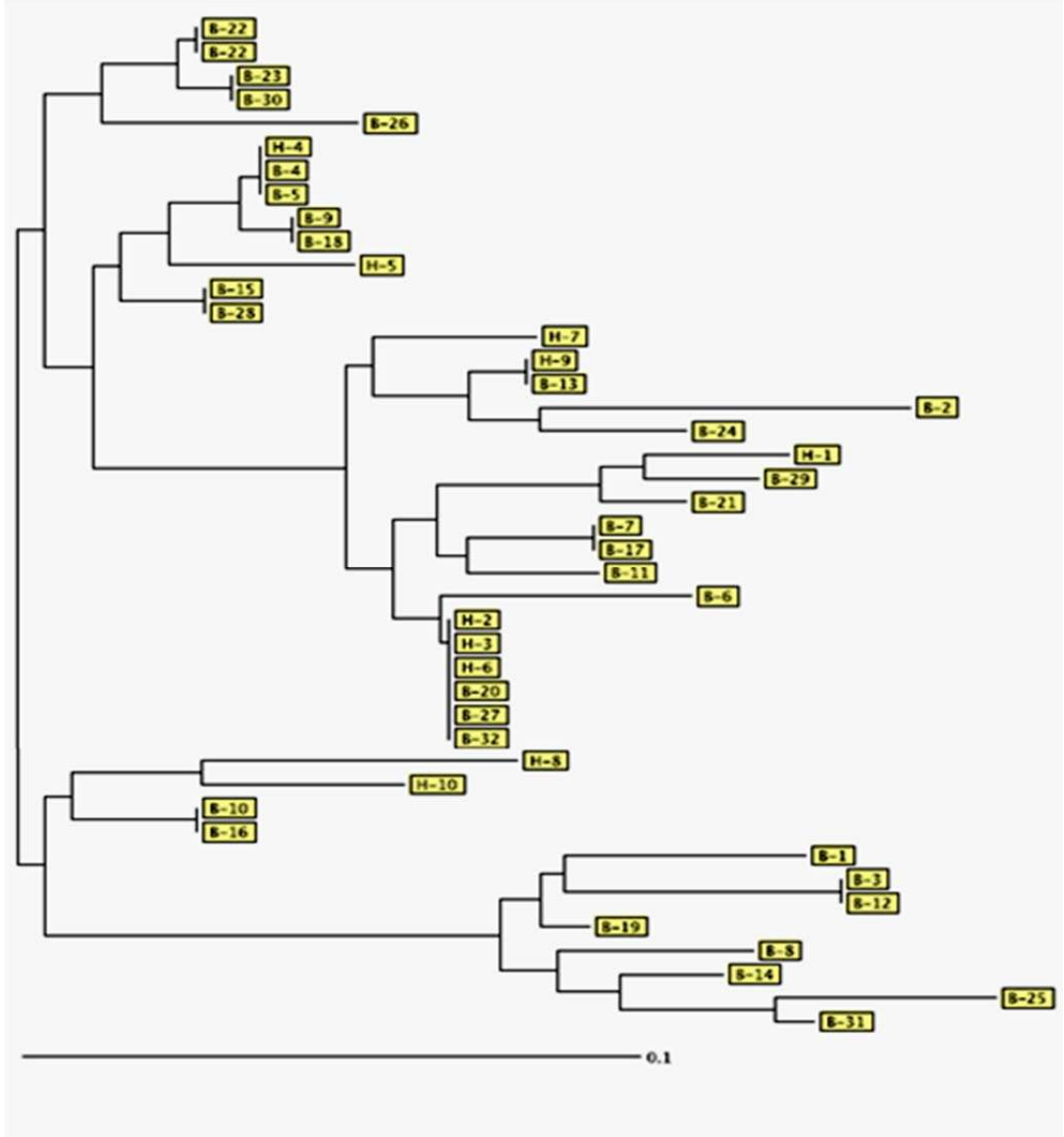
12 lokus MIRU-VNTR yöntemiyle elde edilen profiller dikkate alındığında MIRU4'ün ayırım gücünün zayıf olduğu ($0,01 < h < 0,11$) MIRU26, MIRU31 ve MIRU40'ın yüksek ayırım gücüne sahip olduğu ($0,25 < h$), diğer lokusların ayırım güçlerinin olmadığı (Tablo-11),

Tablo 11: 42 M.bovis izolatının 12 lokus MIRU-VNTR kopya sayıları ve ayırım güçleri

Kopya sayısı	MIRU											
	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
0												
1												3
2	42	2	42		42		42			13	42	26
3		40		42						20		13
4						42		8	42	9		
5								34				
6												
7												
8												
9												
10												
^h Allelic diversity	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,29	0,00	0,59	0,00	0,5

* $h = 1 - \sum x_i^2 / [n(n-1)]$ n: suş sayısı x_i : lokusdaki allelin tekrar sayısı

çalışmaya dahil edilen izolatların Spoligotyping ve 12 lokus MIRU-VNTR yöntemi ile klonal ilişki yönünden değerlendirilmesi sonucu izolatların sayısı 1-6 arasında değişen % 100 ilişkili 28 subgrup oluşturdıkları, bu gruplar içerisinde 18. kümenin 6 üye ile en büyük gen grubunu oluşturduğu, bunu 3 üyeli 4. kümenin izlediği, 17 izolatın da bağımsız, tek üyeli, kümelere dağıldıkları, hayvanlara ait suşlarla ortak aynı paterni gösteren 6 insan izolatı olduğu, dolayısıyla insan suşları ile hayvan suşlarının birbirleriyle direk ilişkili olduğu görülmüştür (Şekil-7).



Şekil 7: Çalışmada belirlenen supgruplar

5. TARTIŞMA

Sosyoekonomik şartlar ile ilişkili olarak görülme oranı artan ve tüm dünyada görülen ölümlerin en önemli nedenleri arasında sayılan tüberküloz hastalığı aşı uygulaması ve tedavide etkili ilaçların kullanılması da dahil alınan bütün kontrol tedbirlerine rağmen insan sağlığı açısından halen önemini korumaktadır. Bu tanı yöntemlerinin düşük duyarlılığı ve laboratuvar dönüşlerinin geç olması, tedaviye geç başlanması, yetersiz tedavi, tedavi uyumsuzlukları, hastanın laboratuara ve ilaca ulaşmadaki güçlükleri gibi sebepler ile izah edilmekte, tehdidin önüne geçilmesi için de tüberküloz etkenlerinin tanısında daha duyarlı ve özgül, hızlı sonuç veren ve ucuz yöntemlerin geliştirilmesi ve MTK basillerin toplum içerisindeki hareketlerini izleyecek moleküler düzeyde epidemiyolojik sonuçlar üretecek yöntemlerin geliştirilmesi gerektiği ileri sürülmektedir.

Özellikle konvansiyonel yöntemlerle tür düzeyinde tanımlanmayan *M. bovis* suşlarının epidemiyolojik özelliklerinin bilinmesi sadece hayvan tüberkülozu açısından değil, aynı zamanda insan tüberkülozu için de hayati öneme sahiptir. Buna karşılık hayvanlarda tüberkülozun kontrolünün ve eradikasyonunun ihmal edilmesi veya uygulanan programlarda yaşanan başarısızlıklar ile mikobakteriumlarla kontamine gıdaların insan tüketimine sunulması *M. bovis* enfeksiyonun insanlara aktarılmasına ve tüm dünyada halk sağlığı için önemli bir tehdit niteliği kazanmasına sebep olmuştur¹¹⁸. Günümüzde insan tüberkülozunun az görüldüğü ülkelerde sığır tüberkülozunun eradikasyonunun yapılmış olduğu veya ileri düzeyde kontrol edilmiş olduğu göz önünde tutulduğunda ülkemizde tüberkülozdan kaynaklanan ölümlerin ve tüberküloza bağlı ekonomik kayıpların azaltılması için *M. bovis*'in insan ve hayvan kökenli klinik izolatları arasındaki epidemiyolojik ilişkinin klonal düzeyde tespiti ve hayvanlarda etkili bir eradikasyon çalışmasının yapılmasının gerekliliği anlaşılmaktadır.

Son yıllarda geliştirilen moleküler yöntemler sayesinde tüberküloz salgınlarının orijini belirlenmekte, sığır tüberkülozunun kaynağından başlayarak bulaş yolları takip edilebilmekte ve hastalıkla mücadele için önemli ipuçlarına ulaşılabilmektedir. Bu çalışmada, Çukurova bölgesinde görülen insan ve sığır tüberkülozu olgularından izole edilen *M. bovis* suşlarının muhtemel ilişkilerinin

belirlenmesi için tüberkülozun moleküler epidemiyolojisinde sıklıkla kullanılan Spoligotyping ve 12 lokus MIRU-VNTR yöntemlerinin ayırım güçleri ve izolatlar arasındaki ilişkinin klonal derecesinin tespitindeki tanı değerlerinin belirlenmesi amaçlandı.

