

T.C.
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ADYAMAN İLİNDE TÜBERKÜLOZ ŞÜPHESİ OLAN SIĞIRLARDA
***Mycobacterium bovis* VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE EPİDEMİYOLOJİK**
TİPLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HALİL CİNOĞLU
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

ADYAMAN

2021

T.C.
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ADİYAMAN İLİNDE TÜBERKÜLOZ ŞÜPHESİ OLAN SIĞIRLARDA
***Mycobacterium Bovis* VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE EPİDEMİYOLOJİK**
TIPLENDİRİLMESİ

HALİL CİNOĞLU

Danışman Öğretim Üyesi:

Prof. Dr. Gülnur TARHAN

Bu tez Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TIPFYL / 2018-0001 nolu proje ile desteklenmiştir.

ADİYAMAN

2021

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen, kıymetli danışman hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gülnur TARHAN 'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Spoligotiplendirme konusundaki yardımlarından dolayı sayın Dr. Öğr. Üyesi Mediha Begüm KAYAR 'a, laboratuvar çalışmalarımda desteğini esirgemeyen sayın Arş. Gör. Funda ŞAHİN 'e teşekkür ederim.

Hayattaki en büyük desteklerim sevgili eşim Gamze CİNOĞLU' na ve oğlum Harun CİNOĞLU na ömür boyu sevgileriyle desteklerini esirgemeyen, her şeyimi borçlu olduğum annem Cennet CİNOĞLU na, babam Akın CİNOĞLU na, eğitimim boyunca gösterdikleri sabır, anlayış ve yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Sığır tüberkülozu etkeni *M. bovis* zoonoz karakterde olması nedeni ile insan sağlığını tehdit etmektedir. Bu çalışma, Adıyaman ilinde bir yıllık süreçte nokta surveyans yöntemi ile et üretimi için kesilen hayvanlardan *M. bovis* 'in izolasyonu ve spoligotiplendirme ile profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmada Adıyaman ilinde 10.10.2017- 31.12.2018 tarihleri arasında kesimi yapıldıktan sonra, tipik granülamatöz lezyonu saptanan sığır karkaslarından alınan, 44 doku örneği incelenmiştir. Bu örnekler %4 NaOH-NALC yöntemi ile DHK (Dekontaminasyon Homojenizasyon Konsantrasyon) işlemi yapılmıştır. DNA izolasyonu Mickle DNA izolasyon cihazı (Mickle Tissue Disintegrator) kullanılarak yapılmıştır. DHK işleminden önce ve sonra mikroskopik inceleme EZN boyama ile yapılmıştır. Konvansiyonel kültür (pirüvatlı ve pirüvatsız Löwenstein Jensen) besiyerine ekim yapılmış ve In-House PCR yöntemi ile değerlendirilmiştir. Kültürlerden toplanan koloniler spoligotiplendirme metodu ile epidemiyolojik tiplendirmesi yapılmıştır.

Bulgular: İncelenen 44 doku örneğinde pozitiflik oranı DHK işleminden önce mikroskopi pozitifliği %34.09 (15/44), DHK işleminden sonra mikroskopi %40.90 (18/44), pirüvatlı Löwenstein Jensen besiyerinde kültür %54,54 (24/44) ve pirüvatsız Löwenstein Jensen besiyerinde kültür %68.18 (30/44) ve PCR testleri %90.90 (40/44) oranında saptandı. Spoligotiplendirme sonucunda ise 4 farklı epidemiyolojik tip saptanmıştır (SB1197, SB1197, SB2508, SB2513).

Sonuç: Nokta surveyans yöntemi ile yaptığımız çalışmada tüberkülozun Adıyaman ilinde yaygın olduğu, sığırlardan alınan doku örneklerinin 4 farklı epidemiyolojik tip de *M. bovis* olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Mycobacterium bovis*, in house PCR, Spoligotiplendirme.

ABSTRACT

Aim: The causative agent of bovine tuberculosis, *M. bovis*, threatens human health due to its zoonotic character. In this study, it was aimed to isolate *M. bovis* from animals slaughtered for meat production by point surveillance method in one year period in Adıyaman province and to determine profiles by spoligotyping.

Material and method: In the study, 44 tissue samples taken from cattle carcasses with typical granulomatous lesions after slaughtering between 10.10.2017 and 31.12.2018 in Adıyaman were examined. These samples were DHK (Decontamination Homogenization Concentration) treated with 4% NaOH-NALC method. DNA isolation was done using the Mickle DNA isolation device (Mickle Tissue Disintegrator). Microscopic examination was performed with EZN staining before and after DHK treatment. Conventional culture (Löwenstein Jensen with and without pyruvate) was inoculated on medium and evaluated by In-House PCR method. Colonies collected from the cultures were typed epidemiologically using the spoligotyping method.

Results: The positivity rate of 44 tissue samples examined was microscopy 34.09% (15/44) before the DHK procedure, microscopy 40.90% (18/44) after the DHK procedure, culture 54.54% (24/44) in Löwenstein Jensen medium with pyruvate, and culture in Löwenstein Jensen medium without pyruvate 68.18% (30 / 44) and PCR tests were 90.90% (40/44). As a result of spoligotyping, 4 different epidemiological types were found (SB1197, SB1197, SB2508, SB2513).

Conclusion: In the study we conducted with the point surveillance method, it was determined that tuberculosis was common in Adıyaman and that the tissue samples taken from cattle were *M. bovis* in 4 different epidemiological types.

Keywords: *Mycobacterium bovis*, in house PCR, Spoligotyping

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Etiyoloji.....	6
2.3. Epidemiyoloji.....	7
2.4. Epizootiyoloji.....	8
2.5. Bağışıklık	11
2.6. Hastalık gelişimi	12
2.7. Aşılama	13
2.8. Tanı	14
2.8.1. Mikrobiyolojik Tanı.....	14
2.8.2. Kültür	15
2.8.3. Hücresel Bağışıklığın Ölçülmesi.....	17
2.8.4. Humoral Bağışıklığın Ölçülmesi.....	19
2.8.5. Moleküler Yöntemler	19
2.8.6. Deney Hayvanı Testleri.....	21
3. MATERYALVE METOT	22
3.1. Kullanılan Cihaz Gereç ve Solusyonlar	22
3.2. Çalışma Grubu ve Örnekler	23
3.3. Doku Örneklerinin Havanda Ezilmesi	23
3.4. Mikroskopi	24
3.5. Kültür	25
3.6. PCR	25
3.7. Spoligotiplendirme	27

4.	BULGULAR	28
5.	TARTIŞMA	31
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	34
	KAYNAKLAR	35

SİMGELER VE KISALTMALAR

- AIDS: Acquired immune deficiency syndrome
- ARB: Aside dirençli basillerin
- Bç: Baz çifti
- Bp: Base pair
- BCG: Bacillus Calmette-Guerin
- °C: Santigrat Derece
- CDC: Centers for Disease Control and Prevention
- DCÖ: DHK işleminden önce yapılan incelemeyi,
- DC: DHK işleminden sonra
- DCÖ: DHK işleminden önce
- DHK: Dekontaminasyon Homejenizasyon Konsantrasyon işlemi
- DNA: Deoksiribonükleik asit
- dNTP: Deoksinükleotittri-fosfat
- DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü
- CFT: Kompleman Fiksasyon testi
- EZN: Ehrlich Ziehl-Neelsen
- HIV: Human Immunodeficiency Virus
- KKT: Kaudal kat testi
- LJ: Löwenstein Jensen
- LTBE: latent tüberküloz enfeksiyonunun
- µg: Mikrogram
- MIRU: Mycobacterial interspersed repetitive units
- MTB: M. tuberculosis
- MTBK: Mycobacterium tuberculosis kompleksi
- NBD: Negatif belirleyicilik değeri
- OIE: Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
- PBD: Pozitif belirleyicilik değeri
- PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PPD: Pürified Protein Derivative

REA: Restrictionendonucleaseanalysis

RFLP: restrictionfragmentlengthpolymorphism

SICTT: tek intradermal karşılaştırmalı tüberkulin testi

SIT: tek intradermal

Sn: sensitivity

Sp: specificity

STB: sığır tüberkülozu

TLR: Toll-LikeReceptor

UV: Ultraviyole

V: Volt

WAHIS: World Animal Health Information System

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Sığır karkaslarında granülom görüntüsü	23
Şekil 2 : Granülom içeren karkas numunelerinin havanda ezilmesi	24
Şekil 3: EZN Boyama ile MBV 'nin ışık mikroskopundaki görünümü.....	25
Şekil 4: Pirüvatlı ve pirüvatsız LJ besiyerinde MBV 'nin üreme görüntüsü	25
Şekil 5: In-House PCR yöntemi ile çoğlatılmış MBV örneklerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	27
Şekil 6: <i>M. bovis</i> izolatlarının spoligotip modellerinin grafiksel gösterimleri.....	30

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1: 2019 yılı Dünya Sağlık Örgütü bölgeleri ve küresel olarak zoonotik TB'ye bağlı tahmini insidans ve ölüm oranı	8
Tablo 2: Mikroskopi, kültür ve PCR Test Sonuçları	28
Tablo 3: Mikroskopi, kültür ve PCR testlerin pozitiflik oranları	29
Tablo 4: Duyarlılık, Özgüllük, PBD ve NBD değerleri	29
Tablo 5: MBV izolatlarının spoligotiplendirmesi	30

1. GİRİŞ

Mycobacterium cinsinin neden olduğu tüberküloz (TB), hem insanlarda hem de hayvanlarda önemli bir sağlık sorunudur. İnsan tüberkülozunun geleneksel tablosu, genellikle kronik bir akciğer enfeksiyonu olarak ortaya çıkan ve tedavi olmaksızın sistemik enfeksiyona ilerleyebilen ve ölümlü sonuçlanabilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi'ne (MTBK) bağlı hastalıktır (1).

Mycobacterium bovis (MBV)'in neden olduğu sığır tüberkülozu (STB); kronik bir hastalık olarak bilinmesine rağmen, zaman zaman akut, çabuk ilerleyici bir tablo gösterebilir. Lezyonlar genelde lenf nodülleri (özellikle baş ve toraks), solunum sistemi, gastro-intestinal sistem, spleen, hepar, pleura ve peritoneum'da bulunur (2).

Tüberküloz, solunum sistemi organları başta olmak üzere birçok dokuda kazeöz ve kazeo-kalsifiye görünümlü granulomlar ile karakterize, süregelen enfeksiyöz ve zoonotik bir bakteriyel hastalıktır. MTBK içerisinde en çok enfeksiyonu görülen ajanlar *M. tuberculosis*(MTB), MBV, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. microtidir* (3).

Tüberküloz; tüm tedavi ve kontrol önlemlerine rağmen, dünyanın her yerinde bulaşıcı ve ölümcül olmaya devam etmektedir. Her yıl dünyada yaklaşık üç milyon kişi tüberkülozdan hayatını kaybetmektedir. Solunum yolu ile bulaşan bir hastalık olması nedeni ile toplumda her üç kişiden birinin tüberküloz etkenleri ile enfekte olduğu kabul edilmektedir (4).

STB, MBV tarafından oluşturulan ve genellikle solunum sistemi rahatsızlıklarına sebep olan süregelen bir hastalıktır. Tedavi çok maliyetli olduğu için, mücadele bu etkenle enfekte olduğu düşünülen çiftlik hayvanları imha edilerek yapılmaktadır (5). STB için birincil ana kaynak evcil sığırdır. Bununla birlikte çoğu memeli türünde MBV rapor edilmiştir. Diğer evcil ve yabani hayvanların, sığır ve insan enfeksiyonu için MBV'in potansiyel rezervuarları olarak kabul edildiğini vurgulamak önemlidir. STB'nin hayvancılık verimliliğindeki kayıplardan (örneğin süt, et, hayvan ölümleri) hastalık nedeniyle insan üretkenliğindeki kayıplara kadar ekonomik maliyetleri, kontrol programlarının olmadığı veya etkisiz olduğu sanayileşmemiş ülkelerde daha yüksektir (1).

MBV, hayvanlarda hastalığa neden olmasının yanı sıra, insanlarda TB'a neden olan MTBK türlerinden biridir. Sığırlar ve diğer hayvanlar üzerindeki etkileri ile toplulukların ekonomisi ve geçim kaynakları üzerindeki etkisi çarpıcı ve kapsamlı bir şekilde belgelenmesine rağmen, küresel insan TB'u salgınındaki rolü çok daha az anlaşılmiş ve çok detaylı incelenmemiştir. Bununla birlikte bu hastalığın mücadelesinde etkenin insan toplumundan uzaklaştırılması ve bunun için mikroorganizmanın özelliklerinin iyi anlaşılmasını ve kontrol edilmesini gerektirmektedir (6). İnsanlarda ve hayvanlarda TB, dünya çapında yayılım gösteren çok eski zamanlardan beri gelen bulaşıcı bir hastalıktır. Sığırlarda hastalığın nedeni olan MBV, ihmal edilmiş bir zoonozdur. Evcil hayvanlar, yaban hayatı ve insanları içeren geniş bir konakçı yelpazesine sahiptir. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE), sosyoekonomik etkisi ve halk sağlığı açısından önemi nedeni ile STB'yi bildirilmesi zorunlu bir hastalık olarak kabul etmektedir. Karmaşık epidemiyolojisi, sinsi doğası ve ekosistemler içinde enfeksiyonu sürdürebilen çok çeşitli yaban hayvanları nedeniyle kontrol edilmesi ve ortadan kaldırılması en zor olan endemik hastalıklardan biridir (7). MTBK içerisinde yer alan MBV, yaban hayatı ve insanlar da dahil olmak üzere diğer memeliler arasında en geniş konakçı yelpazesine sahip olmasına rağmen, sığır ve koyunlarda TB'nin ana nedensel ajanıdır (8).

MBV klinik olarak MTB'dan ayırt edilememektedir. Bu nedenle MBV'nin insidansı bilinmemekte, hastalıkla mücadele edilememektedir. MBV'in bazı suşlarının çoklu antibiyotik direnci olması, immun yetmezlikli bireylerde izole edilmesi ve HIV ile ko-enfeksiyonu sebebi ile dikkate alınması ve uygun sağaltım yöntemleri geliştirilmesi gerekmektedir (9).

MTB'ye bağlı küresel TB salgınına ele almak için gösterilen ilgi yatırım ve sanayileşmemiş ülkelerde insan STB enfeksiyonunun önemine rağmen, STB 'nin insanlardaki küresel TB epidemisindeki rolünü anlamada çok az değişiklik olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), STB'yi halk sağlığına ciddi tehdit oluşturan ihmal edilmiş yedi zoonozdan biri olarak kabul etmiştir. OIE, STB'nin kontrol edilmesi ve ortadan kaldırılması çağrısında bulunmaktadır. İnsanlarda STB enfeksiyonunun önemi konusunda küresel farkındalık, HIV-AIDS'in yayılmasıyla artmıştır. HIV-AIDS hastalarında STB enfeksiyonu oranları genel popülasyondan daha yüksektir, STB / HIV-AIDS ko-enfeksiyonları şu anda bunların çoğunluğunu oluşturmaktadır. Bu artan

farkındalığa rağmen, STB'nin insanlarda akciğer dışı TB'nin küresel oranlarına ve genel TB'ye katkısı tam olarak belgelenmemiştir ve ek araştırma gerekmektedir (1).

