



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**İNSAN VE HAYVAN KAYNAKLI MYCOBACTERIUM
BOVIS SUŞLARININ SPOLİGOTİPLENDİRME VE
MIRU-VNTR YÖNTEMLERİ İLE EPİDEMİYOLOJİK
ANALİZİNİN YAPILMASI**

Derya ALTUN

**VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hakan YARDIMCI

ANKARA

2023

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN VE HAYVAN KAYNAKLI MYCOBACTERIUM
BOVIS SUŞLARININ SPOLİGOTİPLENDİRME VE
MIRU-VNTR YÖNTEMLERİ İLE EPİDEMİYOLOJİK
ANALİZİNİN YAPILMASI**

Derya ALTUN

**VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan YARDIMCI**

**ANKARA
2023**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “İnsan ve Hayvan Kaynaklı *Mycobacterium bovis* Suşlarının Spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR Yöntemleri İle Epidemiyolojik Analizinin Yapılması.” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Derya ALTUN

Tarih:

İmza:

KABUL ve ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalında
Derya ALTUN tarafından hazırlanan
“İnsan ve Hayvan Kaynaklı *Mycobacterium bovis* Suşlarının Spoligotiplendirme ve
MIRU-VNTR Yöntemleri ile Epidemiyolojik Analizinin Yapılması.” adlı tez
çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY
ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	3
1.2. Epizootiyoloji ve Epidemiyoloji	6
1.3. Mikobakterilerin Özellikleri	10
1.4. Mikobakterilerin Sınıflandırılması	11
1.4.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Kompleks	14
1.4.1.1. <i>M. tuberculosis</i>	15
1.4.1.2. <i>M. bovis</i> ve BCG	15
1.4.1.3. <i>M. caprae</i>	16
1.4.1.4. <i>M. africanum</i>	16
1.4.1.5. <i>M. microti</i>	16
1.4.1.6. <i>M. canettii</i>	17
1.4.1.7. <i>M. pinnipedii</i>	17
1.4.1.8. <i>M. mungi</i>	18
1.4.1.9. <i>M. suricattae</i>	18
1.4.1.10. <i>M. orygis</i>	18
1.4.1.11. <i>Dassie bacillus</i>	19
1.4.2. MTBC'nin Evrimi ve <i>M. bovis</i>	19
1.4.3. <i>M. bovis</i> 'in Genomu	22
1.4.4. <i>M. bovis</i> 'in Üreme Özellikleri	24
1.5. Virulans	25
1.5.1. Mikobakteriyel Proteinler	25
1.5.1.1. Old Tuberkülin (OT)	25
1.5.1.2. Tüberkülin-PPD (Purified Protein Derivative)	26
1.5.1.3. Isı Şok Proteinleri (HspX: Heat Shock Proteins)	26
1.5.1.4. ESAT-6 (Early secretory antigenic target)	26
1.5.1.5. 65 kDa Protein	27
1.5.1.6. CFP-10 (Culture filtrat protein)	27
1.5.1.7. 19 kDa Lipoprotein	27
1.5.2. Mikobakteriyel Lipidler	28
1.5.2.1. Kord Faktör	28
1.5.2.2. WaxD	28
1.5.2.3. Sülfolipidler (Sülfatidler)	28
1.5.2.4. PIM (Fosfatidil İnozitol Mannozyd)	28
1.5.2.5. Lipoarabinomannan (LAM)	29
1.5.3. Mikobakteriyel Enzimler	29