Yapılan bu çalışmada 5018 adet sığırdan kesim sonrası akciğer ve lenf nodlarında makroskobik olarak granülatöz pnömoni lezyonu olduğu düşünülen 95 hayvana ait doku örneklerinden 32 (% 0,63) tanesinde bakteriyolojik yöntemlerle *M. bovis* suşları izole edilmiştir. Bu oran Ortatatlı ve arkadaşlarının Konya’da ve Beytut’un Kars’ta yaptığı çalışmalarda belirledikleri oranlardan düşüktür^{81,147}. Bu sonuç çalışmamızda sadece *M. bovis* izolatlarının dikkate alınmasından kaynaklanabilir.

Sahraoui N. ve arkadaşları (2009) Cezayir’de kesilen 7250 hayvanın muayenesinde belirledikleri 260 granülatöz lezyondan kültür sonrasında izole ettikleri bakterilerin 88’inin (% 1.21) *M. bovis* olduğunu rapor etmişlerdir. Bu oran bizim oranımızdan daha yüksektir. Bu ülkelerin sosyo ekonomik düzeyi ve hayvanlarda uygulanan tüberküloz kontrol programlarının başarısı ile tüberküloz insidansı arasında negatif bir korelasyonun bulunduğunu doğrulamaktadır. Sahraoui N. ve arkadaşları elde ettikleri *M. bovis* suşlarını spoligotyping metodu ile genotipik özelliklerini değerlendirdikleri çalışmalarında 22 farklı küme belirleyerek elde ettikleri paternlerin % 89’unun daha önce Avrupa’daki sığırlardan elde edilen paternler olduğunu 1 hayvandan izole ettikleri *M. caprae* suşuna ait spoligotip paterninin ise veri tabanında bulunmayan SB1451 olduğunu bildirerek belirledikleri spoligo paternlerinin SB0120 (%40), SB0121 (%22), SB0134 (%7) ve SB0941 (%7) olduğunu rapor etmişlerdir¹⁴⁸. Biz çalışmamızda değerlendirdiğimiz sığır ve insan kökenli *M. bovis* izolatlarımızın spoligotyping yöntemine göre tür düzeyinde ayırımında suşların 6 küme içerisinde dağıldıklarını ve en büyük kümeyi % 42,85’lik bir oran ile SB0120/SIT482 tipinin oluşturduğunu tespit ettik. Bu her iki çalışmada da SB0120/SIT482 tipinin baskın ve hemen hemen aynı oranlara sahip olduğunu göstermektedir. Ancak bizim suşlarımızın ait olduğu diğer spoligotipler bu çalışmadaki bildirilen kalıplardan farklıdır (Tablo-8).

Sun ve arkadaşlarının (2011) Çin’de 6 farklı bölgede bulunan 40 ayrı işletmede beslenen 406 adet ineğe tüberküloz tanısı amacı ile intradermal comparative cervical tüberkülin (SICCT) ve γ interferon testi uyguladıktan sonra pozitif hayvanlardan izole ettikleri 135 adet *M. bovis* suşunu Spoligotyping ve MIRU-VNTR metodu ile

değerlendirdikleri çalışmalarında, izolatların 4 spoligotip kümesi, 7 MIRU-VNTR kümesi oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bu grup çalışmalarında hayvanların insan tüberkülozu insidansının artmasındaki rolüne vurgu yapar nitelikte çalışmada tüberküloz belirledikleri bir inekte hem *M. bovis*, hem de *M. tuberculosis* (beijing suşu) suşu identifiye ettiklerini rapor etmişlerdir¹⁴⁹. Biz de çalışmamızda her iki yöntemle yaptığımız değerlendirmede 42 izolatın spoligotipleme ile 6, MIRU-VNTR ile de 10 patern gösterdiklerini tespit ettik (Tablo-8, Tablo-10). Bizim çalışmamızdaki gerek spoligo gerekse MIRU-VNTR paternlerimiz bu çalışmada bildirilenden daha sınırlıdır. Bu durum Sun ve arkadaşlarının çalışmalarını değerlendirdikleri örnekleri Çin’de 6 farklı bölge ve 40 ayrı işletmeden toplamış olmaları, buna karşılık bizim izolatlarımızı sadece Çukurova bölgesinden izole etmiş olmamız ile izah edilebilir. Diğer taraftan bizim çalışmamızda değerlendirdiğimiz izolat sayısının azlığı da daha az sayıda patern elde etmiş olmamızı izah edebilir.

Bir diğer araştırmada Aranaz ve arkadaşları (1996) İspanya’da izole edilen 182 *M. bovis* suşunu spoligotyping yöntemi ile genotiplendirdikten sonra yaptıkları çalışmalarında sığırlardan elde edilen *M. bovis* suşlarına ait spoligotyping paternleri ile vahşi ayı ve geyiklerden elde edilen *M. bovis* suşlarının spoligotyping paternlerinin aynı olduğunu, bu benzerliğin hastalığın bulaşmasında ve yayılmasında yabani hayvanların rollerini ortaya koyduğunu bildirmişlerdir. Aranaz ve arkadaşları inceledikleri 182 *M. bovis* izolatında 24 farklı spoligo kümesi belirlerken hepsinde de 39-43 spacerların olmadığını, sığırlardan izole ettikleri 129 izolatta 18 farklı spoligo paterni olduğunu ve 3, 9 ve 16. spacerların bulunmadığını bildirmişlerdir. Sığırlarda spb-7 (59 izolat), ardından spb-3 ve spb-13’ün en yaygın spoligotyping paterni olduğunu belirtmişlerdir⁵³. Biz çalışmamızda sadece sığır ve insan kökenli *M. bovis* suşlarının spoligotipleme ve MIRU-VNTR yöntemleri ile klonal ilişkilerini sorguladık. Bizim örnek sayımıza paralel olarak spoligotip patern sayımız Aranaz ve arkadaşlarının patern sayısından daha azdı. Ancak spoligo ve VNTR paternlerinin çapraz sorulanması sonunda, ki bu suşlar arasındaki genotipik veya klonal ilişkinin daha ince ayrıntılandırılarak irdelenmesini sağlamayı amaçlamıştır, izolatların %100 uyumluluk gösteren 28 farklı patern sergilediği görülmüştür (Şekil-7). Bu bizim 42 test izolatımızın, kullandığımız ve günümüzde birlikte kullanılmaları halinde daha yüksek ayırım gücü gösterdiği belirtilen iki yöntemin ortak sonucu olarak, 28 farklı kaynaktan köken alan suşlar oldukları

görülmektedir. Bu gerçek patern sayımız Aranaz ve arkadaşlarının bazı lokusların bulunup bulunmaması ile elde etmeye çalıştıkları ayırım gücüne dayalı sonuçlarına göre daha rasyonel bir sonuç olarak değerlendirilebilir.

Munyeme M. ve arkadaşları (2009) inceledikleri 695 sığır karkasından aldıkları tüberküloz şüpheli 98 örnekten elde ettikleri 33 kültürde ARB pozitifliği belirlemişler ve bu kültürlerin 31 tanesinin Spoligotyping yöntemiyle yorumlanabilir profil gösterdiğini ve bu paternlerin 10 farklı küme oluşturduğunu belirtmişler. Elde ettikleri paternlerin içinde SB0120 paterninin en yüksek oranda bulunduğu, SB0871 paterninin ise ikinci yoğunlukta görülen spoligotyping paterni olduğunu rapor etmişlerdir⁵⁴. Bu grubun örnek sayısı bizim örnek sayımıza yakındır. Ancak spoligopatern sayıları bizden fazladır. Bu, örneklerin alındığı hayvanların yaşadığı coğrafi bölgenin genişliği, yöntemin uygulanış farklılıkları gibi sebeplerle izah edilebilir. Ancak bu grubun da en sık karşılaştığı paternin, bizim ve Sahraoui N. ve arkadaşlarının bildirdiği, SB0120 paterni olması bu paternin tüm dünyada baskın suşları tanımladığı şeklinde yorumlanabilir.

Tadayon ve arkadaşları (2006) Azerbeycan'da 140 bufalo ve 18 sığıra ait örneklerden izole ettikleri 1 bufalo ve 11 sığıra ait *M. bovis* izolatına spoligotyping ve MIRU-VNTR yöntemi ile yaptıkları genotiplendirmede 4 spoligotip ve 5 MIRU-VNTR profili elde ettiklerini bildirmişlerdir¹⁵⁰. Bu grubun örnek sayısı ve kaynakları bizden az ve farklı olmakla beraber spoligo ve VNTR paternleri de azdır. Bu sonuç bizden daha fazla sayıda örnek değerlendiren Sahraoui N., Sun ve arkadaşları ile Aranaz ve arkadaşlarının neden daha çok sayıda patern gördüklerine dair örnek sayısı ile paralellik gösteren patern sayısı hakkındaki ön görüşümü desteklemektedir.