DSÖ, Güney Amerika 'da MBV neden ile her yıl 7000 yeni insan TB olgusu bildirmiştir. Ancak gerçek insidansın sekiz kat daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir (3). MBV, insanlar için patojeniktir. Ancak patojenitesi, MTB 'den daha azdır. MBV'nin balgam yayması pozitif olup, potansiyel olarak diğer insanlara akciğer tüberkülozu bulaştırabilmektedir. Kişiden kişiye yayılma kaydedilmiştir. Ancak tüberküloz olguları MBV yönünden ayrıntılı olarak araştırılmamıştır (6).

Gelişmiş ülkelerde, MBV temelli TB insidansının, sütlerin pastörize edilmesi ve başarılı eradikasyon programlarını sonucu azaldığı bildirilmiştir. Değişik ülkelerde yapılan çalışmalarda enfeksiyonunun taşınmasında insanların rezervuarı olabileceği belirtilmektedir. İnsanlarda MBV enfeksiyonunun insidansına yönelik doğru bilginin ise sınırlı olduğu ve verilerin oldukça tartışmalı olduğu bildirilmektedir (9). Pek çok ülkede, yıllar önce kapsamlı kontrol ve imha programları başlatılmış olmasına rağmen, ekonomik kayıplara neden olmaya devam etmektedir. Ulusal kontrol önlemlerini uygulamaya koyacak alt yapıya sahip olmayan ülkelerde, enfeksiyonun zoonotik bulaşması, her yaşta insanda morbidite ve mortaliteye yol açmaya devam etmektedir (10).

TB'yi kontrol etmeye yönelik küresel stratejide STB ile ilişkili zorlukları ele almak için hem insan hem de hayvan sağlığı uzmanlarının zoonotik TB'nin etkili bir şekilde önlenmesi ve kontrolü için birlikte çalışması gerekmektedir. “Tek Sağlık” terimi, zoonozlara yönelik birleşik insan ve veteriner tıbbi yaklaşımını tanımlamak için benimsenmiştir. Birleşik yaklaşımlar, küresel TB salgınının kontrolüne yönelik gelecekteki çabalar için kritik olacaktır. İnsan, çiftlik hayvanları ve yaban hayatı popülasyonlarındaki farklılıklar göz önüne alındığında STB'nin epidemiyolojisi dünya çapında büyük farklılıklar gösterdiğinden, bu paradigma STB'nin kontrolü için idealdir (1).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

MTB, TB'nin etiyolojik ajanı olan ve genetik olarak ilgili insan mikobakteriyel patojenlerini içeren MTBK'nın temel üyesi olan eski bir insan patojenidir (11). MTBK'nın en yaygın atası, yaklaşık 40.000 yıl öncesine dayanır ve MTB DNA'sı, binlerce yıl önce hastalığa yakalanmış bireylerin mumyalanmış kalıntılarında bulunmuştur (11). Mozaiklerde, ölen hayvanlarda akciğerler ve göğüs duvarı arasında yapışmaların olduğu yazılıdır. Mısır, Peru ve Naga mumyalarında mikobakteri etkenleri günümüzde moleküler teknikler ile tespit edilmiştir. 1862 de Lyon kentinde , enfekte yemler ve süt ile beslenen buzağularda tüberküloz geliştiği bildirilmiştir (12). Konak ve etkenlerin birlikte evrimleştiği hipotezi, 1950 'lerde ortaya atılan “çoklu tesadüfi giriş” kadar dikkat çekici olmamış ve günümüzde de olduğu gibi “ MTB'nin, MBV'den türediği” görüşü kabul görmüştür (13). Güncel veriler Doğu Afrika' da insanlarla paralel olarak MTB'nin evrimleştiğini ve tüm dünyaya yayıldığını doğrulamaktadır. M.Ö. 17.000'li yıllardan kalma bizon fosillerinde MTB'nin tespit edilmesi, bakterinin insanlar dışında buzul döneminde mastodonlar ve sığırları da hasta etmiş olabileceğini göstermiştir (13).

İnsanlarda TB enfeksiyonuna ait ilk bulgulara 3000 yıl öncesine ait Mısır mumyalarının omurgalarında rastlanmıştır (14). Robert Koch, 1882 yılında TB'den ölen bir kişinin otopsisindeki lezyonlarda basili göstermiş, izole etmiş ve bu basil ile deney hayvanlarında hastalığı oluşturmuştur (13). 1896'da Lehmann ve Neumann bulunan etkeni “*Mycobacterium tuberculosis*” olarak adlandırmıştır (13). Bununla birlikte, o dönemde hayvan TB (hem sığır hem de kuş tüberkülozu dahil) listelenmemiş olsa da, bu hastalık için sağlanan bilgiler OİE Bülteninde 1927'de yayınlanmıştır. OİE Bülteninin bu sayısı, dünya çapındaki hayvan sağlığı durumuna ilişkin istatistikleri içermiştir. Bu yayın OİE arşivlerinde kaydedilen ilk hayvan TB bildirisidir (10). Sonrasında özelliklerine göre TB ajanları; insan tipi, sığır tipi ve kuş tipi olarak üçe ayrılmıştır (13). Türkiye'de TB, 1900'lü yıllarda araştırılmaya başlamıştır. Sığırlarda ilk araştırma 1929 yılında Hayvan Sağlık Zabıtası Kanununun kabulü ile başlamıştır.

Rıza İsmail 1929 yılında Pürified Protein Derivative (PPD) testi ile 7335 sığırdan 676'sını (%9,2) tüberküloz pozitif olarak belirlemiştir (14).

ABD'de streptomisin, İsveç'te Para-amino Salisilik Asit (PAS) 'ın keşfi ile 1940'larda tedavi için etkili bir dönem başlamış, ancak çok hızlı bir şekilde bu ilaçlara direnç gelişmiştir ve bu etkisiz kalan ilaçların yerine yeni ilaç araştırmalarını zorunlu kılmıştır. Robizek ve Selikof tarafından izoniazid (INH)'in bulunması sonrası bu üç ilaçla 18-24 aylık kombine tedavi uygulanması ile TB tedavi edilebilir hale gelmiştir. Daha sonraki yıllarda TB tedavisinde kullanılan ilaçlardan sırası ile 1954 yılında pirazinamid, 1962 yılında etambutol ve 1966 yılında rifampisin bulunmuştur (13).

STB başlangıçta OIE'ye yıllık olarak rapor edilebilen hastalıkları içeren Liste B'ye dahil edilmiştir. Bu liste, ülkeler içinde sosyo-ekonomik veya halk sağlığı açısından önemli olduğu düşünülen ve uluslararası hayvan ve hayvansal ürün ticaretinde önemli olan bulaşıcı tüm hastalıkları içermektedir (10). Buna karşılık, Liste A, OIE'ye aylık veya iki haftada bir rapor edilmesi gereken bildirim zorunlu hastalıkları içeriyordu. Bu liste, ciddi sosyo-ekonomik veya halk sağlığı etkileriyle ulusal sınırlar boyunca çok hızlı yayılma potansiyeli olan ve hayvanların ve ürünlerinin uluslararası ticareti için büyük öneme sahip tüm bulaşıcı hastalıkları içermektedir. 1996 yılında, OIE durumu çevrimiçi raporlama sisteminin başlatılması, üye ülkelerin dijital formda bilgi sağlamasına olanak sağladı. 2004 yılında, OIE' nin Uluslararası Komitesi, OIE' nin Bölgesel Komisyonlarının tavsiyeleri ile birlikte, OIE Genel Merkezine, daha önce üretilen A ve B listelerinin yerini alacak, bildirilebilir kara ve su hayvanı hastalıkları listesini oluşturma talimatı veren kararları kabul etmiştir (10). OIE, tek listeye dahil edilecek hastalıkları belirlemek için kriterler geliştirmiştir. Bu kriterler o yılın Mayıs ayında onaylanmış ve 2005 yılında bu ilk tek liste yürürlüğe girmiştir. Kriterler, enfeksiyöz mikroorganizmanın uluslararası yayılma riskleri ile birlikte, insanlar evcil hayvanlar ve yaban hayatı için sonuçları ile güvenilir teşhis ve tespit yöntemleri kapsamaktadır (10). Bu listenin uygulanmasına paralel olarak, World Animal Health Information System (WAHIS)'in uygulamaya sokulması, üye ülkelerin artık standart bir formatta, OIE listesindeki hastalıklar hakkında bilgi üretebilecekleri anlamına geliyordu. Daha sonra WAHIS'te yapılan birkaç iyileştirme, üye ülkelerin özellikle yaban hayatı için OIE listesinde yer alan hastalıklar hakkında daha ayrıntılı bilgi sağlamasına olanak sağladı. Böylelikle 2009 yılından beri ev içi hastalıkların ortaya çıktığını bildirmek mümkün olmuştur. Hayvanlar ve yaban hayatında ayrı ayrı ve

2012'den beri etkilenen yaban hayatı türlerinin hem bilimsel hem de ortak adlarını sağlamak amacı ile STB, 1964'ten beri OIE tarafından listelenmiştir (10).

2.2. Etiyoloji

Mikobakteriler, *Mycobacteriaceae* ailesindeki tek cinstir. 10 µ'a kadar olan uzunlukta ve 0,2-0,6 µ çapında, kapsülsüz, sporsuz, hareketsiz, zorunlu aerob basillerdir. Etkenin hücre duvarında, kuru ağırlığının %40 'ı na kadar oranda lipit bulunmaktadır. Etken zorunlu hücre içi patojendir ve çoğunlukla mononükleer fagositik hücreleri enfekte etmektedir (15). Morfolojik olarak sporsuz, kıvrık veya düzgün çomak şeklinde dallanmış mikroorganizmalardır. Üreme ortamı ve süresi, basilin büyüklüğünü ve şeklini değiştirebilir. Makrofaj içerisinde aktif çoğalan basiller normalden biraz daha uzundur ve tomurcuklanma benzeri yapı gösterirler. Patojen basiller, bölünmelerini takiben birbirlerinden ayrılmazlar ve kümeler şeklinde çoğalırlar. Bu kümeler kord faktör (serpentin kord) olarak isimlendirilir. Kord faktör oluşturma özelliği hidrofobiteden kaynaklanmaktadır. Koloni şekilleri, tür tespiti veya hastalık yapma özelliği için kesin bulgu değildir (4). İnvitro koşullarda %5-10 CO₂ üreme üzerinde olumlu etki yapmaktadır. Optimal üreme ısısı 37 °C'dir (14).

Basilin endotoksini ve ekzotoksini olmamasına rağmen, kendisinin parçalanması sonucu ortaya çıkan değişik yapıda antijenik özellik gösteren maddeler toksisite göstermektedir. Bu maddeler bağışık yanıtı çeşitli şekillerde etkilemektedir (16). Sığırlarda granülomlar lenf düğümlerinde, tüm iç organlarda ve vücut boşluklarının mukozalarında rastlanılmaktadır. Generalize TB enfeksiyonunda çok sayıda küçük granülom vücut boşluklarının ve organların yüzeyinde, özellikle bağırsaklar ve mezenteriyumda görülmektedir (17).

STB yaşlı hayvanların kronik bir hastalığı olarak bilinmesine karşın, kongenital bulaşma ile genç hayvanlarda da görülebildiği ve bunların da çok erken yaşlarda öldükleri tespit edilmiştir (18, 19).

MBV genellikle hayvandan insana bulaşmaktadır, azda olsa insandan insana bulaşma ihtimalide vardır. Bulaşma etken bulunan pastörizasyon vb. işlemlerden geçmemiş sütlerin tüketilmesi yada damlacık enfeksiyonu şeklinde gerçekleşmektedir (20, 21). Sığırlarda MBV'nin en önemli bulaşma yolu damlacıktır (21, 22). Hayvanların birbirleri ile temas halinde birlikte bulunmaları, hijyenik koşulların iyi olmaması, uygun olmayan bakım ve beslenme koşulları hastalığın yayılmasını kolaylaştırmaktadır.

Hastalık sığırlarda sindirim, solunum, genital, deri ve kongenital yol ile bulaş bildirilmiştir (2, 19, 21). STB'nin epidemiyolojisi doğası gereği tutarsızdır. MBV, sığırlar arasında zayıf bir şekilde bulaşabilir, ancak enfeksiyonun kronik doğası nedeniyle yüksek bir yayılma potansiyeline sahiptir. Bireysel hayvanlarda enfeksiyon, duyarlılık ve hastalığın ilerleme riski yaşa göre sistematik olarak değişiklik göstermektedir. Bu biyolojik faktörlerin bulaşma üzerindeki etkisini çözmek zordur, çünkü bulaşma hızları, gecikme süresi ve enfekte hayvanların teşhis testlerine verilen immünolojik tepkilerinin tümü, zamanla değişebilir. Sonuç olarak, zengin ayrıntılı sürveyans verilerine ve yüzyılı aşan bir çalışma tarihçesine rağmen, STB epidemiyolojisinde halen aydınlatılması gereken pek çok konu bulunmaktadır (10).

2.3. Epidemiyoloji

MTB, dünya çapında insan tüberkülozunun birincil nedeni olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte; önemli kanıtlar sığır tüberkülozunun nedeni olan MBV'nin insidansının zoonotik TB nin nedeni olarak insanlarda hafife alınabileceğini göstermektedir. 2013 yılında, küresel zoonotik TB sistematik bir incelemesi ve meta-analizinden elde edilen sonuçlar, 15 yıl önce ifade edilen aynı zorlukların ve endişelerin geçerliliğini koruduğunu göstermiştir. İnsanlarda zoonotik TB insidansı, özellikle sığır TB nun endemik olduğu ve insanların enfekte hayvanlarla veya hayvansal ürünlerle doğrudan temasının olduğu bölgelerde detaylı araştırmalar yapılması gerekliliğini göstermektedir (23). 2018 yılında OİE tarafından ülkemizde önemli ekonomik kayıplara neden olan STB ile ilgili 1629 adet yeni salgın bildirilmiştir (19). DSÖ'ye göre, Güney Amerika'da yıllık ortalama 7000 yeni insan MBV kaynaklı tüberküloz hastalığına rastlanıldığını kayıtsız olanların ise insidansının bundan sekiz kat daha fazla olduğu tahmini bildirilmiştir. Çoğu çalışma aksi bildirim yapsa da insanların MBV'nin rezervuarı olarak davranabileceğini bildiren çalışmalar da vardır (4).

2016 yılında OİE verilerine göre, zoonotik TB insanlarda 140.000 yeni olgu ve 12.000 ölüm bildirilmiştir (24).