1.5.4. Transkript Regülatörleri	29
1.6. Bağışıklık	30
1.6.1. Doğal Bağışıklık	30
1.6.2. Kazanılmış Bağışıklık	31
1.6.3. Granülom Oluşumu	33
1.7. Tüberkülozun Laboratuvar Tanısı	34
1.7.1. İmmunolojik Tanı Testleri	34
1.7.1.1. Tüberkülin (PPD) Deri Testi (TDT)	34
1.7.1.2. Gama İnterferon (IFN- γ) Testi	35
1.7.2. <i>M. bovis</i> 'in Mikroskopik Tanısı	35
1.7.3. <i>M. bovis</i> 'in Kültürde Tanısı	37
1.7.4. Fenotipik Özelliklere Dayalı Tanı Testleri	39
1.7.5. Genotipik Özelliklere Dayalı Tanı Testleri	39
1.7.5.1. Genomik Delesyon Tiplendirme (RD delesyon tiplendirme)	40
1.7.5.2. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)	42
1.7.5.3. Spoligotiplendirme	43
1.7.5.4. Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number Tandem Repeat (MIRU-VNTR)	46
1.8. Tüberküloz Tedavisi	48
1.8.1. İnsanlarda Tedavi Yaklaşımı	48
1.8.2. Hayvanlarda Tedavi Yaklaşımı	49
1.9. Korunma	50
2. GEREÇ ve YÖNTEM	52
2.1. Gereç	52
2.1.1. <i>M. bovis</i> Suşlarının İzolasyonu ve İdentifikasyonu İçin Gereçler	52
2.1.2. <i>M. bovis</i> Suşlarının Genotiplendirmesi İçin Gereçler	53
2.1.2.1. Spoligotiplendirme İçin Gereçler	53
2.1.2.2. MIRU-VNTR Genotiplendirme İçin Gereçler	55
2.2. Yöntem	57
2.2.1. <i>M. bovis</i> Suşlarının İzolasyonu ve İdentifikasyonu için Uygulamalar	57
2.2.2. <i>M. bovis</i> Suşlarının Genotiplendirmesi	58
2.2.2.1. Spoligotiplendirme	58
2.2.2.2. MIRU-VNTR Genotiplendirme	60
3. BULGULAR	63
3.1. <i>M. bovis</i> Suşlarının İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	63
3.2. <i>M. bovis</i> Suşlarının Genotiplendirme Bulguları	67
3.2.1. Spoligotiplendirme Bulguları	67
3.2.2. MIRU-VNTR Genotiplendirme Bulguları	83
3.3. Moleküler Tiplendirme Bulgularının Karşılaştırılması	96
4. TARTIŞMA	100
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	109
ÖZET	112
SUMMARY	113
KAYNAKLAR	114
ÖZGEÇMİŞ	127

ÖNSÖZ

İnsan ve sığırlarda görülen zoonotik TB enfeksiyonlarında etken olan mikobakteri türlerinin moleküler düzeyde tanımlanması ve genotiplendirilmesi, zoonotik TB bulaşması için risk faktörlerinin ve bulaşma yollarının belirlenmesi yanı sıra suşların coğrafik dağılımlarının saptanması için de epidemiyolojik bilgi sağlamaktadır.

Ülkemizde *Mycobacterium bovis*'in insandan hayvana ya da hayvandan insana bulaşını gösterecek epidemiyolojik veri elde edebilmek için tasarlanmış bu kapsamda (108 suş) spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR yapılmış çalışma yok denecek kadar azdır. Ayrıca bu çalışma, öncelikle Ankara ili ve çevresi illeri kapsayan bölgede *M. bovis*'in genotipik haritası hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. Daha sonra yapılacak olan *M. bovis* ile ilgili moleküler çalışmalar için de önemli veri elde edilmesine olanak sağlayacaktır.

Doktora eğitimim boyunca bilimsel desteklerini esirgemeyen, örnek aldığım değerli danışman hocam Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hakan YARDIMCI'ya en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Başta tez izleme komitesindeki hocalarım Prof. Dr. Mehmet AKAN ve Prof. Dr. Hıfı Oğuz SARİMEHMETOĞLU olmak üzere, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalındaki tüm değerli hocalarıma teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Tez çalışmam sırasında suş temin etmemde desteklerini gördüğüm Vet. Hek. Erhan AKÇAY ve Vet. Hek. Halil PİR'e teşekkür ederim. Genotiplendirme çalışmalarım da bilgi paylaşımlarıyla bana en büyük desteği veren Dr. Bio. Süleyman YALÇIN ve Dr. Bio. Fatma BAYRAKDAR'a teşekkür ederim. Sonsuz destekleri ile hep yanımda olan Doç. Dr. Semra SOYDAM AYDIN'a ve Bio. Aykut AYDIN'a ayrıca çok teşekkür ederim. Şu an görev yaptığım Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarında bulunan tüm çalışma arkadaşlarıma başta Bio. Meryem DEMİR, Tek. Filiz DANIŞMAZ, Tek. Uğur GÜNER, Tek. Kadir

Onur BAKIR, Bio. Orhan ŐAYLI olmak üzere verdikleri destekten dolayı ayrı ayrı çok teşekkür ederim.

Son olarak sevgili eŐim Cumhuri ALTUN ve biricik oğlum Ata Barış ALTUN'a doktora maceram boyunca bana gosterdikleri sabır, anlayıŐ ve desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Bu proje Ankara Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü tarafından 21L0239012 proje kodu ile desteklenmiŐtir.