Ülkemizde sığırlardan izole edilen *M. bovis* suşlarının spoligotip paternlerini belirlemeye yönelik ilk çalışma Yardımcı H. ve arkadaşları (2007) tarafından Ankara ve çevresindeki mezbahalarda kesilen sığırlardan alınan lenf yumrusu örneklerinden izole edilen suşlar üzerinde yapılmıştır. Yardımcı H. ve arkadaşları bu çalışmalarında 36 lenf yumrusu örneğinden 9 *M. bovis* DNA'sını PCR ile amplifiye ettiklerini ve elde ettikleri bu 9 PCR ürününü mikropleytlere bağladıkları 43 farklı oligonükleotid ile hibridize ederek 3 farklı spoligotip paterni elde ettiklerini rapor etmişler ve bu paternleri ANK 1, ANK 2 ve ANK 3 olarak isimlendirmişlerdir¹². Bu grubun örnek sayısının azlığı

yöntemin standardizasyonunun tartışılabilirliği ve değerlendirmede herhangi bir veri tabanı kullanmamış olmaları sonuçlarını tartışılabilirlikten uzaklaştırmaktadır.

İtalya'nın Tuscany bölgesinde çalışan Lari ve arkadaşları (2011) 1990 ve 2009 yılları arasında insanlarda görülen tüberküloz olgularından izole edilen 9 tanesi *M. bovis* BCG, 37 tanesi *M. bovis*, 1 tanesi de *M. bovis subs. caprae* olmak üzere 47 adet *M. bovis* suşuna spoligotyping ile yaptıkları genotiplendirmede 15 unique profil elde ettiklerini isimlendirilen spoligotip paternlerinin ise % 68'inin SB0120 paterni olduğunu rapor etmişlerdir¹⁵¹. Bizim çalışmamızda insan kökenli suş sayımız 10 idi. Ancak *M. bovis* BCG olarak tanımlanan iki suşun da insan kökenli olması, insan kökenli *M. bovis* suşlarından 6 (%60)'sının (Tablo-7) Lari ve arkadaşlarınca %68 olarak bildirilen SB0120 paterni ile aynı olması hem *M. bovis* BCG-insan tüberkülozu arasındaki ilişki, hem de SB0120 paterninin yaygınlığının vurgulanması açısından dikkat çekicidir.

Mignard ve arkadaşları da (2006) Fransa'da insan kökenli *M. bovis* suşlarını değerlendirdikleri çalışmalarında, bTB'nin prevelansının son 10 yıl içerisinde % 0,5'den % 2'ye 4 kat arttığını belirterek, pirazinamidaz direncini belirleyen ***pncA*** genini kullanarak moleküler yöntemle identifiye ettikleri 13 *M. bovis* suşunun spoligotyping yöntemi ile genotiplendirmişlerdir. Bu grup test izolatlarının spoligotipleme ile 4, 12 lokus MIRU-VNTR yöntemi ile de 12 farklı paterne dağıldıklarını rapor etmişlerdir¹.

Roddwel ve arkadaşları (2010) Kaliforniya'da insanlardan izole edilen *M. bovis* suşları ile Meksika ve Amerika'da hayvanlardan izole edilen *M. bovis* suşlarını spoligotyping yöntemi ile yaptıkları genotiplendirme çalışmasında 106 insan *M. bovis* izolatında 12 spoligotip, 496 Meksika sığırı ve 219 Amerika sığırına ait *M. bovis* izolatında ise 126 spoligotip elde ettiklerini ve insanlarda belirledikleri spoligotip paterninin % 91'inin Meksika sığırı ile aynı olduğunu bildirmişlerdir. SB0673 ve SB0140 paterninin insanlarda % 3,8 oranında, Amerika'daki sığırlarda % 45, Meksika'daki sığırlarda % 31 oranında bulunduğunu rapor etmişlerdir¹⁶. Bizim çalışmamızda bu grup ile tartışılacak ortak bulgu gerek insan gerekse sığır kökenli izolatlarda gösterilen SB0140 spoligo paternidir. Ancak bizim 3'ü insan 8'i hayvan kökenli olmak üzere toplam 11 (% 26.19) izolatımızın bu paterni göstermesine karşılık Roddwel ve arkadaşlarının çalışmalarında bu patern insan izolatlarında % 3.8 gibi daha düşük bir oranda, hayvanlarda % 31-45 gibi daha yüksek bir oranda göstermiş olması

bu paterne sahip izolatların aslında hayvanlarda daha yüksek oranlarda olmalarına karşılık insanlara geçiş veya insanlarda enfeksiyon oluşturma yeteneklerinin gerçekten daha düşük olması şeklinde yorumlanabilir.

Belçika’da 1995-2003 yılları arasında 77 farklı çiftlikten izole edilen 127 *M. bovis* suşu ile Allix ve arkadaşlarının (2006) yaptıkları genotiplendirmede 29 lokus MIRU-VNTR metodu ile 32 farklı patern, IS6110-RFLP metodu ile 16 farklı patern, Spoligotyping metodu ile 17 farklı patern belirlediklerini rapor ettikleri çalışmalarında MIRU-VNTR yönteminin IS6110 RFLP metoduna kıyasla daha hızlı ve kolay tekrar edilebilir bir yöntem olduğunu vurgulamışlardır¹¹⁶. Bu çalışmada daha geniş bir alandan ve daha çok sayıda örnek toplanmış olup, elde edilen spoligo patern sayısı ile VNTR patern sayıları doğal olarak bizim çalışmamızdan fazladır. Bu örnek sayısı kadar çalışılan bölgenin suş/genetik zenginliğine uygun bir sonuçtur. Biz IS6110 RFLP yönteminin klonal düzeyde ayırım yeteneğinin tartışmalı olmasını dikkate alarak bu yöntemi kullanmamıştık. Nitekim bu grup ta sonuç olarak MIRU-VNTR’ın RFLP’ye karşı bilinen avantajlarına vurgu yapmışlardır.

Sola ve arkadaşları (2003) 11 farklı orjinden elde ettikleri 116 MTK (103 *M. tuberculosis*, 4 *M. bovis*, 1 *M. canetti*, 7 *M. africanum*) izolatında 79 farklı MIRU-VNTR profili bulduklarını bildirmişlerdir. MIRU10, MIRU23, MIRU26, MIRU31 ve MIRU40’ın ayırım gücünün yüksek olduğunu, MIRU4, MIRU16, MIRU24, MIRU39’un orta düzeyde ayırım gücüne sahip olduğunu ve MIRU2, MIRU20, MIRU27’nin ise zayıf ayırım gücüne sahip olduğunu belirlemişlerdir⁷⁵. Bu araştırmacı grubu MTK üyelerini ağırlıklı olarak da *M. tuberculosis* izolatlarını değerlendirdikleri çalışmalarında doğal olarak oldukça farklı sayıda MIRU-VNTR paterni elde etmişlerdir. Bu grup bizimle benzer olarak (Tablo-10) MIRU40 MIRU31 ve MIRU26 lokuslarının yüksek, MIRU4 lokusunu da orta derecede ayırım gücüne sahip lokuslar olduklarını bildirmişlerdir¹⁵².

Jeon ve arkadaşları (2008) Kore’de granülamatöz lezyonları olan sığırlardan izole ettikleri 59 adet *M. bovis* izolatında 12 MIRU, 3 ETR (A,B,C), 7 QUB (11a, 11b, 18,26,1895,3232,3336), 2 VNTR (0424,1955) bölgesini kullanarak yaptıkları moleküler çalışmada, çalıştıkları bu bölgelerden 10 tanesinin [MIRU(26,31), ETR(A,B), QUB(18-26-1895-3232-3336) ve VNTR (0424)] genetik polimorfizm gösterdiğini ve bu bölgelerle 12 farklı VNTR profili elde ettiklerini belirtmişlerdir. En yüksek ayırım gücünü QUB3336 lokusunun gösterdiğini (h:0,64), QUB 26 ve MIRU 31’in de yüksek

ayırım gücüne sahip lokus özelliği taşıdığını belirtmişlerdir ($h:0,35$). Çalışılan lokuslardan 4'ünün (MIRU26, ETR B, QUB 1895, VNTR 0424) düşük ayırım gücüne sahip olduğunu ($h: 0,02-0,05$) ve tüm 12 lokus MIRU bölgesi çalışıldığında 3 farklı patern belirlediklerini belirtmişlerdir¹¹⁰. Hilt ve arkadaşları (2005) 12 lokus MIRU, 3 ETR bölgesi ve VNTR 3232'nin ayırım gücünü değerlendirdikleri çalışmada ETR-A,B,C, MIRU26 ve MIRU27'nin yüksek düzeyde polimorfik olduğunu ($h > 0.25$), MIRU4 ve VNTR3232 lokusunun ayırım gücünün orta düzeyde olduğunu ($0.11 < h < 0.25$), MIRU16, MIRU20 ve MIRU31'in zayıf ayırım gücüne ($0.01 < h < 0.11$) sahip olduğunu, MIRU2, MIRU10, MIRU23, MIRU24, MIRU39 ve MIRU40'ın ise hiç polimorfizm göstermediğini belirlemişlerdir¹¹⁹. Duarte ve arkadaşları (2009) 181 *M. bovis* ve *M. bovis subsp.caprae* suşuna uyguladıkları spoligotiping genotiplendirmede 12 küme belirlemiş ve aynı suşlara uyguladıkları 8 lokus MIRU-VNTR yönteminde 87 farklı profil elde ederek VNTR3232, QUB11a, ETR-B, ETR-A lokuslarının en yüksek ayırım gücüne sahip olduğunu bildirmişlerdir ($h: 0,96$)¹⁵³. Yöntemlerin kullanılmasında tecrübe ve alt yapı da belirleyicidir. Biz bu çalışmada ETR bölgelerini dikkate almadık, ancak elde ettiğimiz profilin klonal ilişkinin düzeyinin tespitinde kabul görmüş ve kullanılan bir kombinasyon olduğunu biliyoruz.