2019'da küresel olarak tahmini 140.000 (tahmini 69.800-235.000 aralığında) yeni zoonotik TB vakası meydana gelmiştir. Bu tahmin, dünya genelinde zoonotik TB'nin en yaygın nedeni olan MBV ile ilgili verilerden elde edilmiştir (Tablo 1). Diğer mikobakteriyel türlerin de zoonotik TB'ye neden olabileceği düşünüldüğünde, gerçek sayı daha yüksek olabilir (25).

Tablo 1: 2019 yılı Dünya Sağlık Örgütü bölgeleri ve küresel olarak zoonotik TB'ye bağlı tahmini insidans ve ölüm oranı, 2019

DSÖ Bölgesi	Olgu Sayısı		Ölüm Sayısı	
	En İyi Tahmin	Belirsizlik Aralığı	En İyi Tahmin	Belirsizlik Aralığı
Afrika	68.900	18.500-152.000	8.440	2.220-18.700
Amerika Kıtası	870	236-1.910	42	11-92
Orta Doğu	8.190	2.110-18.300	604	161-1.340
Avrupa	986	263-2.180	65	18-143
Güney Doğu Asya	43.400	11.200-96.900	2.020	548-4.440
Batı Pasifik	18.000	4.720-40.000	270	73-594
Küresel	140.000	69.800-235.000	11.400	4.470-21.600

2.4. Epizootiyoloji

İnsan TB kuluçka süresi birkaç haftadan, bir ömür boyu sürebilen bulaşıcı kronik bir hastalıktır. Bu durum STB için de aynı derecede geçerli olabilir, ancak insanlarda ve sığırlarda hastalığın ilerlemesinde önemli farklılıklar vardır. İnsan TB’da, bir tüberkülin deri testine pozitif tepki veren enfekte bireylerin yalnızca küçük bir kısmı (~%10) semptomatik olarak hastalığı geçirmektedir. İnsanlarda TB’nun ilerleme hızı, hastanın yaşına bağlıdır, çocukluk döneminde aktif TB gelişme olasılığı daha yüksektir. Bununla birlikte; yaşlı insanlarda erken dönemde edinilen enfeksiyonun endojen reaktivasyonuna bağlı olarak da hastalık gelişebilir. Bu ikilik, MTB 'nin aktarımının matematiksel modellerinde, bu iki grubu "hızlı" ve "yavaş" ilerleyenlerle ilgili ayrı modellemeler şeklinde yansıtılmaktadır (26). MBV 'nin evcil hayvanlarda ve vahşi yaşamdaki varlığı ile ilgili temel endişelerden biri, insana bulaşma kapasitesidir (6). TB sığırlarda diğer hayvanlara göre daha sık görülür. Çoğu evcil hayvanlarda bu hastalığa duyarlıdır. MBV enfeksiyonunun esas konağı sığır türleri ve insanlardır. Küçükbaş hayvanlarda bu hastalık nadir olarak bildirilmiştir (22). MTBK için konak türlerinin duyarlılığı, bulaşma yolu, mikroorganizmanın miktarı ile farklılık göstermektedir. İnsanlar, insan olmayan primatlar ve kobaylar MTB'e çok duyarlıdır. Sığırlar, tavşanlar ve kediler MBV'e duyarlı ve MTB'ye oldukça dirençlidir. Toynaklı yaban hayvanları

genellikle MBV'ye duyarlıdır, ancak MTB izolasyonu hakkında çok az çalışma mevcuttur. Domuz ve köpekler hem MBV hem de MTB'ye duyarlıdır (1). STB, aktif TB olan hayvanlarının sütlerinin bir işlemle geçirilmeden tüketilmesi sonucu sıklıkla çocuklarda enfeksiyona neden olmaktadır. MBV'nin insandan insana bulaşması bağışıklık sistemi baskılanmış HIV pozitif insanlar dışında nadir görülmektedir (14, 26). STB olan sığırlar tüm vücut sıvıları ile etkeni bulaştırabilirler. Özellikle damlacık yoluyla bulaşma en önemlisidir (27). İnsanlarda STB, hayvanlarda ki hastalık yükü ve hayvan-insan arasında ki bulaşma riskleri dikkate alınmadan anlaşılabilir. MBV'in neden olduğu çiftlik hayvanı popülasyonlarındaki verim kaybı, yoksul topluluklardaki geçim kaynaklarını etkiler. Enfekte sürüler karantina altına alınır ve bu sürülerden sığır satılmasına kesim haricinde izin verilmez. Hayvanlarda STB'nun bu şekilde kontrol edilmesi, evcil hayvanlardan yaban hayatına yayılmanın erken müdahalesi ve önlenmesi insan popülasyonuna bulaşma riskini en aza indirir ve yoksul topluluklar için ekonomik kayıplardan kaçınmayı sağlar (10).

Palatinal lenf nodlarında ki lezyonların varlığı, sığırlarda enfeksiyonun önceden tahmin edilmesini sağlar. Bununla birlikte, bu aşama hastalığın solunum yoluyla bulaşabilmesi için çok fazla bakteriyel yük gereklidir. Bu nedenle enfeksiyonun bulaşması daha az görülmektedir. Ancak enfeksiyonun bu şekilde gelişmesi daha çok keçi ve develerde görülür (7). Hastalığın birincil bulaşma şekli, türe göre ve genellikle ülkelerdeki yerel hayvancılık uygulamalarına bağlı olarak değişir. Sığırlarda ana bulaşma şekli inhalasyondur. Aerosol iletimi özellikle kapalı bir hava sahasında ve kalabalık olan sığır sürüleri için önemlidir. Bunun yanında enfekte su damlacıklarına, otlatma yapılırken erüktasyon ile dışarı atılan damlacıklara maruz kaldıklarında ve enfekte toz parçacıklarını soluyarak da hastalık gelişebilir (7). Pastörize edilmemiş süt ürünleri tüketen veya MBV içeren az pişmiş et ürünlerini tüketen topluluklar ve bireylerin yanı sıra enfekte sığırlarla yakın etkileşime giren kişilerde zoonotik TB'ye yakalanma riski daha yüksektir (28, 29).

MBV, insanlarda TB'un ana sebebi olmasa da MBV 'in etken olduğu insan TB'ü bildirilmektedir. Bunun sebebi ise hasta sığırlardan elde edilen çiğ sütün içilmesi ile bulaşın gerçekleşmesidir (20, 30).

STB, en çok kaynatılmamış, pastörize edilmemiş enfekte sütün yutulmasıyla yayılmıştır. Enfekte hayvanların sütü imha edilmelidir. Bununla birlikte, enfekte bir

sürünün negatif bireylerinden gelen süt doğrudan tüketicilere gönderilemez, ön pastörizasyon gerektirir. Yaban hayatta, yayılmada çiğ kontamine et veya sakatat yenilmesinin rolünün olduğu düşünülse de tam olarak aydınlatılmamıştır. Sütün kaynatılmadan ve etin iyi pişirilmeden yendiği durumlarda mezenterik ve servikal lenfadenit gibi hastalığın klinik formları görülmesi ile ilişkili çalışmalar mevcuttur (6). Dikkate alınması gereken diğer önemli faktörler yoksulluktur. Çünkü imha edilmesi gereken kontamine et ve et ürünlerinin tüketimine yol açar. Yetersiz beslenme ve HIV / acquired immune deficiency syndrome (AIDS) duyarlılığı artırır (25, 31).

MBV ' in insanlarda klinik bulgulara, lezyonlara ve MTB 'in neden olduğu evrime göre ayırt edilemeyen bir hastalığa neden olduğu bilinmesine rağmen, MBV 'in neden olduğu insan enfeksiyonları nadiren bildirilmektedir. TB hastalarından alınan numuneler nedensel ajan tanımlanmaz ve sonuç olarak MBV 'in neden olduğu TB, insanlarda yalnızca özel olarak tahsis edilmiş sürveyans sistemleri tarafından tespit edilebilir. Bu nedenle, hayvandan insana bulaşmanın neden olduğu kayıpların tahmini her zaman zordur. Bununla birlikte, hastalığın prevalansının yüksek olduğu bölgelerde, STB öyküsü olan sürü sahiplerinde TB defalarca teşhis edilmiştir. Moleküler suş tiplendirme tekniklerinin uygulanması, Piemonte 'de son zamanlarda üç olguyu doğrulamış ve STB 'nin nadir olmayan bir meslek hastalığı olduğu ve aynı alanda çalışan veteriner hekimlerde bu şüpheyi kanıtlamıştır (6).

Mevcut ulusal ve Avrupa Birliği yasalarına göre, tüberkülin testi pozitif olan sığırların sağlıklı olanlardan ayrı olarak kesimi yapılır ve postmortem muayeneye sunulur. Karkaslar generalize olmayan durumlarda imha edilmez ve diğer kesilen hayvanlarla aynı kurallara göre tüketime uygun ilan edilir. Karkasın tamamı, yalnızca yaygın TB durumunda insan tüketimi için uygun değildir. Lokalize lezyonlar sadece lezyonlu sakatatın imha edilmesini gerektirir. Et üretimindeki en büyük kayıplar, yetiştiricinin maruz kaldığı enfekte sığırların imhasından kaynaklanmaktadır (6).

Enfekte evcil veya vahşi hayvanlar tarafından solunum sekresyonları, dışkı, idrar, süt veya eksüdatlarla atılan MBV duyarlı hayvanlara doğrudan bulaşabilir. Tipik olarak enfeksiyon, solunum veya yutma ile edinilir. Alternatif olarak enfeksiyon, kontamine bir ortamdan bulaşabilir. MBV 'in bulaşma yolları sığır, koyun, domuz, at, köpek ve kediler dahil olmak üzere çok çeşitli evcil hayvanları enfekte etme yeteneği nedeniyle vahşi

hayvanların temas yoluyla enfekte olması için birçok fırsat vardır. Benzer şekilde, evcil hayvanlarında vahşi hayvan türlerinden enfeksiyon kapma olasılığı yüksektir (6).

2.5. Bağışıklık

Mikobakteriyel etkenler insan vücudunda; solunum yollarındaki anatomik oluşumlar, aksırık, mukosiliyer bariyer, immunglobulin A, makrofajların fagositozu, iltihap hücreleri ve sitokinleri, apoptoz, hücresel ve humoral immünite gibi doğal savunma ile karşılaşmaktadır. Akciğerlere gelen patojen mikobakteriler doğal immünite faktörlerini aşarlarsa üreyerek hastalığa neden olurlar (32). TB basil, fagositin hücre yüzeyi moleküllerine bağlanarak makrofaja girer. TB basilinin fagositler tarafından fagozom veya intrasitoplazmik vakuol içine alınması, mikroorganizmayı serumdaki doğal savunmalardan korur. Basilin yutulmasının ardından lizozomlar, fagolizozomları oluşturmak için fagozomla birleşirler ve burada fagositler basili yok etmeye çalışır. Virülen mikobakteriler, lizozomlarla fagozom füzyonunu inhibe ederek bir mononükleer fagosit içinde hayatta kalır ve böylece asitleşmeyi sınırlarlar. MTBK 'nin patojenitesinin çok faktörlü bir olgu olduğu öne sürülmüştür. Bununla birlikte, konakçı yanıtının, kemoterapi, stres veya HIV nedeniyle bağışıklığın baskılanması düşük CD4 + T hücre sayılarına ve basilin serbest kalarak enfeksiyonun yayılmasına neden olur (1). TB etkenleri, makrofaja toksik ürünlerin salınımına neden olan Fc reseptörü yerine CR1 ve CR3 e bağlanırlar. Kendileri için zararlı olacak olan bu ortamın oluşumunu böylece engellerler. 19 kDa lipoproteini ManLAM oluşacak çok güçlü olmayan makrofaj yanıtının ve nitrojen ara ürünlerinin oluşmasını engelleyerek hücre içi ortamda hayatta kalabilmektedirler (32). Mikobakteriler; Toll-LikeReceptor (TLR)'ler arasından TLR2 ve TLR4 reseptörlerini uyarabilir (33). Mikobakterilerde ki 19 kDa lipoproteini ve lipoarabinomannan, TLR2'ye bağlanarak hücre içi uyarımını ve sitokin oluşumuna sebep olur, bu şekilde makrofaj harekete geçer. Alveolleri kaplayan sürfaktan protein A, mikobakterinin mannoz reseptörüne bağlanmasını güçlendirir (34). Granulom oluşumu hem bakteriyel hem de konakçı tarafından yönlendirilen süreçlerle şekillendirilen dinamik bir ortamdır. Granülomun başlangıcı, enfekte makrofaj ile başlar ve fibrotik bir manşet içinde kapsüllenmiş bir lenfosit halkası ile çevrili çok çekirdekli dev hücrelerin ve lipit dolu köpüklü makrofajların gelişimi ile devam eder (11).

TB olgularında hücresel yanıt daha etkindir, özellikle hastalığın başlangıcında mukozal yüzeylerde antikorlar ve uyumlu sitokinlerle bakterilerin bağlanması engellenir (34). Granülom zararsız hale getirilemeyen mikobakterilerin üremesini durdurur. Bu

yanıt basilin vücut içinde yayılmasını engeller. Bu savunmanın etkinliği virulans faktörlere göre değişmektedir. Granülom ile çevrelenen etkenler immun sistemin zayıflaması ile tekrar üremeye ve yayılmaya devam ederler. IFN- γ , TB etkenlerinin öldürülmesinde en etkili sitokindir. IFN- γ , hücresel bağışıklığın gücüne bağlı olarak kanda değeri yükselmektedir. Dolayısıyla koruyucu immünitede bu sitokinin seviyesinden faydalanılmaktadır(32).

Hücre dışı basiller makrofajları ve diğer immünolojik olarak aktif hücreleri çeker. Bağışıklık tepkisi, basillerin çoğunu öldürür ve kalan basiller, granülomların oluşumu ile sınırlanır. Bu noktada, Mantoux tüberkülin deri testi veya interferon-gama salınım deneyleri kullanılarak tespit edilebilen gizli latent TB enfeksiyonun (LTBE) oluşturulmuştur. Enfeksiyondan sonraki haftalar içinde, bağışıklık sistemi genellikle basilin çoğalmasını durdurarak daha fazla ilerlemeyi engelleyebilir (1). Kazeöz nekroz ile neticelenen tüberkülin merkezinde etkenler canlı kalabilir fakat üreyemez. Bu sınırlama faaliyeti 3-8 hafta sonra tamamlanır. Ancak bağışıklık sistemi güçlü olmayanlar hastalığı bu aşamada sınırlandıramaz. Uzun yıllar tüberkülin içinde canlı kalan etken daha sonra tekrar aktive olabilirler (32).