SİMGELER VE KISALTMALAR

AC	Akciğer
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome (Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu)
ARB	Asido Resistant Basil
B	Bovine (Sığır)
BCG	Bacille Calmette Guerin
°C	Santigrat derece
CDC	Center's for Disease Control
CDS	Coding Sequences
CFP	Culture Filtrat Protein
DGT	Doğrudan Gözetimli Tedavi
DHK	Dekontaminasyon-Homojenizasyon-Konsantrasyon
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DR	Direct Repeat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ESAT-6	Early Secretory Antigenic Target
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
ETR	Exact Tandem Repeat
EZN	Ehrlich-Ziehl-Neelsen
g	Gram
GM-CSF	Granulosit Makrofaj-Koloni Stimüle Edici Faktör
H	Human (İnsan)
HIV	Human Immunodeficiency Virüs
IFN- γ	İnterferon-Gama
IL-12	İnterlökin-12
INH	İzonikotinik asit hidrazid
IS	Insertion Sequence
kb	Kilo Base
LAM	Lipoarabinomannan
LJ	Lowenstein Jensen

MHC	Major Histokompatibilite Kompleksi
MGIT	Mycobacteria Growth İndicator Tube
MIRU-VNTR	Mycobacterial İnterspersed Repetitive Unit-Variable Number Of Tandem Repeat
ml	Mililitre
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Kompleks
M.Ö.	Milattan önce
NaCl	Sodyum Klorür
NK	Naturel Killer
OIE	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
OT	Old Tuberkülin
PAS	Para-amino Salisilik Asit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PIM	Fosfatidil İnozitol Mannozyd
pH	Power of Hidrojen
PMNL	Polimorfnükleer lökosit
PPD	Pürified Protein Derivative
R Koloni	Rough (Kaba) Koloni
RD	Region Of Different
RFLP	Restriction Fragment Length Polimorfizm
S Koloni	Smoot (Düz) Koloni
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TB	Tüberküloz
TCH	Tiyofen-2-Karboksilik Asit
TDM	Tüberküloz Dışı Mikobakteri
TB	Tüberküloz
TDT	Tüberkülin deri testi
TGF-β	Transforming Growth Faktör beta
Th1 lenfosit	T helper1 lenfosit
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör alfa
µl	Mikrolitre
WHO	World Health Organisation

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. MTBC'nin filogenetik ağacı	21
Şekil 1.2. EZN boyama ile ARB görünümü	36
Şekil 1.3. Floresan boyama ile ARB görünümü	36
Şekil 1.4. MGIT sıvı kültür şişesinde MTBC üremesi	38
Şekil 1.5. LJ katı besiyerinde MTBC üremesi	38
Şekil 1.6. Belirli soylarda DNA'nın art arda silinmesini gösteren MTBC'nin önerilen evrimsel şeması	41
Şekil 1.7. RFLP'nin ilkeleri	43
Şekil 1.8. Spoligotip belirleme adımları	45
Şekil 1.9. MIRU-VNTR genotipleme prensibi	47
Şekil 3.1. Spoligotiplendirme sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan oktal kodlar	67
Şekil 3.2. Spoligotiplendirme paternleri	67
Şekil 3.3. İnsan kaynaklı izolatların spoligotiplendirme ile dendogramı	77
Şekil 3.4. Hayvan kaynaklı izolatların spoligotiplendirme ile dendogramı	78
Şekil 3.5. İnsan ve hayvan kaynaklı izolatların birlikte spoligotiplendirme ile dendogram	80
Şekil 3.6. İnsan kaynaklı izolatların birlikte 24 lokus MIRU-VNTR ile dendogramı	89
Şekil 3.7. Hayvan kaynaklı izolatların birlikte 24 lokus MIRU-VNTR ile dendogramı	91
Şekil 3.8. İnsan ve hayvan kaynaklı izolatların birlikte MIRU-VNTR ile dendogram	93