Asgharzadeh M. ve arkadaşları (2011) Kuzeybatı İran'da Mart 2004-Mart 2005 yıllarında izole edilen insan kaynaklı 154 kültür (+) tüberküloz örneklerinde IS6110 RFLP, 12 lokus MIRU-VNTR, ETR-VNTR yöntemi ile genotiplendirmesini yapmışlar ve 12 lokus MIRU-VNTR yönteminde 21 küme, 116 farklı patern, 95 unique patern elde ettiklerini ve en geniş kümenin 9 izolattan oluştuğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada MIRU10, MIRU26 ve MIRU40'ın yüksek ayırım gücü olduğunu belirlemişlerdir. MIRU-VNTR yöntemi ile ETR-VNTR yönteminin kombinasyonunda 22 küme elde etmişler ve elde ettikleri % 9,74'lük orana sahip *M. bovis* izolatlarının % 10'unun ekstrapulmoner hastalara ait olduğunu ve özellikle kırsal kesimde yaşayan pastörize edilmeyen süt ürünleri tüketen kişilerden izole edilmiş olmasının ilgi çekici olduğunu bildirmişlerdir¹⁵⁴. Bu çalışmada da bizimle farklı yöntemlerin kullanılmış olmasına karşılık MIRU-VNTR ile en yüksek ayırım gücüne sahip MIRU lokuslarının MIRU26 ve MIRU40 olarak bulunmuş olması bizim ve benzer çalışmalarda elde edilen sonuçların tekrarı niteliğindedir.

Güney Amerika’da bulunan ülkelerden elde edilen sığır kaynaklı 224 *M. bovis* izolatını spoligotyping yöntemi ile genotiplendiren Zuma ve arkadaşları (1999) 41 farklı spoligotip paterni belirlemişler ve izolatların 202 tanesinin (% 90) 19 farklı küme oluşturduğunu ve en geniş kümede 96 izolat bulunduğunu, en yaygın paternin spoligotip 34 olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar insan kaynaklı 19 *M. bovis* izolatının spoligotiplendirmesi sonucunda elde ettikleri spoligotipin sığırlarda en fazla belirlenen spoligotip 34 paterni olduğunu rapor etmişlerdir. Zuma ve arkadaşları (1999) çalışmada inceledikleri izolatların 154 tanesini spoligotyping yöntemi ile RFLP (PGRS problemleri ile) yönteminin karşılaştırılması için kullanmış ve spoligotyping yönteminde 31 farklı patern, RFLP yönteminde 42 farklı patern, iki yöntemin aynı anda kullanılmasında ise 88 farklı patern elde ettiklerini rapor etmişlerdir¹⁵⁵. Araştırmacılar RFLP yönteminde daha fazla patern elde etmelerine rağmen spoligotyping metodunun uygulanmasının ve sonuçların değerlendirilmesinin daha kolay olmasından dolayı, *M. bovis* izolatlarını tiplendirmek amacıyla ilk olarak spoligotyping yönteminin kullanılmasının uygun olacağını kaydetmişlerdir. Bu grup sadece hayvan kökenli ve oldukça farklı ve geniş bir coğrafyaya yayılmış popülasyondan elde ettikleri suşların spoligo ve RFLP paternlerini değerlendirdikleri çalışmalarında belirgin birkaç paternin baskın olduğunu ima etmişler ancak standart tiplendirme kalıbını kullanmadıkları için elde ettikleri sonuçların bizim sonucumuz ile kıyaslanması mümkün olmamıştır. Ancak bu grup çalışmalarında kullanmış olmalarına rağmen RFLP yönteminin bu amaca yönelik olarak kullanılmasının sakıncalarından buna karşılık spoligo tiplemenin avantajlarından bahsetmişlerdir.

Cowan ve arkadaşları (2002) 180 MTK’ya ait (70’i *M. tuberculosis*, diğerleri *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. canetti* ve *M. microti*) suşlarının 12 lokus MIRU-VNTR sonuçlarını IS6110 RFLP ve spoligotyping metodu ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırmak için yaptıkları çalışmada; MIRU-VNTR yöntemi ile içerisinde 120 izolatın bulunduğu 20 küme, 60 tek üyeli küme ve toplam 80 farklı patern, IS6110-RFLP yöntemi ile içerisinde 2-64 arasında değişen sayıda bulunan 142 izolatın bulunduğu 20 küme ve 38 tek üyeli küme ve toplam 58 farklı patern ve spoligotyping yöntemi ile içerisinde 137 izolatın bulunduğu 16 küme, 43 tek üyeli küme ve toplam 59 farklı patern elde etmişlerdir. Bu 3 yöntemi kombine ettikleri çalışmada ise içerisinde 90 izolatın bulunduğu 22 küme, 90 unique profil ve toplam 112 farklı patern elde

etmişlerdir. Spoligotyping ve MIRU-VNTR metodların birlikte kullandıkları çalışmada ise, içerisinde 103 izolatın bulunduğu 22 küme, 77 unique profil ve toplam 99 farklı patern elde etmişlerdir¹⁵⁶. Bu grubun çok fazla sayıda MIRU-VNTR ve RFLP kalıbı elde etmiş olmaları MTK içerisinde farklı türleri değerlendirmiş olmalarından kaynaklanmaktadır. Böyle bir çalışmanın aslında yöntemin yapılabilirliğini test etme dışında epidemiyolojik bir kazanç sağlaması da beklenemez. Tür farklı olunca genetik klonal ilişkinin benzer çıkması zaten mümkün olmayacaktır.

Yapılan bu çalışmada incelenen 42 *M. bovis* izolatının spoligotyping yöntemi ile klonal grup dağılımı incelendiğinde 40 suşun (%95,2) 4 küme içerisinde yoğunlaştığı, tüm *M. bovis* BCG suşlarının da içerisinde bulunduğu ve % 42,85 (18 izolat) oranı ile birinci sırada olan spoligotip paterninin SB0120 olduğu belirlenmiştir. İkinci sıklıkta görülen spoligotip paterni SB0140 olup, 11 izolat (%26,19) içerdiği, üçüncü sırada 7 izolat içeren (%16,66) SB0418 spoligopaternalinin yer aldığı ve son olarak dördüncü sırada ise 4 izolat (%9,52) içeren SB0288 spoligopaternalinin olduğu belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen spoligo paternlerinden SB0120 paterni yukarıda verilen çalışmalarda da olduğu gibi en fazla belirlenen spoligo paterni olmuştur. Benzer şekilde elde edilen diğer paternlerin görülme oranları da literatürle uyumludur. Elde edilen 2 suşun (%4,76) ise çalışmada kullanılan veri tabanlarındaki suşlarla karşılaştırılması sonucunda bilinen hiçbir kümeye uymayan orphan suşlar oldukları görülmüştür.

Oral Zeytinli Ü. ve Köksal F.'nin (2010) Çukurova Bölgesindeki akciğer tüberkülozlu hastalardan alınan balgam, bronkoalveoler lavaj ve biyopsi materyallerinden izole ederek MTK olarak tanımladıkları 467 izolata spoligotyping ve 12 lokus MIRU-VNTR yöntemi uyguladıkları çalışmada; Spoligotiplendirme yöntemiyle 443 izolatın 21 küme içerisinde yoğunlaştığını, en büyük kümeyi 239 üyeye sahip T1 ailesinin oluşturduğu ve bu izolatlardan 2 tanesinin de *M. bovis* (*Bovis*1) olduğunu (%0,4) bildirmişlerdir³².

Aslan ve arkadaşları (2010) 4 aylıktan itibaren tekrar eden alt solunum yolu enfeksiyon şikayeti olan 1 yaşındaki erkek bir hastaya ait dışkı örneğininin kültürünün 38. gününde ARB üremesi gözlemlediklerini biyokimyasal testler (PNB besi yerinde ürememe, Niasin test negatifliği, nitrat redüksiyon test negatifliği) ve spoligotyping genotiplendirilmesi sonrasında *M. bovis* BCG identifikasyonu yapıldığını, ancak

hastanın sonucun bildirilmesinden 2 hafta önce öldüğünü rapor ettikleri olgu sunumunda hızlı tanı stratejilerinin uygulanması gerekliliğine vurgu yapmışlardır¹⁵⁷.