2.6. Hastalık gelişimi

Mikobakteri etkenleri, yeterli bağışıklık yanıtı veren sağlıklı kişilerin %90 'ında hastalık oluşturmamaktadır (32). Mikobakteriyel enfeksiyonlara mendeliyen kalıtımda ön planda olup, IL12/IFN- γ yolunu etkileyen bozukluklar görülür. Bu gibi durumlarda MBV başta olmak üzere *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. mageritense*, *M. peregrinum*, *M. smegmatis*, *M. scrofulaceum* gibi atipik mikobakterilerle enfeksiyonun şekillendiği de düşünülmektedir. Bu tip enfeksiyonlarda birincil immün yetersizlikler mutlaka düşünülmelidir. Yenidoğan tarama programı ile birincil immün yetersizliklerin erken tanınması durumunda bu hastalara Bacillus Calmette-Guerin (BCG) aşısının uygulanması önlenerek MBV enfeksiyonlarının engellenmesi sağlanabilecektir. Aile öyküsünde immün yetersizlik olan çocuklara BCG aşısı uygulanmadan önce mutlaka birincil immün yetersizlik için inceleme yapılmalıdır (35).

İnsanlarda TB, başta MTB olmak üzere, MTBK türlerinin neden olduğu pulmoner ve sistemik bir hastalıktır. MTB enfeksiyonları, duyarlı bireyler tüberkülin basili içeren damlacık çekirdeklerini soluduklarında ve damlacık çekirdekleri akciğerlerin alveollerine ulaştığında ortaya çıkar. Alveollere ulaşan MTB basili,

alveolar makrofajlar tarafından yutulur ve bu basillerin çoğu yok edilir veya inhibe edilir. Küçük bir miktar hücre içinde çoğalır ve makrofajlar öldüğünde hücre dışına salınır. Eğer yaşıyorsa, bu basiller, lenf veya kan dolaşımı yolu ile daha uzak dokulara ve organlara yayılabilir. TB hastalığının gelişmesi en muhtemel alanlar: akciğerler, böbrekler, beyin, kemikler ve lenfatik sistemi bölgesel lenf düğümleridir. Bu yayılma süreci, bağışıklık sistemini sistemik yanıtlar için hazırlar (1).

Bazı insanlarda, TB basili bağışıklık sisteminin savunmasını aşar ve çoğalmaya başlar, bu durum LTBE 'dan TB hastalığına ilerleme ile sonuçlanır. Bu süreç, enfeksiyondan hemen sonra veya yıllar sonra ortaya çıkabilir. Tedavi edilmediği takdirde, MTB ile enfekte olmuş kişilerin yaklaşık %3-%5'i enfeksiyondan sonraki ilk 2 yıl içinde TB hastalık gelişecek ve diğer %2-%5'i yaşamın sonraki bir döneminde hastalık geliştirecektir. Bu nedenle, MTB ile enfekte olan normal bağışıklık sistemine sahip kişilerin yaklaşık %5-%10'u hayatlarının bir noktasında TB hastalığı gelişecektir. Bağışıklığı baskılanmış kişilerin enfeksiyondan hastalığa ilerleme riski çok daha yüksektir. Örneğin, antiretroviral tedavi almayan HIV ile enfekte kişilerde yıllık %8 ilerleme riski vardır (1).

2.7. Aşılama

MBV BCG aşılı insanlar yaygın olarak kullanılmaktadır. TB'un yetişkin formuna karşı herhangi bir koruma sağlayıp, sağlamadıkları konusunda uzun süredir devam eden bir tartışma olsa da çocuklarda yaygın TB menenjitine karşı bir miktar koruma sağlıyor gibi görünmektedir (36). BCG aşılı, enfeksiyona karşı koruma sağlamadıkları için hayvanlarda kullanılmaz ve hastalığa ilerlemeyi önleme yetenekleri belirsizdir. İnsanlarda aşı başarısız olsa da ilaçlar ile tedaviye başlanabilir. Ancak çiftlik hayvanlarında aşı başarısızlıkları fark edilene kadar diğer hayvanlar için enfeksiyon rezervuarları olacaktır. Bu nedenle, hayvanlara yönelik aşılamanın TB'un kontrolünde pratik değeri olabilmesi için oldukça etkili olması gerekir (1).

Aşı suşu olan MBV-BCG ise MBV 'in 230 kez pasajlanması ile elde edilmiştir (9). BCG, 1908-1921 yılları arasında, sığır sütünden elde edilen MBV'nin 15 günde bir patatesli safralı Sauton Medium'da pasajlanarak attenüe edilmiştir. Suşu attenüe olduğu zaman; patatesli safralı Sauton buyyon, patatesli Sauton Buyyon, patatesli-gliserinli-sığır etli buyyon kullanılarak, 1932' ye kadar pasajlanmıştır (37).

2.8. Tanı

1882 yılında Robert Koch TB basilini mikroskop yardımıyla keşfetmiştir. Saf kültürü izole etmiş, deney hayvanlarında etken ile hastalık oluşturmuştur (13).

MTBK içinde yer alan etkenlerin hastalık oluşturabilecekleri canlılarda ne kadar erken tespit edilirse, korunma ve tedavi o kadar etkili olacaktır. Bunu sağlamak için mikroskopi, kültür, histopatoloji, PPD deri testi, IFN- γ salınım testi, lenfosit proliferasyon testi, serolojik testler; Floresan Antikor, ELISA, Radioimmünasay, Dot-Blot, Komplement Fiksasyon ve moleküler metotlar; PCR, DNA fingerprinting, DNA probları, Oligotiplendirme kullanılabilir (14). OIE tarafından; STB nin ölüm öncesi teşhisinde tüberkülin deri testi ve gamma interferon testi, ölüm sonrası teşhisinde; bakteriyoskopi (Ziehl-Neelsen, Floresans boyama, İmmunperoksidaz), histopatolojik muayene, kültür ve moleküler metotlar önerilmektedir (13). TB teşhis yöntemleri, genel olarak şu şekilde kategorize edilebilir: (i) bakterileri / bakteri komponentlerini tespit etme veya (ii) bakterilere karşı bağışıklık tepkisini saptamaktır. İlki, mikroskopi, kültür, antijen saptama ve nükleik asit saptama deneylerini içerirken, ikincisi antikorları ve aktive T hücrelerini algılayan testleri içerir. Bu testlerin hassasiyeti; numunenin tipi, hacmi, kalitesi, bakteri yükü, mikrobiyal bileşenlerin konsantrasyonu, hastalığın evresi, ve sonuçların işlenmesi ve okunması ile ilgilenen uzmanının becerisine bağlıdır (11).

2.8.1. Mikrobiyolojik Tanı

Düşük ve orta gelirli birçok ülkede, özellikle Afrika ve Asya'da, balgamda aside dirençli basillerin (ARB) doğrudan tespiti, insanlarda akciğer TB teşhisi için hala birincil yöntemdir (11). Mikobakterilerin mikroskopi ile görüntülenmesine izin veren orijinal aside dirençli boyama tekniği, Alman araştırmacı Robert Koch tarafından 1870'lerin sonlarından 1880'lere kadar geliştirildi. İlk keşfinden bu yana çok az değişmiş olan teknik, mikobakterilerin ARB olduğu gözlemine dayanmaktadır. Günümüzde ağırlıklı olarak iki boyama yöntemi kullanılmaktadır. Ziehl-Neelsen (ZN) boyama tekniği, parlak alan mikroskobu ile ARB yi görselleştirir. Auramine-O boyama tekniğinde ise mikobakterilerin görselleştirebilmesi için floresan mikroskobu gerekmektedir (11). 1882 yılında Ehrlich ve Ziehl tarafından önerilen 1883 yılında Ziehl tarafından geliştirilen EZN (Ehrlich Ziehl-Neelsen) ya da ARB yöntemi ile ilk kez boyanarak mikroskopide görüntülenmeleri başarılmıştır (38).

Hücre duvar yapıları nedeniyle mikobakterilerin rutinde kullanılan boyalar ile görünür hale gelmeleri imkansızdır. Boyanın işe yarayabilmesi için suda eriyen bir organik madde içinde eritilmesi ve boyama yapılırken, lamın ısıtılması gerekir. Mikobakteriler aromatik halka içeren fuksin vb. boyalar ya da florokrom boyama ile boyanabilir. Ziehl-Neelsen boyamada karbol- fuksin kullanılır. Bakteri duvarında ki mikolik asit ile fuksin boyası birleşerek, miko-lat-fuksin oluştururlar. Asit-alkol ile dekolarizasyon yapılırsa da, fuksin ile oluşturulan kompleks bakteri duvarından gitmez ve görünür hale gelir (39). Bu tekniğin kullanılmasındaki en büyük kısıtlama, spesifik mikobakteriyel türün belirlenememesi ve mikobakterilerin morfolojik olarak da aside dirençli bakteri cinsleri ile karıştırılabilmemesidir (7).

Floresan mikroskopu, yüksek TB endemik ülkelerde tanı için tercih edilen boyama tekniğidir. Görüntüleme sırasındaki görüş alanı ve görüntüleme hassasiyeti, geleneksel ışık mikroskopundan 17 kat daha fazladır. Bu gelişmiş hassasiyet, düşük konsantrasyonlu yaymalarda da gözlenmiştir. Bununla birlikte, floresan mikroskopu için karanlık bir odaya duyulan ihtiyaç, bu tekniğin çevresel ve kaynak bakımından zayıf ortamlarda uygulanmasını zorlaştırmaktadır. Işık yayan diyot (LED) teknolojisini kullanan yeni düşük maliyetli mikroskopların piyasaya sürülmesi, Auramine-O boyalı slaytların karanlık bir odadan bağımsız olarak görüntülenmesini sağlamıştır (11).

Bir EZN yaymasının en az 20 dakika görüntülenmesi tavsiye edilir, bu da 100 alanın görselleştirilmesine izin verir. Ancak yoğun laboratuvarlarda, personel 20 dakika boyunca tek bir slaydı okumak için motive edilemeyebilir. Çok fazla slayt okumaktan kaynaklanan yorgunluk da konsantrasyonun azalmasına neden olabilir (11).

2.8.2. Kültür

Jensen'in Löwenstein ortamında dekontaminasyon ajanı olarak trisodyum fosfatı kullanması mikobakterilerin kültürü için uzun süredir en çok kullanılan metodoloji olmuştur. Trisodyum fosfat, 72 saatlik maruziyetten sonra bile MTB 'i öldürmediği gösterildiğinden balgam örneklerinin hazırlanması için idealdir. Metodoloji mikroskopiden daha duyarlı ve spesifiktir. Ancak kesin sonuç için 8 hafta gerekmesi , bu yöntemin kullanımında büyük bir dezavantajdır (11).

Kültür, MBV 'nin saptanması ve doğrulanması için her ne kadar tanısal altın standart olarak kabul edilse de duyarlılığı ve özgüllüğü %100 kabul edilmemektedir. Bu durum MBV 'nin eradike edilmesini zorlaştırmaktadır. Kültürün mikobakterileri

tespit etme duyarlılığı, uygun örneklerin toplanması, örneklerin kültür için işlenmesinden önce geçen süre, örneklerin işlenme şekli ve kullanılan kültür ortamı gibi bir dizi faktörden etkilenmektedir. Geleneksel kültür tekniklerini kullanmak, mikobakterilerin çoğunun yavaş üremesi nedeni ile kesin tanı konulmasını geciktirmektedir. Çünkü bazı bakterilerin saptanabilir hale gelmesi, tür tanımlama ve tiplendirme için kullanılabilir hale gelmesi 15 hafta veya daha fazla zaman alabilmektedir. Hastalığın klinik öncesi aşamasında veya gizli taşıyıcı olduklarında kültürde üremenin olmaması, hastanın MTBK 'nin canlı mikobakterilerini içermediği anlamına gelmemektedir (7).

STB etkeni katı besiyerlerinde 4-5 haftada beyaz , kuru, kenarları düzensiz, granüllü, düzensiz tipte koloniler oluşturmaktadır (16).

Mikobakterilerin kültürü amacı ile yumurta bazlı Löwenstein Jensen, Stone Brink's modifiye Middlebrook 7H11, Dorset, Middlebrook 7H9 broth, Herrold' Egg Yolk Agar gibi besiyerleri kültüre yapılacak mikobakterium türüne göre serum, gliserin, albumin, sodyum pirüvat veya mikoobactinJ ile zenginleştirilerek kullanılmaktadır (16). MTB Löwenstein-Jensen besiyerinde ögonik üreme, nitrat redüksiyon ve niasin üretimi pozitif iken, MBV disgonik üreme göstermektedir. Nitratredüksiyon ve niasin üretimi negatiftir (14).

MBV'in kültürde üremesini belirleyen iki önemli faktör vardır. Kültür ortamında birincil karbon kaynağı olarak kullanılan gliserol, MTB için uygun olsada MBV 'in büyümesini inhibe etmektedir. Bu nedenle, kültür üzerinde MBV 'in büyümesini arttırmak için, piruvik asit gibi alternatif karbon kaynağı içeren ortamın kullanılması gerekmektedir. Ayrıca, aerobik mikroorganizma olan çoğu mikobakterinin aksine, MBV mikroaerofiliktir ve kültürlerine doğru çevresel O₂ konsantrasyonunun muhafaza edilmesi gerekmektedir. Örneklerin aseptik koşullarda toplanması ve kültür için hemen işlenmesi önemlidir. 4-6 °C 'de saklanan örnekler mümkün olan en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalı ve toplandıktan sonra 24-48 saat içinde işlenmelidir. Aksi takdirde, saklama ve nakliye için dondurulmaları gereklidir (7).

Hızlı bir TB tanı sistemi olan TK kültür sistemi kullanılmaya başlanmıştır. TK besiyeri, çoklu renk indikatörleri kimyasından yararlanılarak hazırlanmıştır (40).

2.8.3. Hücresel Bağışıklığın Ölçülmesi

-PPD tüberkülin deri testi

PPD testi ilk olarak 1908'de Charles Mantoux tarafından geliştirilmiştir ve o zamandan beri TB enfeksiyonunun varlığını değerlendirmek için nispeten az değişiklik ile standart araç haline gelmiştir. Bu testte, kültürde yetiştirilen MTB tarafından salınan yüzlerce antijenden oluşan bir karışım olan saflaştırılmış protein türevi intradermal olarak enjekte edilmektedir. 48-72 saat sonra enjeksiyon bölgesi, önceki TB'ye maruz kalmanın göstergesi olan sertleşme açısından incelenmektedir. Pozitif bir PPD testi, tip-4, gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonunun bir örneğidir. Bu testte deri içine enjekte edilen antijenler, ciltteki antijen sunan hücreler tarafından alınıp ve yüzeylerinde sunulmaktadır. Daha önce TB basili ile karşılaşma durumunda, hafıza T hücreleri antijenleri bağlamakta ve en önemlisi interferon (IFN- γ) olmak üzere çeşitli sitokinlerin lokal sekresyonu ve karakteristik sertleşme sonuçları ile karakterize edilen bir inflamatuvar tepkinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (41).

PPD testi, yüzyılı aşkın süredir yararlı bir araç olmasına rağmen, çeşitli biyolojik ve uygulama sınırlamaları vardır. İntradermal enjeksiyon doğru şekilde uygulanması, hastanın PPD testi okuması için geri gelmesi ve sertleşme ölçümünün doğru şekilde yapılması gerekmektedir. Zamanında okuma yapılmadığı takdirde, anlamlı veya yorumlanabilir sonuç elde edilememekte veya %10 -50 oranında hatalı sonuç elde edilmektedir (41).