Bu tez çalışmasında 12 lokus MIRU-VNTR yöntemiyle yapılan genotiplendirmede elde edilen MIRU2, MIRU10, MIRU16, MIRU20, MIRU23, MIRU24, MIRU27 ve MIRU39'un kopya sayılarında farkın ve ayırım gücünün olmadığı yönündeki bulgu Hilty ve arkadaşlarının¹¹⁹ bildirdiği MIRU24, MIRU39 lokuslarının ayırım gücünün olmadığı yönündeki bulguyla paraleldir ancak bu çalışmada yüksek düzeyde ayırım gücüne sahip olduğu değerlendirilen MIRU40 lokusu Hilty ve ark tarafından ayırım gücü olmayan lokuslar arasında bildirilmiştir. Çalışmada yüksek ayırım gücüne sahip olduğu (h:0,07 ve h:0,29 sırayla) belirlenen MIRU26'nın Sola ve arkadaşları da yüksek ayırım gücüne sahip olduğunu bildirmişlerdir¹⁵². MIRU31 ve MIRU40'ın yüksek düzeyde ayırım gücüne sahip olduğu (h:0,59 ve h:0,5 sırayla) şeklindeki bulgumuz Sola ve arkadaşları tarafından aynı lokuslar için orta düzeyde ayırım gücüne sahip olarak bildirilmiştir. 12 lokus MIRU-VNTR metodunun Spoligotyping metodu ile kombinasyonu sonucunda 40 izolat içeren 4 küme alt kümelere bölünmüş ve izolat sayısı 1-6 arasında değişen 28 subgruba ayrılmıştır. Çalışmada spoligotyping metodunun ayırım gücünün MIRU -VNTR ile kombinasyonu ile artmış olması yukarda verilen literatürler ile benzerlik göstermektedir.

Ülkemizde insan ve hayvanlardan izole edilen *M. bovis* izolatları ile yapılan genotiplendirme çalışmalarının sonuçlarına bakıldığında, yapılan çalışmalarda elde edilen bulguların uluslar arası veri tabanları ile kıyaslanmadığı ya da bu çalışmalarda bulunan paternlerin taranan veri tabanlarına kaydedilmediği görülmektedir. Yapılan bu tez çalışması ile Çukurova bölgesinde bulunan bTB'lu insan ve hayvanlardan izole edilen *M. bovis* suşları spoligotyping ve 12 lokus MIRU-VNTR yöntemiyle genotiplendirilerek ülkemizde insan ve hayvanlarda en sık görülen paternin SB0120 olduğu ve bu suşun da Avrupa ülkelerinde oldukça yaygın bir şekilde görüldüğü belirlenmiştir. Çalışmada insanlardan elde edilen diğer paternlerin de birbirlerine oldukça benzer olması dikkat çekmiştir. Ayrıca hayvanlardan elde edilen suşların içerisinde *M. bovis subsp.caprea*'nın bulunması tüberküloz kontrol programları hazırlanırken bu suşun da göz önünde bulundurulması gerektiğini ortaya koymaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında Çukurova bölgesinde bulunan mezbahalarda kesilen ve kesim sonrası granülamatöz pnömoni tespit edilen 95 adet hayvana ait örneklerden konvansiyonel yöntemlerle *M. bovis* olarak tanımlanan 32 adet izolat ile bölgemizde bulunan tüberküloz hastalarından izole edilen 10 adet *M. bovis* izolatının moleküler epidemiyolojik özellikleri spoligotyping ve 12 lokus MIRU-VNTR yöntemi ile belirlenerek değerlendirilmiştir.

Değerlendirme sonucunda;

- a) Sığır tüberkülozu vakalarında ülkemizde ilk kez Sayın (2011) tarafından bildirilen *M. bovis subsp. caprea* suşunun bu çalışmada da 7 inekte % 16.66 oranında belirlenmiş olması sığır tüberkülozuna ait kontrol programları hazırlanırken *M. bovis subsp. caprea*'nın da mutlaka göz önünde tutulması gerektiğini göstermiştir.
- b) İnsan ve hayvanlardan izole edilen suşlar içerisinde en fazla BCG suşunu da içerisine alan % 42.85 oranında SB0120 paternini gösteren *M. bovis* suşunun olduğu belirlenmiştir.
- c) Spoligotyping yöntemi ile suşların % 95.23'ünün tanımlanmasına karşılık 2 tanesinin (% 4.76) tiplendirilemediği ve suşların daha önce tanımlanmamış bölgesel suşlar olabilecekleri var sayılarak ileri identifikasyon için dizi analizi yöntemi ile yeniden değerlendirilmelerinin uygun olacağı düşünülmüştür.
- d) MIRU-VNTR'ın Spoligotyping yöntemine göre daha yüksek ayırım gücüne sahip olduğu ve spoligotipleme ile elde edilen grupları kendi içerisinde alt gruplara böldüğü anlaşılmıştır.
- e) Spoligotiplemenin MIRU-VNTR yöntemine kıyasla daha kolay ve tekrarlanabilir olduğu, bu özelliği ile korunma ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesi ve uygulanan stratejilerin başarılarını ölçmede yararlı olabileceği, MIRU-VNTR ile kombine edilmeleri halinde epidemiyolojik yönden daha detaylı ancak küçük ölçekli projeksiyonların yapılmasına imkân sağlayacağı düşünülmüştür.

h) Mikobakteriumların zoonoz olması ve resmi verilerin aksine sığır tüberküloz prevalansının oldukça yüksek olması (%21,8-%35,7) sebebi ile insan tüberkülozu ile mücadele ve sığır tüberkülozundan kaynaklanan ekonomik kayıpları azaltabilmek için eradikasyon çalışmalarına daha fazla önem verilmesi, insan tüberküloz vakalarında *M. bovis* alt türlerinin izolasyon ve identifikasyonunun göz ardı edilmemesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. **Mignard S, Pichat C, Carret G:** *Mycobacterium bovis* infection, Lyon, France, *Emerg Infect Dis.*, **2006**; 12(9):1431-3.
2. **Önen ZP, Karahan ZC, Yıldız ÖA, Karabıyıklıoğlu G.** *Mycobacterium simiae* infection in an immunocompetent patient, with DNA analyses verification. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, **2010**; 58(3):306-310.
3. **Jenkins AO, Cadmus SIB, Venter EH, Pourcel C , Hauk Y , Vergnaud G, Godfroid J.** Molecular epidemiology of human and animal tuberculosis in Ibadan, Southwestern Nigeria. *Veterinary Microbiology*, **2011**; 151:139-147
4. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html, Erişim tarih: 4 Aralık 2009
5. **Keating LA, Wheeler PR, Mansoor H et al:** The pyruvate requirement of some members of the *Mycobacterium tuberculosis complex* is due to an inactive pyruvate kinase: implications for in vivo growth, *Mol Microbiol.*, **2005**; 56(1):163-74.
6. **Ritz N, Hanekom WA, Robins-Browne R, Britton WJ, Curtis N.** Influence of BCG vaccine strain on the immune response and protection against tuberculosis, *FEMS Microbiol Rev.*, **2008**; 32(5):821-41.
7. **Özbey G, Kalender H, Muz A.** Sığır Tüberkülozu'nun Epidemiyolojisi ve Teşhisi. Derleme. *F.Ü. Sağ. Bil. Derg.*, **2008**; 22 (5): 307-314.
8. **Collins DM.** Advances in molecular diagnostics for *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology*, **2011**; 151: 2-7.
9. **Wei CY, Hsu YH, Chou WJ, Lee CP, Tsao WL.** 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.*, **2004**; 20(6):302-7.
10. **Rua-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen. KH, Clifton- Hadley RS.** Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science*, **2006**; 81 (2): 190-210.
11. **Aslan G, Kuyucu N, Çalıkoğlu M, Ersöz G, Ülger M, Günal S, Emekdaş G.** *Mycobacterium bovis*'in etken olduğu Tüberküloz Olguları. *ANKEM Derg*, **2009**; 23(04):182-187.
12. **Yardımcı H, Ünal CB, Ataseven L, Sarıeyyüpoğlu B.** Sığır tüberkülozunun PCR ile tanısı ve *Mycobacterium bovis*'in spoligotiplendirme yöntemi ile genotiplendirilmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* **2007**; 54: 183-189.
13. **Çavuşoğlu C, Akıncı P, Söyler İ, Bayram N, Vardar F.** Yaygın *Mycobacterium Bovis BCG* Enfeksiyonunun Laboratuvar Tanısı. *İnfeksiyon Dergisi*, **2007**; 21 (1):39-44.
14. **Baker MG, Lopez LD, Cannon MC, De Lisle GW, Collins DM.** Continuing *Mycobacterium bovis* transmission from animals to humans in New Zealand. *Epidemiol Infect*, **2006**; 134(5):1068-73.