Biyolojik sınırlamalar, daha önce BCG aşılması veya MTBK dışı mikobakterilere maruz kalınması nedeni ile doğru sonuç alınamamasına neden olmaktadır. BCG aşısı, dünyada her yıl 80-100 milyon kişiye yapılmaktadır. Bu aşıda antijen olarak, genetik olarak MTB ile yakından ilişkili mikobakteri türü olan MBV 'den türetilmiş ve saflaştırılmış protein türevi kullanılmaktadır. Bu nedenle, önceden BCG aşısı yapılmış hastalarda yanlış pozitif PPD sonuçları ortaya çıkmaktadır. BCG aşısını yaşamın ilk birkaç günü içinde alan, ancak TB'ye hiç maruz kalmayan çoğu insanın yetişkin olarak PPD testi negatif olabilmektedir. Bu nedenle, CDC (Centers for Disease Control and Prevention), PPD' nin önceki BCG aşılmasına atıfta bulunmadan yorumlanmasını tavsiye etmektedir (41).

PPD reaksiyonu, tipik bir gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonudur. Lenfositlerin aktivasyonu ile salınan lenfokin ve kemotaktik faktörlerin etkisiyle yangı hücrelerin toplanmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda doku hasarı ve nekroz

gelişmektedir. Gecikmiş tip aşırı duyarlılıktan, 10 kDa'luk küçük proteinlerin karışımı olan tüberkülinden başka, CD1 molekülleri üzerinden T lenfositlerine sunulan lipoarabinomannan ve glikolipit (kord faktörü) gibi antijenler de sorumludur (32).

STB için, halen kullanımda olan üç tip tüberkülin testi resmi olarak onaylanmıştır. Bunlar; rutin kontroller için kaudal kat testi (KKT) (1), tek intradermal (SIT) veya tek intradermal karşılaştırmalı tüberkülin testi (SICTT) şeklindedir. SIT testinde sadece sığır tüberkülini PPD-B olan tek tüberkülin kullanılmaktadır. SICTT testinde hem sığır (PPD-B) hem de kuş tüberkülini (PPD-A), birlikte uygulanarak, değerlendirme birlikte yapılmakta ve MBV dışındaki mikobakterilerde elemine edilmektedir. Pek çok ülke STB 'yi sadece deri testi kullanarak, eradikasyonunu sağlamıştır. Tüberkülin deri testi, STB nin teşhisinde standart bir yöntemdir. Hayvanlar canlı iken deri içine 0.1 ml kadar tüberkülin enjekte edilmektedir. Tüberkülin, MBV ve diğer mikobakterilere önceden maruz kalma durumunda, hayvanların çoğunda 72 saat içinde enjeksiyon bölgesinde derinin kalınlaşması ile karakterize, tip IV aşırı duyarlılık reaksiyonuna neden olur. Deri testi sığırlarda ve insanlar dahil çok çeşitli memeli türlerinde kullanılmaktadır (42).

-Gamma interferon (IFN- γ) salınım testi

Bu testte, bir tam kan kültürü sisteminde lenfokin gama interferonunun (IFN- γ) salınımı ölçülmektedir. Sığır IFN- γ tespiti, sığır gama-interferonuna karşı iki monoklonal antikor kullanan bir sandviç ELISA ile gerçekleştirilmektedir. Kan örneklerinin laboratuvara taşınması ve testin mümkün olan en kısa sürede yapılması önerilmektedir. IFN- γ testinin deri testine göre avantajı, hayvanların yalnızca bir kez yakalanmasının gerekmesidir. IFN- γ testi, Avrupa Birliği (AB), ABD, Yeni Zelanda ve Avustralya da dahil olmak üzere bir dizi ulusal programda kullanım için onaylanmıştır (43).

-Lenfosit proliferasyon testi

Bu testler, hayvanın maruz kalmış olabileceği patojenik olmayan mikobakteri türleri ile ilişkili lenfositlerin, "nonspesifik" veya çapraz reaktif antijenlere tepkisini ortadan kaldırarak, testin özgüllüğünü arttırmaya çalışmaktadır. Sonuçlar genellikle PPD-B 'ye yanıt olarak elde edilen değer ve PPD-A'ya yanıt olarak elde edilen değer olarak analiz edilmektedir. B – A değerinin, tanının özgüllüğünü veya duyarlılığını

maksimize etmek için belli bir oranın üzerinde olması gerekmektedir. Testin bilimsel değeri vardır. Ancak alt yapı gerektirmesi, zaman alıcı olması ve deneyim gerektirmesi nedeni ile rutin tanı amacı ile kullanılmamaktadır. IFN- γ testinde olduğu gibi, lenfosit proliferasyon testinin kan alındıktan kısa bir süre sonra yapılması gerekmektedir (43).

2.8.4. Humoral Bağışıklığın Ölçülmesi

TB için ilk serolojik test aglütinasyon testidir. Kompleman Fiksasyon testi (CFT), pasif hemaglütinasyon, jel presipitasyon, immunelektroforez, immunfloresan gibi yöntemlerin spesifite (Sp) ve sensitivite (Sn) değerlerinin yetersiz olduğu anlaşılmıştır (44).

2.8.5. Moleküler Yöntemler

TB tanısında PCR, PCR-REA (Restriction endonuclease analysis), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), oligotiplendirme, spoligotiplendirme, DNA probe gibi moleküler testler kullanılır. MTBK etkenlerinin inkübasyon süresi uzun olması nedeni ile bu testlerin kullanımının kısa sürede sonuç verebilmeleri diğer yöntemlere göre avantaj sağlamaktadır. Ancak bu tekniklerin uzman personele ihtiyaç duyması ve pahalı olması dezavantajdır. Moleküler metotlar, TB nin klinik olguları kısa sürede tanısı için dünyanın bir çok yerinde uygulanmaktadır (45).

Tüm moleküler genotipleme tekniklerinin temeli; bakteriyel genomun belirli bölgelerinde zaman içinde oluşmuş genetik mutasyonlar ile izolatlar arasında benzerliklerin tespitine dayanır. Aynı türün iki bakteri suşu hemen hemen aynı genomlara sahip olsa da farklılıklar birkaç lokusta ortaya çıkar. Bu nedenle, epidemiyolojik olarak ilişkili suşlar aynı veya çok benzer genetik profiller gösterirken, ilgisiz klinik izolatlar farklı modellere sahip olacaktır (6).

Moleküler epidemiyolojik tekniklerin kullanımı, gelişmiş ülkelerde STB'nin kökenini, yayılmasını ve salgınları analiz etmek için yaygın bir uygulama haline gelmiştir. Spoligotiplendirme, silme analizi, MIRU-VNTR ve RFLP kullanılarak, farklı MBV tiplerinin dağılım ve hareketinin gelişen bir modeli belirlenebilir (7).

DNA tabanlı çalışmalardan önce, mikobakteriyel ekoloji, patogenez ve epidemiyoloji hakkında bilinenlerin çoğu, bakterileri tanımlamak için kullanılan eski yöntemlerden geliyordu. Bu tür yöntemler, koloni morfolojisi, antimikrobiyallere duyarlılık, biyokimyasal ve serolojik reaktivite ve mikobakteriyel faj tiplemesi dahil olmak üzere suş fenotipik özelliklerine dayanıyordu. Bazıları hala değerli olsa da bu tür

fenotipik yöntemlerin yerini büyük ölçüde mikobakteriyel genomlardaki yapısal genetik çeşitliliğe indeksleyen yöntemler almıştır (10).

MIRU-VNTR genotiplemesinde, belirli bir lokus içindeki tekrar birimlerinin sayısı, tüm lokusun PCR amplifikasyonu ve ardından tekrar sayısının PCR amplikonunun boyutuna göre belirlendiği jel elektroforezi ile belirlenir. Mikobakterilerde izolatlar genom boyunca dağılmış çeşitli MIRU-VNTR lokuslarında spesifik tekrar birimlerinin kopya sayısının belirlenmesiyle yazılır. Bu kısa sekanslı tekrar birimleri 52-77 nükleotit uzunluğundadır ve bu lokuslar minisatellit bölgeleri olarak sınıflandırılır. MIRU minisatellit bölgeleri üç ana türe ayrılmıştır bunlar ; 77 nükleotid tekrar biriminden oluşan tip 1, tip 1 sekansın 3 kısmında 24 bp boşluğa sahip olan tip 2 ve tip 1 sekansın 5 kısmında 15 bp boşluğa sahip olan tip 3 (6).

IS6110-RFLP, IS3 ekleme elemanları ailesine ait olan yer değiştirebilir bir elemandır ve sadece MTBK üyelerinde bulunur. Bununla birlikte, genomda bulunan toplam IS6110 kopya sayısı, çeşitli MTBK türleri arasında büyük ölçüde farklılık gösterir. Örneğin, MTB genomu 19 adede kadar IS6110 kopyası barındırabilirken, MBV yalnızca bir ile beş kopya içerir. IS6110-RFLP'nin MTB için standart referans tiplendirme tekniği olmasına önemli ölçüde katkıda bulunmuştur. Ne yazık ki IS6110-RFLP, MBV izolatlarını ayırt etmek için çok kullanışlı değildir çünkü MBV suşları sadece bir ile beş IS6110 kopyası barındırır (6).

Spoligotiplendirme, MTBK 'nin üyelerini tanımlamak ve genotiplendirmek için hızlı, PCR tabanlı bir yöntemdir. Güvenilir bir tekniktir, veriler tekrarlanabilir ve laboratuvarlar arasında kolayca paylaşılabilir, bu nedenle tiplendirme tekniklerinin en yaygın kullanımı olanıdır. Verilerin ikili dijital biçimde sunulması ve MBV 'nin moleküler karakteristiğinin en büyük güncel koleksiyonunun oluşturulması nedeniyle kullanımı küresel olarak benimsenmiştir. Ortaya çıkan modeller, küresel spoligotip veri tabanında (www.mbovis.org) saklananlarla karşılaştırılır ve eğer benzersiz ise, kimlik numaraları yeni spoligotip desenlerine verilir (7). PCR, söz konusu patojenin MBV, MTB veya grubun herhangi bir üyesi olup olmadığını ayırt etmede hayati önem taşıyan MTBK üyelerini tanımlayabilir. Spoligotiplendirme ve / veya VNTR profili kullanarak genotiplendirme, MTBK türleri için klasik tiplendirme araçlarıdır (42).

2.8.6. Deney Hayvanı Testleri

Deney hayvanı olarak genellikle kobaylar kullanılmaktadır. Marazi maddelerden hazırlanan inokulum (0,5 mg bakteri/ml), kobayların inguinal lenf yumruları yakınına deri altı olarak 0,2-0,3 ml enjekte edilmektedir. 6-8 hafta sonra hayvanlara nekropsi yapılarak iliakal ve subiliakal lenf düğümlerinden bakteriyoskopi ve kültür yapılmaktadır (14).

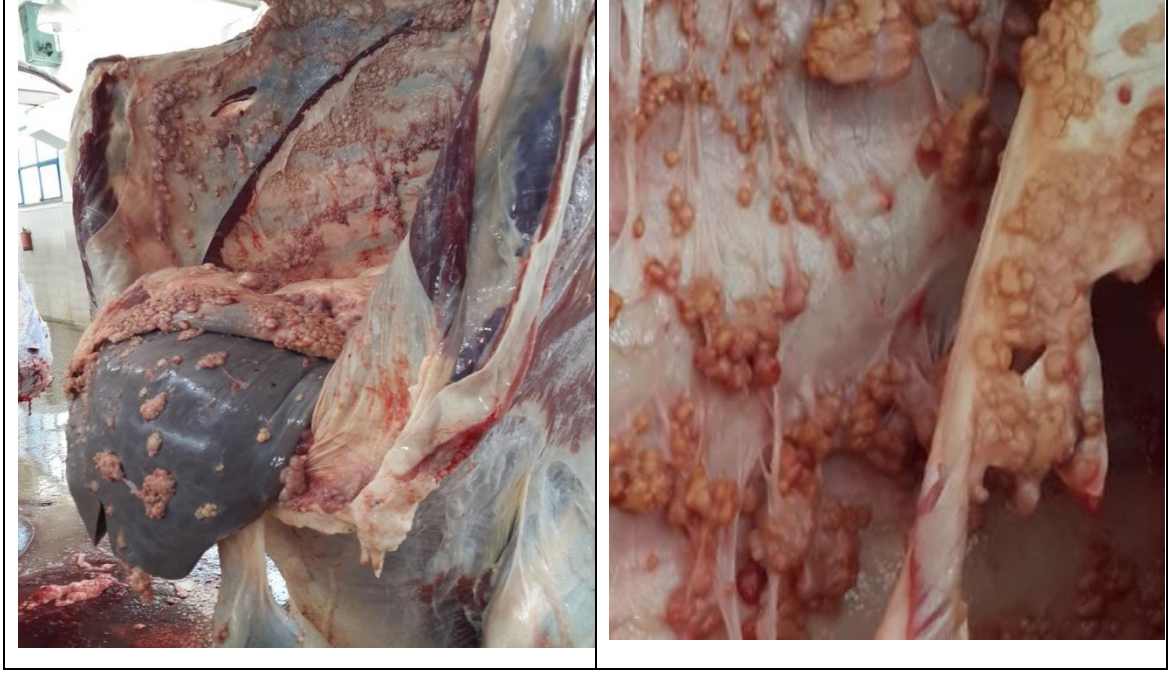
3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Cihaz Gereç ve Solusyonlar

- Otomatik Pipetler(isolab)
- Bunsen Beki
- Thermal Cycler(labnet)
- Elektroforez Tankı ve Güç Kaynağı(Majör Science)
- Hassas Terazi (Bel)
- Vorteks (VSM)
- Santrifüj (İsolab)
- İnkübatör(termal)
- Otoklav (termal)
- Steril laminar akımlı güvenlik kabini(Bilser Class II)
- Benmari (termal)
- Hotplate Stirrer(Benchmark)
- Işık Mikroskopi (olympus)
- Derin Dondurucu(nüve)
- İnsineratör(zenon)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Santrifüj (İsolab)
- UV görüntüleyici
- Cryovial Tüp 2 ml
- Cam boncuk
- PCR tüpü (0.5 mL -1,5 ml)
- Mikropipet ucu (1-20-1000 µL)
- %95'lik etil alkol(sigma)
- Asetik asit(sigma)
- Agaroz (sigma)
- Tris-base (sigma)
- Borik asit (sigma)
- Etilen diamintetra asetik asit (EDTA sigma)
- Etidyumbromide
- Sodyum Hipoklorit

3.2. Çalışma Grubu ve Örnekler

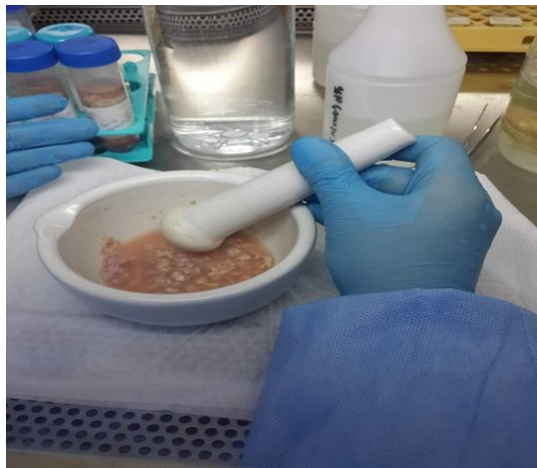
Çalışmada Adıyaman ilinde 10.10.2017- 31.12.2018 tarihleri arasında, özel Saf Et kesimhanesinde kesimi yapıldıktan sonra, tipik granülamatöz lezyonu saptanan sığır karkaslarından alınan 44 doku örneği kullanıldı (Şekil 1). Örnekler steril 50ml'lik santrüj tüplerine alındıktan sonra, çalışma gününe kadar -20 °C'de saklandı.



Şekil 1: Sığır karkaslarında granülom görüntüsü

3.3. Doku Örneklerinin Havanda Ezilmesi

Mikroskopi ve kültür işlemleri için örnekler steril kum ve fosfat tamponu(PBS) solüsyonu kullanılarak, porselen havanda ezildi (Şekil 2).

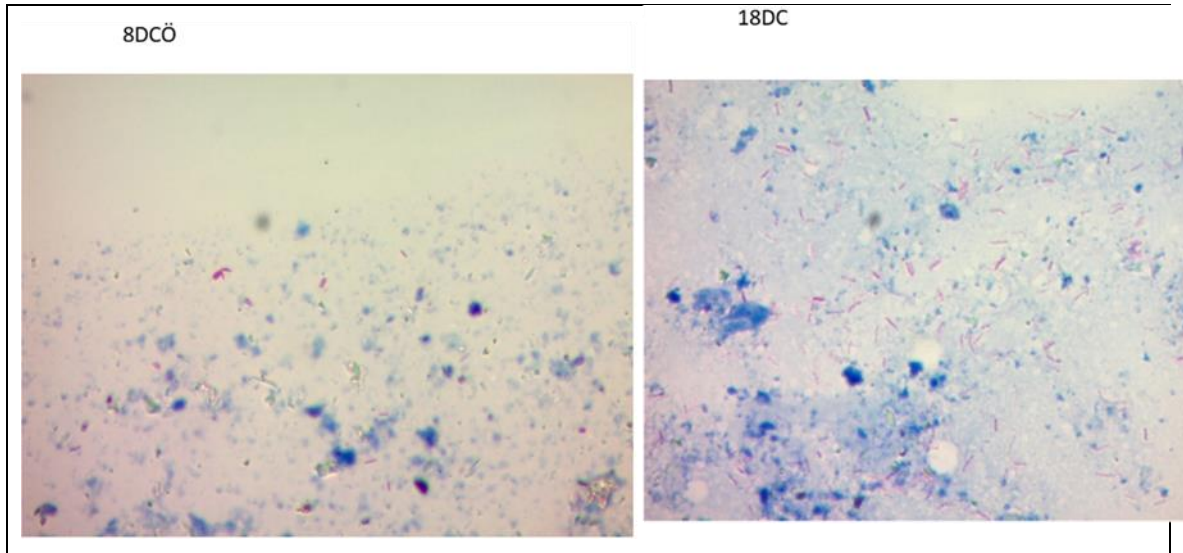


Şekil 2: Granülom içeren karkas numunelerinin havanda ezilmesi

Bu aşamadan sonra %4 NaOH-NALC yöntemi ile dekontamine, homojenize ve konsantre edildi. Yöntem şu şekilde uygulanmıştır; Ezilmiş dokulardan elde edilen solüsyon miktarı kadar NALC-NaOH çözeltisinden eklenerek 5 dk vortekslendi. 15 dk beklenecek 5 dk santrifüj edildi. Tüpteki çözeltinin üzerine, fosfat tamponu eklenerek alt üst edildi ve 15 dk 4000rpm de santrifüj edildi. Santrifüj olan sıvıların üst kısmı atıldı ve kültür işlemine hazır hale getirildi. Homojen hale getirilmiş örnekler tüplere toplanarak süspanse edildi.

3.4. Mikroskopi

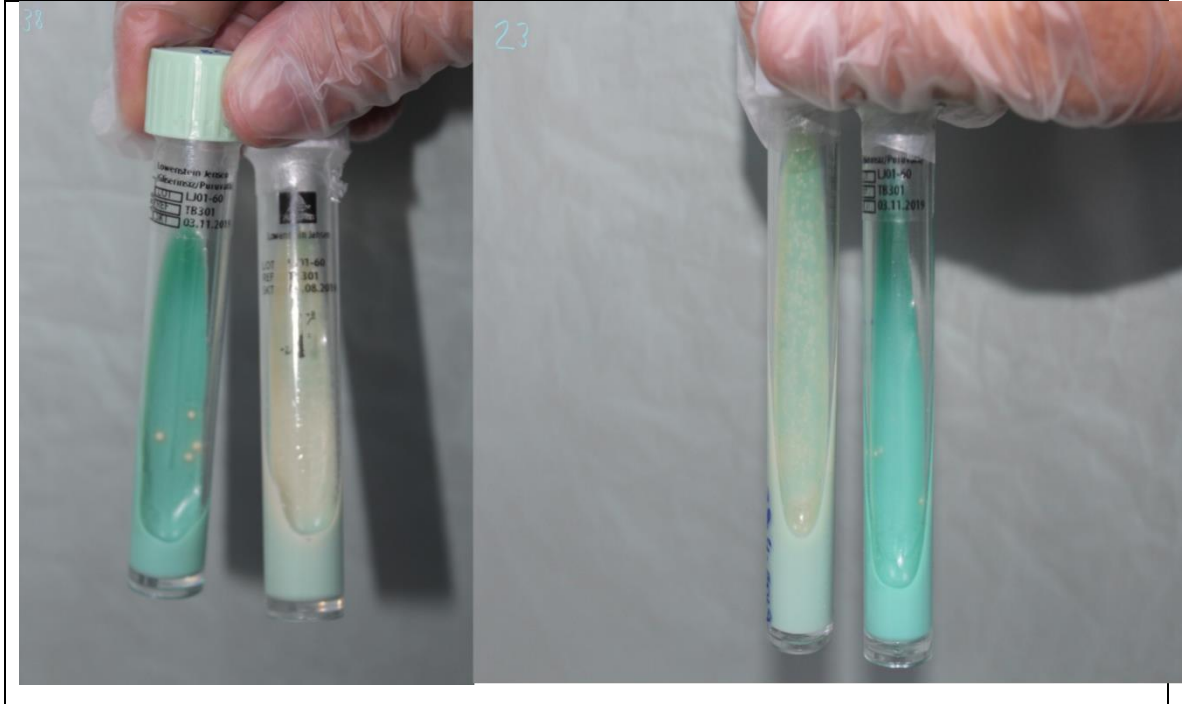
- Hazırlanan preparatlar 10 dakika ultraviyole (UV) ışık altında bekletildi.
- Bek alevinden 3 kez geçirilerek tespit edildi.
- Lam üzerine karbol fuksin solüsyonu konularak alttan 4-5 dakika alkol alevinde ısıtıldı.
- Boya dökülerek asit-alkolde 30 sn renksizleştirildi.
- Distile Su ile yıkandı.
- Preparat üzerine metilen mavisi dökülerek 10-15 sn boyandı.
- Preparat yıkanarak kurutuldu, Bioküler ışık mikroskopunda immersiyon objektifte incelendi. Mikobakteriumlar pembe, diğer mikroorganizmalar ve zemin mavi renkte gözlendi (Şekil 3)



Şekil 3: EZN Boyama ile MBV 'nin ışık mikroskopundaki görünümü

3.5. Kültür

DHK işleminden sonra, ayrılan her bir örnekten hem Pirüvatlı hem de pirüvatsız LJ besi yerine ekim yapılarak 37 °C de inkubasyona bırakıldı (Şekil 4). 15. Haftaya kadar besiyerleri takip edildi. Kontaminasyon gelişenlere tekrar ekim yapılarak inkubasyona bırakıldı.



Şekil 4: Pirüvatlı ve pirüvatsız LJ besiyerinde MBV 'nin üreme görüntüsü

3.6. PCR

DNA izolasyonu porselen havanda ezme işlemi sonrası alınan solüsyondan Mickle DNA izolasyon cihazı (Mickle Tissue Disintegrator) kullanılarak yapılmıştır.

PCR testi ile MBV 'nin IS6110 insertion sekansına ait;

-IS6110 Fo1; CGTGAGGGCATCGAGGTGGC

-IS6110Rev2; CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG

Primerleri kullanılarak 252 bp lik bölge çoğaltılmıştır. % 1,5 agarose jelde görüntü alınmıştır. Her çalışmada pozitif (*M. bovis*, H37Ra veya genotipi bilinen klinik izolat) ve negatif kontrol distile su (dH2O) kullanıldı. Her bir suş için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı.

29,2µl dH2O

5 µl 10x PCR buffer

4 µl MgCl2

0,3 µl primer 1

0,3 µl primer 2

0,2 µl Taq polimeraz

10 µl Kalıp DNA PCR reaksiyon karışımı içeren tüpler Termal Cycler Cihazına (Labnet) yerleştirilerek aşağıdaki programda çalıştırıldı;

95°C 5 dakika

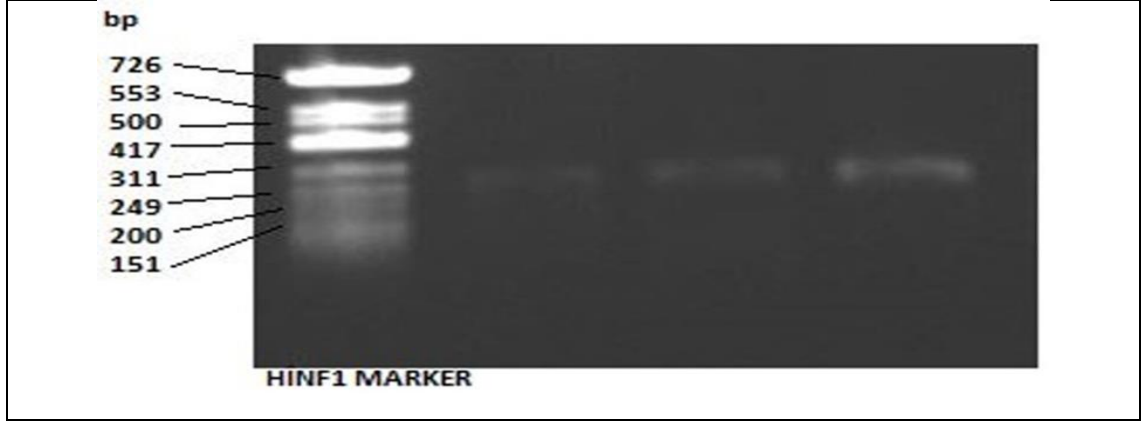
94°C 1 dakika 30sn
65°C 2dakika
72°C 3 dakika

} 40 döngü

72 °C 10 dk

4 °C ∞

PCR ürünleri %2'lik agarose jel elektroforezi de ethidium bromide varlığında 90 V'da 25 dk yürütüldü. Elde edilen DNA bantları UV transillüminatörlü jel dökümantasyon sisteminde molekül ağırlık belirteçleri (HaeIIIφX174 DNA Marker ve X174 DNA/HinfI Marker) ile karşılaştırılmalı olarak değerlendirildi. Her çalışmada pozitif kontrol (HCTP H37Ra ve/veya genotipi bilinen klinik izolat) ve negatif kontrol kullanıldı. 256 bp büyüklüğündeki bantlar pozitif kabul edildi (Şekil 5)



Şekil 5: In-House PCR yöntemi ile çoğaltılmış MBV örneklerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

3.7. Spoligotiplendirme

Kültür pozitif örneklerden toplanan koloniler Mickle DNA izolasyon cihazı (Mickle Tissue Disintegrator) kullanılarak izolasyonu yapılmıştır. İzolatlar, Kamerbeek ve arkadaşları tarafından tarif edildiği gibi spoligotiplendirildi (46). DR lokusunda bulunan 43 Spacer varlığı veya yokluğu ikili bir kodla temsil edildi ve aşağıda belirtilen algoritmaya göre spoligotip sekizlik kodlara çevrildi. Spoligotyping pattern isimleri, uluslararası MBV spoligotype veritabanının (www.mbovis.org) isimlendirmesine göre atandı.

Spoligotyping analizinde aşağıda ki oktal kodları kullanılmıştır.

□□□ = 0 ■□□ = 4

□□■ = 1 ■□■ = 5

□■□ = 2 ■■□ = 6

□■■ = 3 ■■■ = 7

□ = 0 ■ = 1 Spacer 43

4. BULGULAR

Kesimhane de kesimi yapılan 44 sığırdan alınan doku örnekleri kum ile ezilip, süspanse edildikten sonra, tüm örnekler DHK işlemi öncesi ve sonrasında EZN boyama ve kültür yapıldı. Yapılan testlere ait sonuçlarımız Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2: Mikroskopi, kültür ve PCR Test Sonuçları.

sıra no	MİKROSKOPİ		PURUVATLI	PURUVATSIZ	PCR
	DC	DCÖ			
1	-	-	-	+	+
2	-	-	-	+	+
3	-	-	+	+	+
4	-	-	+	+	+
5	+	+	+	+	+
6	-	+	+	+	+
7	+	+	-	-	+
8	+	+++	+	+	+
9	+	-	-	+	+
10	-	-	-	-	+
11	+	-	+	+	+
12	-	-	-	-	-
13	-	-	-	+	-
14	-	-	-	-	+
15	+	+	+	-	+
16	-	-	-	-	+
17	-	-	-	-	+
18	+	+	+	+	+
19	-	-	-	-	+
20	-	-	+	+	-
21	-	-	+	-	+
22	-	+	+	+	+
23	-	-	+	+	+
24	-	-	-	+	+
25	+	-	-	-	+
26	-	-	+	-	+
27	++	++	+	+	+
28	-	-	-	-	+
29	++++	+	+	+	+
30	-	-	-	+	+
31	+	-	-	+	+
32	-	-	+	+	+
33	+++	+++	+	+	+
34	++++	++++	+	+	+
35	++++	++++	+	+	+
36	-	-	-	+	+
37	++	++++	+	+	+
38	++	++	+	+	+
39	++	+	-	+	+
40	-	-	+	+	+
41	-	-	-	-	+
42	-	-	+	+	+
43	-	-	+	+	+
44	+++	-	-	-	-

DCÖ: DHK işleminden önce yapılan incelemeyi, DC: DHK işleminden sonra yapılan incelemeyi belirtmektedir.