15. **Lari N, Rindi L, Bonanni D, Tortoli E, Garzelli C.** Molecular analysis of clinical isolates of *Mycobacterium bovis* recovered from humans in Italy. *J Clin Microbiol.*,**2006**; 44(11):4218-21.
16. **Rodwell TC, Kapasi AJ, Moore M, Milian-Suazo F, Harris B, Guerrero LP, Moser K, Strathdee SA, Garfein RS.** Tacing The Origins of *Mycobacterium bovis* tuberculosis in Humans in the USA to Cattle in Mexico Using Spoligotyping. *International Journal of Infectious Diseases*, **2010**; 14:129-135.
17. **Durupınar B,** Mikobakteriler ve çevre koşullarına dayanıklılıkları, *O.M.Ü. Tıp Dergisi*, **1996**; 13(4): 297-304.
18. **Erkan L.**Tüberkülozun tarihçesi, Ülkemiz ve dünyadaki durumu.**1996**; 13(4): 291-294.
19. Tüberküloz Ders Notları. Çukurova Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.**2008**
20. **Sabar İ.R.** Tüberküloz tarihçesi. Kemal Matbaası, İstanbul, **1956**.
21. **Aceves-Avila FJ, Baez-Molgado S, Medina F, Fraga A.** Paleopathology in osseous remains from 6 th century. A Survey of rheumatologic diseases. *J.Rheumatol*, **1998**; 4: 776.
22. **Barış İY.** Çağlar Boyu Tüberküloz. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. *Ofset Basım*, Samsun: **2003**; 1-7.
23. **Kaufmann SH, Baumann S, Nasser Eddine A.** Exploiting immunology and molecular genetics for rational vaccine design against tuberculosis. *Tuberculosis and Lung Disease*, **2006**;10(10):1068-1079.
24. **Sakula A.** BCG: Who were Calmette and Guérin? *Thorax* ,**1983**; 38: 806-12.
25. **Pereira SM, Dantas OMS, Ximenes R, Barreto ML.** BCG vaccine against tuberculosis: its protective effect and vaccination policies. *Rev Saude Publica*, **2007**; 41:59-66.
26. **Köksal F, Yaman A.** Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. *21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu*, Samsun. **2003**; 34-47.
27. **Panchal S, Kulshrestha S, Khublani T.** A Review On Tb And Its Advance Diagnostic Techniques.*International Journal of Pharma and Bio Sciences*,**2011**; 535-545.
28. **Burgos MV, Pym AS.** Molecular epidemiology of tuberculosis. *Eur Respir J*, **2002**; 36:54–65.
29. **Karboul A, Gey van Pittius NC, Namouchi A, et al.** Insights into the evolutionary history of tubercle bacilli as disclosed by genetic rearrangements within a PE-PGRS duplicated gene pair. *BMC Evol Biol.*, **2006**; 6:107.
30. **Yardımcı H.** *Mycobacterium* enfeksiyonları. In: Aydın N ve Paracıkoğlu J, Edit. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). 1. Baskı. Ankara. İlke-Emek Matbacılık ve Yayıncılık. **2006**.
31. **Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L , Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG.** The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. www.pnas.org , **2003**; 100:7877-7882.
32. **Oral Zeytinli Ü.** Çukurova Bölgesinde Akciğer Tüberkülozlu Hastalardan İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Spoligotyping ve MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number of Tandem Repeat) Yöntemiyle Tiplendirilmesi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Uzmanlık Tezi, Adana, **2010**.

33. **Esen N.** Tüberküozda Mikobakteriyel Persistans Mekanizmaları. 4.Tüberküöz Sempozyumu Kitabı, Malatya, **2005**;58-64.
34. **Santo AH.** Deaths attributed to multiple causes and involving tuberculosis in the state of Rio de Janeiro Brazil between 1999 and 2001. *J Bras Pneumol.* **2006**; 32(6):544-52.
35. **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 U S A.*, **2002**; 99(6): 3684-9.
36. **Koneman EW, Winn WC ve ark.** Mycobacteria. Konemans Colar Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Sixth Edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. **2006**; 1066-1124.
37. **Palomino JC, Leão SC, Ritacco V.** Tuberculosis **2007**.
38. **Runyon E.H.** *Mycobacterium intracellulare*, relationship of atypical acid fast bacilli to human disease. *American Review of Respiratory Disease*, **1967**; 95: 861-867.
39. **Woods GL, Washington JA.** *Mycobacteria* other than *Mycobacterium tuberculosis*: review of microbiologic and clinical aspects. *Rev Infect Dis.*, **1987**; 79:275-9.
40. **Peterson R.** Molecular Epidemiology of Tuberculosis. *Karolinska Institutet*, Sweden, **2009**.
41. **Bilgehan H.** Mycobacteriaceae. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. İzmir: *Barış Yayınları*, **1990**; 335-364.
42. **Wayne LG, Kubica GP.** Mycobacteria in: PHA Sneath (ed) Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, vo 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore **1986**; 95:861-867.
43. **Pfyfer GE, Brown-Elliott BA, Wallace RJ.** Mycobacterium in: **Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds)** Manual of Clinical 8th ed Washington DC, **2003**; 532-559, 1156-1164.
44. **Thoen C, Lobue P, de Kantor I.** The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis, *Vet Microbiol* **2006**; 112(2-4):339-45.
45. **Chatterjee D.** The mycobacterial cell wall: Structure, biosynthesis and site of drug action. *Current opinion in Chemical Biology.* **1997**; 1:579-588.
46. **Brosman SA.** Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *Urol. Clin. North Am.*, **1992**; 19:557-564.
47. **Mukamolova GV, Turapov OA, Young DI, Kaprelyants AS, Kell DB, Young MA.** Family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.*, **2002**; 46:623-635.
48. **Hewinson RG, Michell SL, Russell WP, McAdam RA, Jacobs WR.** Molecular characterization of MPT83: a seroreactive antigen of *Mycobacterium tuberculosis* with homology to MPT70. *Scand. J. Immunol*, **1996**; 43:490-499.
49. **Weber, I., Fritz, C., Rutkowski, S., Kreft, A. & Bange, F. C.** Anaerobic nitrate reductase (narGHJ) activity of *Mycobacterium bovis* BCG in vitro and its contribution to virulence in immunodeficient mice. *Mol Microbiol.*, **2000**; 35:1017-1025.
50. **Bilgehan H.** Aşırı duyarlılık tepkimeleri. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. 9. Baskı, İzmir: *Barış Yayınları*, **1999**; 492-531.

51. **Erganiş O, İstanbulluoğlu E.** Aşırı duyarlılık reaksiyonları. İmmunoloji. 2. Baskı, Konya: S.Ü. Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, **1999**; 95-106.
52. **Haas DW.** Mycobacterial Diseases In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed). *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5nd ed, Philadelphia: Churcill Livingstone, **2000**; 2596-2608.
53. **Aranaz A, Liebana E, Mateos A, Dominguez L, Vidal D, Domingo M, Gonzolez O, Rodriguez-Ferri EF, Bunschoten AE, Van Embden JDA, Cousins D.** Space Oligonucleotide Typing of *Mycobacterium bovis* Strains from Cattle and Other Animals: a Tool for Studying Epidemiology of Tuberculosis , Australia. *Journal of Clinical Microbiology* , **1996**; 34(11): 2734-2740.
54. **Munyeme M, Rigouts L, Shamputa IC, Muma JB, Tryland M, Skjerve E, Djønne B.** Isolation and characterization of *Mycobacterium bovis* strains from indigenous Zambian cattle using Spacer oligonucleotide typing technique. *BMC Microbiology*, **2009**; 9:144-152
55. **Akay Ö.** Aside dirençli bakteriler. In: Arda M, editör. *Özel Mikrobiyoloji*. 4. Baskı, Ankara: Medisan Yayın Evi, **1997**; 179-198.
56. **Schwander SK, Torres M, Seda E.** Enhanced responses to *M. tuberculosis* antigens by human alveolar lymphocytes during active pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis.*, **1998**; 178:1434-45.
57. **Kocabas A.** Akciğer Tüberkülozu In: Topçu Wilke A, Söyletir G, Doğanay M,(ed). *İnfeksiyon Hastalıkları* 1. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **1996**; 396-443.
58. **Kılıçturgay, K.** (edit) Klinik Mikrobiyoloji Kitabı. Gediklioğlu, S. Bursa Güneş ve Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara: **1994**; 65-82.
59. **Murray PR.**(editor in chief) *Manual of Clinical Microbiology* Nolte., FS, Metchock, B. Sixth edition Asm Press Washington D.C., **1995**; 400- 437.
60. **Inderlied CB.** Mycobacteria In: Armstrong D, Cohen J (Eds). *Infectious Diseases*, Mosby Company, London. **1999**; 1(8):1-22.
61. **Kıyan M.** Mycobacteriaceae. Ustaçelebi S, Cengiz AT (Ed). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Ankara: Güneş Kitabevi, **1999**; 419-455.
62. **Noss EH, Pai RK, Sellati TJ.** Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19 kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, **2001**; 167:910-918.
63. **Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I, Andersen P.** Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun*. 1996 Jan;64(1):16-22.
64. **Özbal Y.** Tüberküloz immunolojisi. *Erciyes Tıp Dergisi*, **2006**; 28 (1): 25-34.
65. **Babacan F, Över U.** Mikobakterilerin Genel Özellikleri ve *Mycobacterium tuberculosis* **Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (ed).** İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, **2002**; 538-591.
66. **Çoban H.** *Mycobacterium tuberculosis*' e ait ESAT-6 VE CFP-10 proteinlerinin ekspresyonu, farklı hasta gruplarında IFN- γ VE IL-10 yanıtlarının saptanması. Uzmanlık tezi, İzmir, **2007**.
67. **Rachman H, Strong M, Schaible U, Schuchhardt J, Hagens K, Mollenkopf H, Eisenberg D, Kaufmann SH.** *Mycobacterium tuberculosis* gene expression profiling within the context of protein networks. *Microbes Infect.*, **2006**; 8(3):747-57.