Mikroskopi yöntemi ile DHK işlemi öncesi yapılan incelemede 44 örneğin 15 (%34.09) 'inde, DHK işlemi sonrasında ise 18 (%40.90)'de pozitiflik saptandı (Tablo 3)

Tablo 3: Mikroskopi, kültür ve PCR testlerin pozitiflik oranları

Yöntem	Mikroskopi		Kültür		PCR
	DCÖ Mikroskopi	DC Mikroskopi	Pirüvatlı Besiyerinde Üreme	Pirüvatsız Besiyerinde Üreme	
Doku Örneği (n:44)	15/44(%34.09)	18/44(%40.90)	24/44(%54.54)	30/44(%68.18)	40/44(%90.90)

DCÖ: Dekontmaninasyon – Homojenizasyon - kontrasyon öncesi, **DC:** Dekontmaninasyon -homojenizasyon - kontrasyon sonrası

Pirüvatlı ve pirüvatsız LJ besiyerinde konvansiyonel kültür yöntemi ile yapılan incelemede;

44 örneğin, pirüvatlı besiyerinde 24 (%54.54)'de, pirüvatsız besiyerinde 30 (%68.18) oranında pozitif sonuç elde edildi.

Doku örneklerinin PCR testi ile yapılan değerlendirmede ise 44 örneğin 40 (%90.90) 'ında MBV DNA pozitif saptandı.

Pirüvatlı ve pirüvatsız LJ besiyerinde kültür sonuçları altın standart olarak kabul edildiğinde mikroskopi ve PCR testlerinin MBV 'i saptamadaki duyarlılık, özgüllük, Pozitif Belirleyicilik Değeri (PBD) ve Negatif Belirleyicilik Değeri (NBD) değerleri Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4: Duyarlılık, Özgüllük, PBD ve NBD değerleri

Yapılan Testler	GERÇEK(+)	GERÇEK(-)	YALANCI (+)	YALANCI (-)	DUYARLI LIK	ÖZGÜLL ÜK	PBD	NBD
DCÖ mikroskopi	15	9	1	19	44	90	63	32
DC mikroskopi	15	8	3	18	45	73	65	31

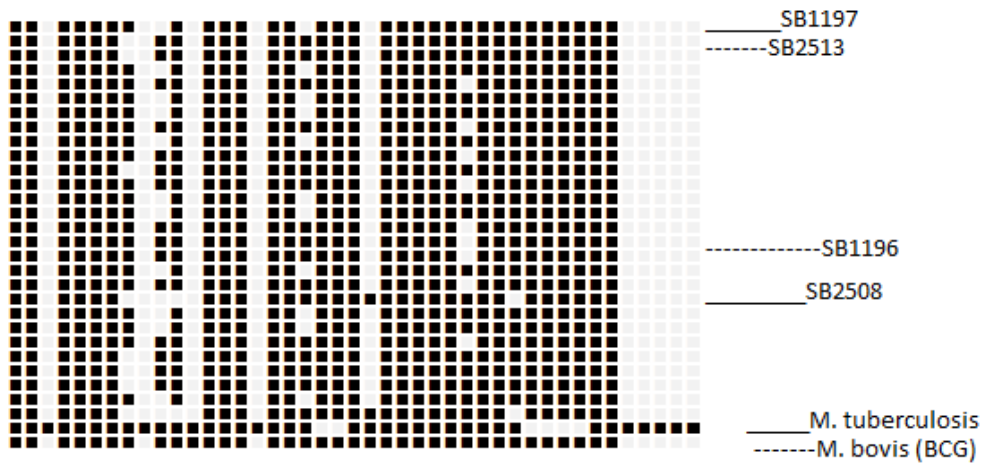
PCR	31	2	9	2	94	18	94	50
Duyarlılık =Gerçek Pozitif Değer / Gerçek Pozitif Değer+ Yalancı Negatif Değer Özgüllük =Gerçek Negatif Değer/ Gerçek Negatif Değer + Yalancı Pozitif Değer Pozitif Belirleyicilik Değeri =Gerçek Pozitif Değer/ Gerçek Pozitif Değer + Yalancı Pozitif Değer Negatif Belirleyicilik Değeri =Gerçek Negatif Değer / Gerçek Negatif Değer +Yalancı Negatif Değer								

Bu sonuçlara göre DHK öncesi ve DHK sonrasında mikroskopi yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü sırası ile %44, %90 ve %45, %73 olarak bulundu. PCR testi için ise bu oranlar sırası ile %94 ve 18% olarak saptandı. Kültür yöntemi ile izole edilen örneklerde spoligotiplendirme yöntemi ile yapılan değerlendirmesi Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5: MBV izolatlarının spoligotiplendirmesi

Spoligotype pattern	Octal kod	Hexadecimal	Örnek sayısı
SB1196	676673757577600	6F-5B-5F-5F-7F-60	9/28 (%32.1)
SB1197	674673757777600	6F-1B-5F-5F-FF-60	11/28 (%39.2)
SB2508	674073777757600	6F-03-5F-7F-EF-60	2/28 (%7.1)
SB2513	676273357777600	6F-4B-5B-5F-FF-60	6/28 (%21.4)

Bu test ile incelenen izolatlarının tümü MBV olarak tanımlandı. İzolatlar arasında 4 farklı pattern tespit edildi (Şekil 6). Siyah kareler pozitif hibridizasyon sinyallerini ve beyaz kareler hibridizasyon eksikliği temsil eder.



Şekil 6: *M. bovis* izolatlarının spoligotip modellerinin grafiksel gösterimleri.

5. TARTIŞMA

MBV etkeni insanlarda oldukça nadir tespit edilen bir mikobakteri türüdür. MBV 'nin fenotipik yöntemlerle tiplendirilmesi çok güç olduğu için, laboratuvarlarda tanımlaması genellikle MTBK olarak yapılmaktadır. Ülkemizde MBV patojen olarak insanlarda nadir olarak tespit edilmektedir. Ayrıca, MBV genelde akciğer dışı seyrettiği için multidisipliner tanı yaklaşımı ile gözden kaçmaktadır (9).

Çalışmamızda kültür altın standart olarak kabul edilmiştir DHK işleminden önce yaptığımız EZN boyama ile etken tespiti tablo 4'e göre Sn %44 ve Sp %90 olarak tespit edilmiştir. 5 örnekte DHK işlemine tabi tutulduğu zaman ancak pozitif olarak kaydedilebilmiştir. DHK işleminin önemi bu sonuç ile bir kez daha kanıtlanmıştır.

MBV'nin kültürü için piruvatlı ve piruvatsız 2 farklı besiyerine ekim yapılmıştır. Her ne kadar piruvatın MBV 'nin üremesini artırdığı (16, 47) iddia edilse de, çalışmamızda 8 haftadan daha uzun süre inkubasyonda kalan, MBV 'in piruvatsız besi yerlerinde de üremesinin, (%68.18), oranında piruvatlı besiyerlerinde ki üremelerden (%54.54) daha fazla pozitiflik verecek şekilde tespit edilmiştir. Ancak koloni morfolojisi şekil 4 de görüldüğü gibi piruvatlı besiyerinden daha farklıdır.

Bu çalışmada STB olduğu düşünülen 44 sığırdan topladığımız granulom tespit edilen dokularda EZN boyama yöntemi ile yaptığımız ile incelemede %45.45 (20/44) pozitiflik saptandı. 2006 yılında Proano-Perz ve ark. 29 SCITT pozitif sığırın 3'ünde (%10.3) EZN pozitif tespit etmişlerdir (48). 2013 yılında Nasr ve ark. 50 PPD pozitif inek sütünün 7'sinde (%14), 50 PPD negatif sığır sütünün 3'ünde (%0,6) EZN boyama ile basilleri göstermişlerdir (49). Kuriave Gathogo, 176 örnekte 29 örnekte mantarla kontamine preparatlarda mikobakterileri EZN boyama ile tespit ettiklerini bildirmişlerdir (50). 2013 yılında Chuwku ve ark., 50 sığır ve 50 keçiden aldıkları TB olabilecek lezyonlar bulunan akciğer örneklerinden 15 sığıra ait örneği, EZN yöntemi ile %30 pozitif bulmuşlar ve keçi örneklerinde pozitiflik saptamamışlardır (51). 2013 yılında Kuriave Gathogo, 176 karkastan topladıkları lezyonlu dokuların EZN ile 35'inde (%20) mikobakteri benzeri basiller bulduklarını duyurmuşlardır (50). Awah-Ndukum ve ark., ise 2013 yılında, 219 lezyon bulunan sığır dokusunun 169'unu (%77.17) EZN boyama ile basilleri göstermişlerdir (52). GutierrezCancela ve GarciaMarin TB lezyonlu keçi ve sığır doku örneklerinin 22/42(%52.3) (53), Ortatatlı ve ark., 31/49(%63.26) (54), Beytut, 20/32 (%62.5) (55), EZN boyama ile mikobakterileri gösterirken,

Fitzgerald ve ark., yabani hayvanlarda 73/220 %33.18 kültür pozitif olarak tespit etmişlerdir (56). 2009 yılında Adu-Bobi ve ark. TB şüpheli sığırdan EZN ile 95/130'inde (%73) pozitiflik bulmuştur (57).

Bizim çalışmamızda topladığımız 44 örneğin 40 (%90.90)'ında MBV izole edilmiştir. Tuzcu 2013 yılında 5018 adet sığırdan kesim sonrası alınan örneklerden 32 (% 0,63)'sinde MBV izole edilmiştir (58). 2013 yılında Ereğat ve ark., 44 keçi ve 60 sığıra ait 104 akciğer ve mezenter lenf düğümünde 4 adet (%3.84) PCR pozitiflik bildirmişlerdir (59). Ünver ve ark., Kars bölgesinde sığırlarda PCR ile MBV nin %6.7 (8/120) oranında tespit edilmiştir (60). Kayseri bölgesinde Gümüşsoy ve ark., mezbahalarda kesilen 3216 sığırdan yaptıkları incelemede STB prevalansını %1.49 olarak saptanmıştır (61). Solmaz ve ark., tarafından Van bölgesinde yapılan çalışmada, sığırlarda PCR ile %1.42 oranında MBV prevalansı bildirilmiştir (62). Bizim çalışmamıza göre bu oranların düşük olması sadece STB şüpheli sığırlardan alınmamasıdır.

İnsanlarda tespit edilen MTBK araştırmaları da şu şekildedir; Türkiye'de zoonotik tüberküloz olgu prevalansını gösteren epidemiyolojik veriler yetersizdir. Birçok çalışmada mikobakteriler, tür seviyesinde tanımlanamamıştır. Elazığ'da Ağaçayak ve ark, 60 TB hastasından aldıkları balgam örneklerinin tümü EZN pozitifdir. PCR-RFLP metodu ile MTBK izolatlarının 34 (%77.3)'ü MTB, 8 (%18.2)'i MBV, 1 (%2.3)'i *Mycobacterium microti* ve 1 (%2.3)'i *Mycobacterium africanum* olarak tanımlanmıştır (63).

İstanbul'da Bayraktar ve ark., tarafından yapılan bir çalışmada 8/188(%4.25) MBV tespit edilmiştir. Bu olguların tümünün akciğer dışı TB olduğu belirlenmiştir (64).

MBV kaynaklı TB oranını İspanya %2.2, Fransa %2.9, Avusturya %0.85-0.94, Almanya %1, Türkiye %1.31-5.85 olarak bildirmiştir (65). Silva ve ark., Brezilya merkezi bir şehri olan Juiz de Fora'da TB tanısı almış 189 kişiden MBV yaygınlığını (% 1.6) olarak bildirmişlerdir (66). Dört ülkeden MBV genomlarının oranı şu şekildedir; Amerika Birleşik Devletleri (828 / 1.969;% 42.05), Yeni Zelanda (510 / 1.969;% 25.90), Meksika (425 / 1.969;% 21.58) ve Kuzey İrlanda(116 / 1,969;% 5,89) (67).

1995 yılında Liebana ve ark. 49 MBV kültür pozitif sığırdan 35'ine (%71,4), kültür negatif 32 sığırdan 2'sine (%6,25) ait doku örneklerinde MTBK PCR pozitif

sonucu elde etmişlerdir (68). 1998 yılında Vitale ve ark., PPD pozitif sığırlarda, süt ve lenf nodüllerinde PCR, Sn ve Sp yi %100 olarak bildirmişlerdir (69). 1999 yılında Romero ve ark., PPD negatif örneklerin %12'sinde (70), 2005 yılında Cedeno ve ark. , PPD negatif örneklerin 3'ü (%5), PPD pozitif 60 sığra ait örneğinin 39'unda (%65) PCR ile MBV tespit etmişlerdir (71). 2001 yılında Livingstone , STB yi antemortem olarak uyguladığı PCR testinin Sn %65-90, Sp %98-99 olarak bildirmiştir (72). 2007 yılında Yardımcı ve ark., 36 adet lezyon bulunan lenf nodülünün 9 'unda (%25) PCR ile MBV pozitif bulmuştur (47). Bizim çalışmamızda klinik örneklerden izole ettiğimiz etken pozitiflik oranı 40/44 (%90.9) dır. Bahsedilen çalışmaların çoğunluğu ile uyumludur.

1999 yılında Zumarraga ve ark., Güney Amerika'da ki farklı ülkelerden elde sığırlardan elde ettiği 224 MBV izolatını spoligotyping yöntemi ile 41 farklı tip paterni tespit etmişlerdir. 202 örneğin (% 90) 19 grup oluşturduğunu ve en geniş grupta 96 örnek bulunduğunu bildirmişlerdir (73). Cowan ve ark., 180 MTBK'ya ait spoligotiplendirme yöntemi ile içerisinde 137 izolatin bulunduğu 16 küme, 43 tek üyeli küme ve toplam 59 farklı patern elde etmişlerdir (74). Oral Zeytinli ve Köksal 'ın Çukurova Bölgesindeki TB'li hastalardan aldıkları 467 örneğe spoligotiplendirme yöntemiyle 443 örneğin 21 grup oluşturduğunu, 2 örneğin de MBV olduğunu (%0,4) rapor etmişlerdir (75). Ülkemizde izole edilen MBV örneklerinin genotiplendirme çalışmalarının sonuçlarının uluslararası veri tabanları ile karşılaştırılarak bu veri tabanlarına yeni bulunan patternlerin bildirilmediği görülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İnsanlarda MBV insidansı tam bilinmemektedir. STB' nin taşınmasında insanların da rol oynayabileceği bilinmektedir (13). Dünya çapında 2019 yılında 11.400 olan küresel ölüm oranıyla 140.000 zoonotik TB olgusu tespit edilmiştir.(tablo 1) (25). Türkiye'de ise zoonotik TB olgu prevalansını gösteren epidemiyolojik veriler yetersiz kalmaktadır (20). TB, önemli bir küresel sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. DSÖ, 2035 yılına kadar küresel TB salgınına sona erdirmek için iddialı END-TB Stratejisi 2016–2035'i geliştirdi (28). Bu küresel hedef, sığırlarda TB'nin ana etkeni olan MBV nin zoonotik geçiş ve biyolojisinin etkisi dikkate alınmadan gerçekleştirilemez (8).

MBV'in tanımlamasında mikrobiyolojik testlerin yeri önemlidir. Bulaş kaynağının belirlenmesi ve etkili kontrol önlemlerinin alınmasında enfeksiyon zincirinin tanımlanması ve gerekli izolasyon önlemlerinin alınması kritik önem taşımaktadır. Mikrobiyolojik yöntemlerin birlikte kullanılması tanısallık değeri arttırmaktadır. Inhouse-PCR testi doku örneklerinde MBV DNA'sının belirlenmesinde hızlı ve pratik bir yöntemdir.

Nokta surveyans yöntemi ile yaptığımız bu çalışmada STB nin tüm dünyada olduğu gibi Adıyaman ilinde de yaygın olduğu, sığırlardan alınan doku örnekleri ile tespit edilmiştir.

İl düzeyinde belirli bir lokasyonda yapılan çalışmada dört farklı epidemiyolojik tip saptanmıştır. Enfeksiyonun önlenmesi ve kontrol altına alınmasında daha geniş epidemiyolojik çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Thoen CO, Steele JH, Kaneene JB (eds). *Zoonotic tuberculosis: Mycobacterium bovis and other pathogenic mycobacteria*. Ames, Iowa: Wiley Blackwell, 2014.
2. Özbey G, Kalender H, Muz A. Sığır tüberkülozu'nun epidemiyolojisi ve teşhisi. *Sağ. Bil. Derg.* 2008;22(5):307–14.
3. Avsever ML, Çavuşoğlu C, Yazıcıoğlu Ö et al. New spoligotyping pattern of *Mycobacterium bovis* isolates from farm animals in Turkey. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2017;64(1):37–43.
4. Karadeli N. *Mycobacterium tuberculosis Complex suşlarının genotiplendirilmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Çanakkale, 2016.
5. Akdeşir E, Özyiğit MÖ, Kahraman MM. Sığırlarda *Mycobacterium bovis*'in moleküler ve sito-histopatolojik tanı yöntemleri ile gösterilmesi ve sonuçlarının karşılaştırılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2019;66(1):27–35.
6. Thoen CO, Steele JH, Gilsdorf MJ. *Mycobacterium bovis infection in animals and humans*. Ames, Iowa: Blackwell; London: Eurospan, 2006.
7. Dibaba AB, Kriek NPJ, Thoen CO. *Tuberculosis in Animals: An African Perspective*. Cham: Springer, 2019.
8. Otchere ID, van Tonder AJ, Asante-Poku A et al. Molecular epidemiology and whole genome sequencing analysis of clinical *Mycobacterium bovis* from Ghana. *PLoS One* 2019;14(3):e0209395.
9. Aslan G, Kuyucu N, Çalikoğlu M et al. *Mycobacterium bovis*'in etken olduğu tüberküloz olguları. *ANKEM* 2009;23:182–7.
10. Chambers M, Gordon S, Olea-Popelka F et al. *Bovine tuberculosis*. Wallingford Oxfordshire UK, Boston MA USA: CABI, 2018.
11. Mukundan H, Chambers MA, Waters WR et al. *Tuberculosis, leprosy and other mycobacterial diseases of man and animals: The many hosts of mycobacteria / edited by Harshini Mukundan, Mark Chambers, Ray Waters, Michelle H. Larsen*. Wallingford: CABI, 2015.
12. Barış Yİ. *21 YY' da Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı.: Çağlar Boyu Tüberküloz*. Samsun, 2003.

13. Gülcü Y. *Sığır, kanatlı ve insanlardan izole edilen mikobakterilerin moleküler tekniklerle tiplendirilmesi* (Doktora Tezi). Konya: SELÇUK ÜNİVERSİTESİ, 2014.
14. Sayın Z. *Sığır tüberkülozunun farklı metotlar ile karşılaştırmalı teşhisi* (Doktora Tezi). Konya, 2010.
15. Sayın Z, Erganiş O. Sığır tüberkülozunun teşhisinde kullanılan metotlar. *Kocatepe Veteriner Dergisi* 2010;3:77–82.
16. Akay Ö. (ed). *Özel Mikrobiyoloji: Aside dirençli bakteriler*. Ankara: Medisan Yayın Evi, 1997.
17. Cassidy JP. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Vet Microbiol* 2006;112:151–61.
18. Ateş MB, Çiftçi MK, Oruç E et al. Holstein ırkı neonatal bir buzağıda *Mycobacterium bovis* tüberküloz olgusu. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences* 2019;35(3):175–9.
19. Espejel MDC, Del Rio JC, Medrano A et al. Congenital tuberculosis in a 25-day-old female calf. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2018;42(2):135–8.
20. Kılınçel Ö, Çelik OE, Aytan A et al. Düzce ilinde çiğ süt örneklerinde *Mycobacterium bovis* aranması. *DÜ Sağlık Bil Enst Derg* 2018;8(3):112–4.
21. Neill SD, Cassidy J, Hanna J, et al. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Vet Rec* 1994;135(6):134–5.
22. Aytekin İ, Kalkan Y, Mamak N et al. *Mycobacterium bovis* ile enfekte bir inekte saptanan granulomatöz lezyonlar. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi* 2010;4(2):117–22.
23. Olea-Popelka F, Muwonge A, Perera A et al. Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis* —a call for action. *The Lancet Infectious Diseases* 2017;17(1):e21-e25.
24. World Organisation for Animal Health. Zoonotic tuberculosis is a major public health threat.

https://www.oie.int/fileadmin/home/eng/Media_Center/docs/pdf/Infographies/FINAL%20INFOGRAPHIC_1.pdf (22 December 2020, date last accessed).

25. World Health Organization. *Global tuberculosis report 2020*. Geneva, 2020.
26. Comstock G, Livesay V, Woolpert F. The prognosis of a positive tuberculin reaction in childhood and adolescence. *American Journal of Epidemiology* 1974;99(2):
27. Chambers MA, Williams A, Gavier-Widen DA. Guinea pig model of low-dose *Mycobacterium bovis* aerogenic infection. *Vet Microbiol* 2001;80:213–26.
28. Cadmus S, Akinseye VO, van Soolingen D. *Mycobacterium bovis* in humans and *M. tuberculosis* in animals in Nigeria: an overview from 1975-2014. *Int J Tuberc Lung Dis* 2019;23(11):1162–70.
29. Oruene IS, Ndukwe SC. An Assessment of Meat Inspection for Bovine Tuberculosis and the Functional Conditions of Major Abattoirs/ Slaughter Slabs in Rivers State. *Black Sea Journal of Agriculture* 2020;3(3):205–10.
30. Golden MP VH. Extrapulmonary Tuberculosis: An Overview. *Am Fam Physician* 2005;72:1761–8.
31. Hacimustafaoğlu M, Okan M, Yerci Ö et al. Generalized BCG Lymphadenitis in an Infant: Diagnostic Dilemma With Lepromatous Leprosy and Gaucher Disease on Fine Needle Aspiration. *Turkish Journal of Medical Sciences* 1999;29(3):285–90.
32. Özbal Y. Tüberküloz İmmünolojisi. *Erciyes Tıp Dergisi* 2006;28(1):25–34.
33. Schluger NW. The Pathogenesis of tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Cell and Molecular Biology* 2005;32:251–6.
34. Hernández-Pando R, Chacón-Salinas R, Serafin-López J, Estrada I. (ed). *Immunology, Pathogenesis, Virulence: Tuberculosis 2007 From basic science to patient care*. Brazil, 2007.
35. Ulusoy E, Karaca NE, Aksu G et al. Frequency of *Mycobacterium bovis* and *mycobacteria* in primary immunodeficiencies. *Turk Pediatri Ars* 2017;52(3):138–44.
36. Shaheer A, Debapriya B, Santosh K et al. Curcumin Nanoparticles Enhance *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine Efficacy by Modulating Host Immune Responses. *Infect Immun* 2019;87(11):

37. Talbot EA, Williams DL, Frothingham R. PCR Identification of *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of Clinical Microbiology* 1997;35(3):566–9.
38. Ceyhan İ, Tarhan G, Imcı H. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated from varied origins,. *Türk Klinik Laboratuvar Dergisi* 2010;1(1):
39. Durupınar B. Mikobakteriler ve Çevre Koşullarına Dayanıklılıkları. *O.M.Ü. Tıp Dergisi* 1996;13(4):
40. Kocagöz T. Mikrobiyolojik tanıda klasik yöntemlerde yeni yaklaşımlar. *ANKEM* 2013;27(2):150–3.
41. Schluger NW, Burzynski J. Recent advances in testing for latent TB. *Chest* 2010;138(6):1456–63.
42. Ghebremariam MK. *The prevalence and risk factors of Mycobacterium bovis infections in domestic animals and man in Eritrea*, 2018.
43. World Organisation for Animal Health. Bovine tuberculosis. [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.06_BOVIN E_TB.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.06_BOVIN_E_TB.pdf) (22 December 2020, date last accessed).
44. Bengisun JS, Gökırmak MÇ, Arıbal E, Saygun N, Özenci E. Tüberkülozun serolojik tanısında ELISA testinin tanı değeri. *Ankara Üniversitesi Tıp Mecmuası* 1997;50(4):193–5.
45. Raqib R, Rahman J, Kamaluddin AKM et al. Rapid diagnosis of active tuberculosis by detecting antibodies from lymphocyte secretions. *J Infect Dis* 2003;188(3):364–70.
46. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology* 1997;35(4):907–14.
47. Yardımcı H, Ünal CB, Kökçü Ataseven L et al. Sığır tüberkülozunun PCR ile tanısı ve *Mycobacterium bovis*'in spoligotiplendirme yöntemi ile genotiplendirilmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2007;54(3):183–9.
48. Proano-Perz F, Rigouts L, Brandt J, Dorny P, Ron J, Maria-Agusta C, Rodriguez R, Fissette K, Aerde AV, Portaels F, Benitez-Ortiz W. Preliminary observations on *Mycobacterium ssp.* in dairy cattle in Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006;75(2):318–23.

49. Nasr SE, Saad NM, EA Nasr, Wahba NM, Elsherif WM. Detection of bovine tuberculosis in milk and serum of tuberculin reactors dairy farm animals in Assiut City, Egypt 1 Saad El-din Nasr, * 1. *Basic Research Journal of Animal Science* 2013;1(1):1–6.
50. Kuria JN, Gathogo SM. Concomitant fungal and *Mycobacterium bovis* infections in beef cattle in Kenya. *Onderstepoort J Vet Res* 2013;80(1):585.
51. Chukwu ID, Chukwu COO, Kandakai-Olukemi YT, Owolodun O, Nwosuh C, Agada GO, Audu BJ, Chollom SC. Detection of *Mycobacterium tuberculosisComplex* in Lung Specimen of SlaughteredCattle and Goats by a DNA Based multiplexPolymerase Chain Reaction and Ziehl-NeelsenMethods In Jos, Nigeria. *British Microbiology Research Journal* 2013;3(4):550–6.
52. Awah-Ndukum J, Kudi AC, Bradley G et al. Molecular genotyping of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle tissues in the North West Region of Cameroon. *Trop Anim Health Prod* 2013;45(3):829–36.
53. Gutiérrez Cancela MM, García Marín JF. Comparison of Ziehl-Neelsen staining and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and caprine tuberculous lesions. *Journal of Comparative Pathology* 1993;109(4):361–70.
54. Ortatatlı M, Çiftçi MK, Tuzcu M. Sığırlarda tüberküloz ve diğ er granülamatöz pnomoniler üzerine patolojik incelemeler. *Vet. Bil. Derg.* 1998;14(2):139–50.
55. 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.
56. Fitzgerald SD, Kaneene JB, Butler KL et al. Comparison of postmortem techniques for the detection of *Mycobacterium bovis* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J Vet Diagn Invest* 2000;12(4):322–7.
57. Adu-Bobi NAK, Mak-Mensah EE, Achel DG et al. Preliminary investigation of bovine tuberculosis in suspected beef from a metropolitan abattoir in Ghana with Ziehl-Neelsen microscopy. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2009;12(17):1222–5.
58. Tuzcu N. *Mycobacterium bovis* izolatlarının miru- vntr ve spoligotyping ile surveyansı (Doktora Tezi). Adana, 2013.

59. Ereğat S, Nasereddin A, Levine H et al. First-time detection of *Mycobacterium bovis* in livestock tissues and milk in the West Bank, Palestinian Territories. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7(9):e2417.
60. Ünver A, Atabay İH, Güneş V et al. Kars yöresinde sığır tüberkülozunun yaygınlığının PCR ile belirlenmesi 2007;13:27–31.
61. Gümüşsoy KS, Atasever A, Aydın F, Özcan M, Beyaz L et al. Prevalence of tuberculosis in cattle in Turkey. *Medycyna Wet.* 2007;63(3):305–8.
62. Solmaz H, İlhan Z, Aksakal A et al. Detection of bovine tuberculosis by tuberculin test and polymerase chain reaction in Van, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2009;33(3):229–33.
63. Ağaayak A, Bulut Y, Seyrek A. Elazığ yöresinde tüberkülozlu hastaların balgam örneklerinde mikobakteri tür dağılımının PCR-RFLP yöntemi ile belirlenmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni Dergisi* 2007;41(2):203–9.
64. Bayraktar B, Bulut E, Barış AB et al. Species distribution of the *Mycobacterium tuberculosis complex* in clinical isolates from 2007 to 2010 in Turkey: a prospective study. *Journal of Clinical Microbiology* 2011;49(11):3837–41.
65. Çavuşoğlu C, Yılmaz FF. Ege Bölgesi'nde insan *Mycobacterium bovis* enfeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisi. *Mikrobiyol Bul* 2017;51(2):165–70.
66. Silva MR, Da Rocha AS, Araújo FR et al. Risk factors for human *Mycobacterium bovis* infections in an urban area of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2018;113(8):1-6.
67. Zimpel CK, Patané JSL, Guedes ACP et al. Global Distribution and Evolution of *Mycobacterium bovis* Lineages. *Front Microbiol* 2020;11:843.
68. Liébana E, Aranaz A, Mateos A et al. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis complex* organisms in bovine tissue samples by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 1995;33(1):33–6.
69. Vitale F, Capra G, Maxia L et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis complex* in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs. *Journal of Clinical Microbiology* 1998;36(4):1050–5.
70. Romero RE, Garzón DL, Mejía GA et al. Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species-specific primers. *Can J Vet Res* 1999;63(2):101–6.

71. Cedeño I, Obaldía R de, Sanjur O et al. Use of the polymerase chain reaction for diagnosing bovine tuberculosis in Panama. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 2005;24(3):1067–75.
72. Livingstone PG. (ed). Avances en materia de diagnostico, control erradicacion de la tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*) en animales domesticos salvajes.; Animal Health (OIE) International Committee. Animal Health (OIE) International Committee, 2001. 20 p.
73. Zumárraga MJ, Martin C, Samper S et al. Usefulness of spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*-related infections in South America. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;37(2):296–303.
74. Cowan LS, Crawford JT. Genotype analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a sentinel surveillance population. *Emerg. Infect. Dis.* 2002;8(11):1294–302.
75. 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 (Uzmanlık Tezi)*. Adana, 2010.