68. **Diker S.** Aşırı duyarlılık reaksiyonları. İmmunoloji. 1. Baskı. Ankara, *Medisan Yayınevi*, **1998**; 237-253.
69. **Feng CF, Demangel C, Kamath AT, Macdonald M, Britton WJ.** Dendritic cells infected with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin activate CD8+ T cells with specificity for a novel mycobacterial epitope. *International Immunology*. **2001**; 13 (4): 451-458.
70. **Smith I.** *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbiology Reviews*. **2003**;16 (3):463-496
71. **Hamasur B, Bruchfeld J, Haile M, Pawlowski A, Bjorvatn B, Kallenius G.** Rapid diagnosis of tuberculosis by detection of mycobacterial lipoarabinomannan in urine. *Journal of Microbiological Methods*, **2001**; 45: 41–52.
72. **Cox JS, Chen B, McNeil M, Jacobs WR.** Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature*, **1999**; 402: 79-83.
73. **Ludwiczak P, Gilleron M, Bordat Y. et al.** *Mycobacterium tuberculosis* phoP mutant, lipoarabinomannan molecular structure. *Microbiology*, **2002**; 148: 3029-3037.
74. **Duarte TA, Barbosa Jr AA, Arruda S.** Morphometric analysis of granulomas induced by *Mycobacterium bovis* suggests an influence of IFN-Gamma on the generation and modulation upon granulomatous inflammatory response in the different tissues. *Int. J. Morphol.*, **2005**; 23(4): 317-322.
75. **Kobayashi K, Kaneda K, Kasama T.** Immunopathogenesis of Delayed-Type Hypersensitivity. *Microscopy Research and Technique*, **2001**; 53: 241-245.
76. **Fulton SA, Martin TD, Redline RW, Boom WH.** Pulmonary immune responses during primary *Mycobacterium bovis*-Calmette-Guerin bacillus infection in C57Bl/6 mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2000**; 22: 333-343.
77. **Palmer MV, Whipple DL, Olsen SC.** Development of a model of natural infection with *Mycobacterium bovis* in white-tailed deer. *J Wild Dis.*, **1999**; 35: 450-457.
78. **Sayın Z.** Sığırlarda Tüberkülozun Farklı Metotlar İle Karşılaştırmalı Teşhisi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü , Doktora Tezi. Konya. **2010**.
79. **Whelan AO, Hope JC, Howard CJ, Clifford D, Hewinson RG, Vordermeier HM.** Modulation of the bovine delayed-type hypersensitivity responses to defined Mycobacterial antigens by a synthetic bacterial lipopeptide. *Infection and Immunity*. **2003**; 71: 6420-6425.
80. **Vordermeier HM.** T-cell recognition of mycobacterial antigens. *Eur Respir J.*, **1995**;20:657-667.
81. **Ortatatlı M, Çiftçi MK, Tuzcu M.** Sığırlarda Tüberküloz ve Diğer Granülatöz Pnömoniler Üzerine Patolojik İncelemeler. *Vet. Bil. Derg.*, **1998**; 14(2): 139-150.
82. **Pritchard DG.** A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. *J Comp Pathol.*, **1988**; 99(4): 357-399.
83. **Raja A.** Immunology of tuberculosis. *Indian J Med. Res.*, **2004**; 120: 213-232.
84. **Chambers MA, Williams A, Gavier-Widen D.** A guinea pig model of low-dose *Mycobacterium bovis* aerogenic infection. *Vet Microbiol.*, **2001**; 80: 213-226.
85. **Menzies FD, Neill SD.** Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J.*, **2000**; 160: 92-106.

86. **OIE.** Bovine tuberculosis. Terrestrial Manual. Chapter 2.4.7, **2008**; 683-694.
87. **Angela DP, Giuseppina C, Tony FV, Bijo B, Fatmira S, Giuseppina T.** Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in milk using polymerase chain reaction (PCR). *Food Control*, **2006**; 17:776-780.
88. **Neill SD, Bryson DB, Pollock JM.** Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis*, **2001**; 81:79-86.
89. **Manabe Y, Bishai W.** Latent *Mycobacterium tuberculosis*-persistence, patience and winning by waiting. *Nature Med.*, **2000**; 6: 1327-1329.
90. **Reichman LB, Hershfield ES.** Pathogenesis of tuberculosis. *Tuberculosis*. Second Edition. Basel, Marcel Dekker, **2000**; 241-260.
91. **Oğuz D.** 5-24 Ay Arası Sağlıklı Çocuklarda BCG Aşısının Tüberkülin Deri Testine Etkisinin Aaştırılması. Uzmanlık Tezi, **2004**.
92. **Öztürk R.** Tüberkülozda doğal direnç ve risk faktörleri, 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun, **2003**.
93. **Gemicioğlu B.** Erişkinde tüberküloz kliniği ve tanısı. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri; Erişkin ve Çocukta Tüberküloz Sempozyumu. İstanbul, **1999**; 21-37.
94. **OIE.** Prescribed and alternative diagnostic test for OIE listed disease. Terrestrial Animal Health Code. **2008**; 1(3): 1-5.
95. **Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Baldock C, Jones SL, Cousins DB, McCormick BS, Francis BR, Creeper J, Tweedle NF.** Field comparison of the interferon-gamma assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal*, **1991**; 68: 286-290.
96. **Buddle BM, Parlane NA, Keen DL, Aldwell FE, Pollock JM, Lightbody K, Andersen P.** Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **1999**; 6: 1-5.
97. **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):551-66.
98. **Sevakumar N, Rahman F, Rjasekaran S, Narayannan PR, Frieden TR.** Inefficiency of % 0,3 carbol fuchsin in Ziehl-Neelsen staining for detecting acid-fast bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*. **2002**; 40: 3041-3043.
99. Toman's Tuberculosis, Case Detection, Treatment and Monitoring: Questions and Answers, Edited by T. Frieden. 2nd ed. **2004**.
100. **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: 364-70.
101. **Hensyl WR.** The Mycobacteria. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Baltimore, USA: Williams&Wilkins. **1994**; 597-604.
102. **Daniel TM, Debanne SM.** The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **1987**; 135:1137.

103. **Bengisun JS, Gökırmak MÇ, Arıbal E, Saygun N, Özenci E.** Tüberkülozun serolojik tanısında ELISA testinin tanı değeri. *Ankara Üniversitesi Tıp Mecmuası*, **1997**;50 (4):193-195.
104. **Vordermeier M, Goodchild A, Clifton-Hadley R, De la Rua R.** The interferon-gamma field trial: background, principles and progress. *Veterinary Record.*, **2004**;155: 37-38.
105. **Kulshrestha A, Gupta A, Verma N, Sharma SK, Tyagi AK, Chaudhary VK.** Expression and purification of recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis* for application in serodiagnosis. *Protein Expr Purif.*, **2005**;44:75–85.
106. **Julian E, Cama M, Martinez P, Luquin M.** An ELSA for five glycolipids from the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*: Tween 20 interference in the assay. *Journal of Immunological Methods*, **2001**;251: 21-30.
107. **Bothamley GH.** Serological diagnosis of tuberculosis. *Eur. Respir. J.*, **1995**; 8: 676.
108. **Durmaz R, Zozio T, Gunal S, Allix C, Dufaux MF, Rastogi N.** Population-Based Molecular Epidemiological Study of Tuberculosis in Malatya, Turkey. *Journal of Clinical Microbiology*, **2007**; 45:4027-4035.
109. **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.
110. **Jeon BY, Je S, Park J, Kim Y, Lee EG, Lee H, Seo S, Cho SN.** Variable Number Tandem Repeat Analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Gyeonggi-do, Korea. *Journal of Veterinary Science*, **2008**; 9 (2):145-153.
111. **Roring S, Scott AN, Hevinson RG, Neill SD, Skuce RA.** Evaluation of Variable Number Tandem Repeat (VNTR) loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. *Science Direct Veterinary Microbiology*, **2004**;101:65-73.
112. **Cousins DV.** *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev Sci Tech.*, **2001**; 20:71-85.
113. **Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA.** *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology, *BMC Microbiology*. **2006**;6:23.
114. **Supply P, Allix C, Lesjean S, Oelemann MC, Rüsch-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 Interspersed Repetitive Unit–Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, **2006**;12:4498-4510.
115. **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. *Journal Of Clinical Microbiology*, **2009**; 47:636–644.
116. **Allix C, Walravens K, Saegerman C, Godfroid J, Supply P, Dufaux MF.** Evaluation of the Epidemiological Relevance of Variable-Number Tandem-Repeat Genotyping of *Mycobacterium bovis* and Comparison of the Method with IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis and Spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, **2006**;1951-1962.

117. **Maes M, Kristin Kremer K, Soolingen D, Takiff H, Waard J.** 24-Locus MIRU-VNTR genotyping is a useful tool to study the molecular epidemiology of tuberculosis among Warao Amerindians in Venezuela. *Tuberculosis*, **2008**; 88:490-494.
118. **Smittipat N.** Three-year population-based evaluation of standardized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number of Tandem Repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *JCM.*, **2005**; 43:5034-43.
119. **Hilty M, Diguimbaye C, Schelling E, Baggi F, Tanner M, Zinsstag J.** Evaluation of Discriminatory Power of Variable Number Tandem Repeat (VNTR) typing of *Mycobacterium bovis* strains, Switzerland. *Veterinary Microbiology*, **2005**;109(2005):217-222.
120. **Akçay E.** Sığır tüberkülozünün teşhisinde kullanılan gamma interferon testi ile ELISA'nın karşılaştırılmalı değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi. Doktora Tezi. **2000**.
121. **Barwinek F, Taylor NM.** Assessment of the socio-economic importance of bovine tuberculosis in Turkey and possible strategies for control or eradication, Turkish-German.
122. Hayvan Hastalık ve Zararlıları ile Mücadele Programı. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara, **2005**; 22-24.
123. **Hublart M, Moine G.** Human tuberculosis caused by the bovine bacillus in Denmark after eradication of bovine tuberculosis *Bull Acad Vet Fr.*, **1969**;42(2):69-73.
124. **Karlson AG, Carr DT.** Tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* report of six cases: 1954–1968, *Ann. Intern. Med.*, **1970**;73:979–983.
125. **Poletaev SD.** Pulmonary tuberculosis caused by mycobacteria of Bovine type. *Probl. Tuberk.*, **1970**;48: 38–41.
126. **De Beco O, Boulahbal F, Grosset J.** Incidence of the bovine bacillus in human tuberculosis at Algiers in 1969., **1970**; 48:93-101.
127. **Kantor IN, Lesslie IW.** Isolation of mutants resistant to antituberculous drugs in wild strains of *M. bovis* *Medicina (Buenos Aires)*, **1974**;34: 244–248.
128. **Hardin A, Crandall PG, Stankus T.** The Zoonotic Tuberculosis Syndemic: A Literature Review and Analysis of the Scientific Journals Covering a Multidisciplinary Field That Includes Clinical Medicine, Animal Science, Wildlife Management, Bacterial Evolution, and Food Safety, *Science & Technology Libraries*, **2011**;30: 20-57.
129. **Sjogren I, Hillerdal O.** Bovine tuberculosis in man-reinfection or endogenous exacerbation *Scand. J. Respir. Dis.*, **1978**;59:167–170.
130. **Grange J., Collins C., Yates M.** Bacteriological survey of tuberculous lymphadenitis in south-east England: 1973–1980, *J. Epidemiol. Commun. Health*, **1982**;36: 157–161.
131. **Kappler W, Kalich R, Fischer P.** Incidence and significance of lung diseases caused by tuberculosis bacteria and atypical mycobacteria in East Germany *Z. Erkr. Atmungsorgane*, **1986**;167: 42–46.
132. **Idigbe EO, Anyiwo CE and Onwujekwe DI .** Human pulmonary Infections with bovine and atypical mycobacteria in Lagos, Nigeria. *J. Trop. Med & Hyg (London)*, **1988**; 89; 153-148.
133. **Zinstaag J., Kazwala R., Cadmus I., Ayanwale L.** *Mycobacterium bovis* in Africa *Mycobacterium bovis* Infections in Animals and Humans, Blackwell Publishing, Ames, IA **2005**.

134. **Peluffo G., Kantor I.N.** Bacteriologic diagnosis of extrapulmonary tuberculosis in a general hospital, *Rev. Argent. Microbiol.*, **1982**;14:91–96.
135. **Ağaçayak A, Bulut Y, Seyrek A.** Elazığ Yöresinde Tüberkülozlu Hastaların Balgam Örneklerinde Mikobakteri Tür Dağılımının PCR-RFLP Yöntemi ile Belirlenmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, **2007**;41: 203-209.
136. <http://www.tarim.gov.tr>
137. **Çilli A.** Antitüberküloz İlaçlar ve Etki Mekanizmaları. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. *Ofset Basım*. Samsun. **2003**; 163-172.
138. **Özışık N.Ç.** Çok ilaca dirençli tüberküloz hastalarında BACTEC ve Agar proporsiyon yöntemi ile saptanan etiyonamid direncinin klinik önemi. Süreyyapaşa Göğüs ve kalp Damar Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Uzmanlık tezi, İstanbul, **2006**.
139. **Kiraz N.** Antitüberküloz ilaçlara direnç mekanizmaları ve yeni ilaçlar, 21. Yüzyılda tüberküloz sempozyumu ve 2. Tüberküloz laboratuvar tanı yöntemleri kurs kitabı. Ofset basım. Samsun. **2003**;173-177.
140. **Gupta UD and Katoch VM.** Animal models of tuberculosis for vaccine development. *Indian J Med Res.*, **2009**; 129: 11-18.
141. **Talbot EA, Williams DL, Frothingham R.** PCR Identification of *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of Clinical Microbiology*, **1997**;35: 566-569.
142. **Mustafa AS, Skeiky YA, Al-Attayah R, Alderson MR, Hewinson RG, Vordermeier HM.** Immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle. *Infection and Immunity*, **2006**; 74:4566-4572.
143. **Haile M.** Studies on new tuberculosis vaccine candidates in animal models. Swedish Institute for Infectious Disease Control, Thesis of Doctorate. Stockholm, **2005**.
144. **Ambrosio SR, Márcia de Deus OE, Rodriguez CAR, Neto JSF1, Amaku M.** Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. *Braslian Journal of Microbiology*, **2008**; 39: 241-244.
145. **Kamerbeek J, L. Kolk SA, van Agterveld M, van Soolingen D, van Embden J.** Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, **1997**;35:907–914.
146. **Niemann S, Diel R, Khechinashvili G, Gegia M, Mdivani N, Tang YW.** *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage favors the spread of multidrug resistant tuberculosis in the Republic of Georgia. *J. Clin. Microbiol.*, **2010**; 48 (10): 3544-50
147. **Beytut E.** Kars ili ve yöresinde sığırlarda tüberküloz insidensi ve lezyonların lokalizasyonu üzerine patolojik incelemeler. *Kafkas Üniv. Vet Fak. Derg.*, **2001**;7 (1): 15-25.
148. **Sahraoui N, Müller B, Guetarni D, Boulahbal F, Yala D, Ouzrout R, Berg S, Smith NH, Zinsstag J.** Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. *Biomed*, **2009**;1-7
149. **Sun Z, Cao R, Tian M, Zhang X, Zhang X, Li Y. Xu Y, Fan W, Huang B, Li C.** Evaluation of Spoligotyping and MIRU-VNTR for *Mycobacterium bovis* in Xinjiang, China. *Research in Veterinary Science*, **2011**.
150. **Tadayon K, Mosavari N, Sadeghi F, Forbes KJ.** *Mycobacterium bovis* Infection in Holstein Friesian Cattle, Iran. *Emerging Infectious Diseases*, **2008**;14(12):1919-1921.

151. **Lari N, Bimbi N, Rindi L, Tortoli E, Garzelli C.** Genetic diversity of Human Isolates of *Mycobacterium bovis* Assessed by Spoligotyping and Variable Number Tandem Repeat Genotyping. *Infection, Genetic and Evolution*, **2011**;11:175-180.
152. **Sola C , Filliol I , Legrand E, Lesjean S, Locht C , Supply P, Rastogi N.** Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infection, Genetics and Evolution*, **2003**; 3:125–133.
153. **Duarte EL, Domingos M, Amado A, Cunha MV, Botelho 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.
154. **Asgharzadeh M, Kafil HS, Roudsary AA, Hanifi GR.** Tuberculosis transmission in Northwest of Iran: Using MIRU-VNTR, ETR-VNTR and IS6110-RFLP methods. *Infection, Genetics and Evolution*, **2011**;11:124–131.
155. **Zuma Rraga MNJ, Martín C, Samper S, Alito A, Latini O, Bigi F, Roxo E, Cicuta ME, Errico F, Ramos MC, Cataldi A, Soolingen D, Romano MI.** Usefulness of Spoligotyping in Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis*-Related Infections in South America. *Journal Of Clinical Microbiology*, **1999**;37:296–303.
156. **Cowan, L. S., and J. T. Crawford.** Genotype analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a sentinel surveillance population. *Emerg. Infect. Dis.*, **2002**; 8:1294–1302.
157. **Aslan G, Kuyucu N, Aydın E, Günel S, Emekdaş G.** *Mycobacterium Bovis* BCG Suşunun Neden Olduğu Fatal Disemine Enfeksiyon Olgusu ve İzolatın Spoligotiplendirme ile Tanımlanması. *Mikrobiyol Bül*, **2010**; 44: 297-302.

ÖZGEÇMİŞ

Mayıs 1973’de Konya’da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini 1984-1990 yıllarında Konya’da tamamladı. Üniversite eğitimini 1990-1996 yılları arasında Konya Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nde tamamladı. Kars Tarım İl Müdürlüğü’nde Kontrol Şube ve Hayvan Sağlığı Şube Müdürlüğü görevlerini yürüttü. Daha sonra Adana Tarım İl Müdürlüğü ve Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü’nde Veteriner Hekim olarak görev yaptı. Şu an Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi ve Deney Hayvanları Laboratuvarında Veteriner Hekim olarak görev yapmaktadır. İngilizce bilmektedir. Evli ve iki çocuk sahibidir.