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Mikobakterilerin sınıflandırılması	12
Çizelge 1.2. Runyon Sınıflandırması	13
Çizelge 1.3. Woods ve Washington sınıflandırması	14
Çizelge 1.4. Genom Karşılaştırılmaları	24
Çizelge 2.1. Spoligotiplendirme için kullanılan primerler	53
Çizelge 2.2. 24 Lokus MIRU-VNTR metodu için kullanılan primerler ve mix'ler	56
Çizelge 2.3. Bir örnek için PCR miksi	58
Çizelge 2.4. Spoligotiplendirme öncesi PCR döngüleri	58
Çizelge 2.5. Bir örnek için PCR miksi	60
Çizelge 2.6. MIRU öncesi PCR döngüleri	60
Çizelge 2.7. MIRU lokuslarının MIRU-VNTR tekrar sayıları ve ampikon boyutları	62
Çizelge 3.1. İnsan kaynaklı izolatların kodları ve identifikasyon bulguları	64
Çizelge 3.2. Hayvan kaynaklı izolatların kodları ve identifikasyon bulguları	65
Çizelge 3.3. İnsan kaynaklı izolatların spoligo binary, oktal ve hexadecimal kodları, SIT, spoligofamilya (Lineage) ve SB sayıları	69
Çizelge 3.4. Hayvan kaynaklı izolatların spoligo binary, oktal ve hexadecimal kodları, SIT, spoligofamilya (Lineage) ve SB sayıları	73
Çizelge 3.5. Spoligotiplendirme sonucu insan kaynaklı izolatlarda görülen kümelenmeler	77
Çizelge 3.6. Spoligotiplendirme sonucu hayvan kaynaklı izolatlarda görülen kümelenmeler	78
Çizelge 3.7. Spoligotiplendirme sonucu insan ve hayvan kaynaklı suşlarda görülen kümelenmeler	79
Çizelge 3.8. Spoligotiplendirme ile saptanan genotipler	82
Çizelge 3.9. İnsan kaynaklı izolatlarda SİTVİT2'ye göre SIT, Lineage, 12-MIT, 15-MIT, 24-MIT ve VIT kodları	84

Çizelge 3.10. Hayvan kaynaklı izolatlarda SİTVİT2'ye göre SIT, Lineage, 12-MIT, 15-MIT, 24-MIT ve VIT kodları	86
Çizelge 3.11. MIRU-VNTR sonucu insan kaynaklı izolatlarda görülen kümelenmeler	87
Çizelge 3.12. MIRU-VNTR sonucu hayvan kaynaklı izolatlarda görülen kümelenmeler	90
Çizelge 3.13. MIRU-VNTR sonucu insan ve hayvan kaynaklı izolatlarda görülen kümelenmeler	92
Çizelge 3.14. 24 lokus MIRU-VNTR ile saptanan genotipler	95
Çizelge 3.15. İnsan kaynaklı izolatlarda moleküler tiplendirme bulgularının karşılaştırılması	97
Çizelge 3.16. Hayvan kaynaklı izolatlarda moleküler tiplendirme bulgularının karşılaştırılması	99

1. GİRİŞ

Tüberküloz (TB), insanlarda ve hayvanlarda dünya çapında yayılım gösteren çok eski zamanlardan beri süregelen bulaşıcı bir hastalıktır. Tüberküloz, 1921'de koruyucu bağışıklık sağlayan BCG aşısının geliştirilmesi yanı sıra 1950'li yıllardan itibaren antitüberküloz ilaçlarla da tedavi edilebilmektedir. Fakat, günümüzde halen dünyanın neredeyse bütün ülkelerinde TB aşılması gereken bir sağlık sorunu olarak gündemden düşmemektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) dünya nüfusunun neredeyse 1/3'ünün TB basili ile karşılaştığını ve enfekte olduğunu, her yıl yaklaşık 10 milyon yeni tüberküloz enfeksiyonu vakasının saptandığını ve her yıl yaklaşık iki milyon kişinin tüberkülozdan hayatını kaybettiğini bildirmektedir. 2019'da dünya çapında tahmini 140.000 yeni zoonotik TB vakası meydana gelmiştir. Bu tahminde, dünya çapında zoonotik TB'nin en yaygın nedeni olan *Mycobacterium bovis* hakkındaki veriler kullanılmıştır. Diğer mikobakteriyel türlerin de zoonotik TB'ye neden olabileceği göz önüne alındığında, gerçek yük daha yüksek olabilir. Gerçek insidansın sekiz kat daha yüksek olabileceği öngörülmektedir. Hastalığın insidansına yönelik bilgiler *M. bovis* enfeksiyonunda sınırlı sayıda olduğu için zoonotik TB verilerinin oldukça tartışmalı olduğu düşünülmektedir (Avsever ve ark., 2017 ve WHO Global TB Report, 2020).

Tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBC) üyeleri tarafından oluşturulan farklı klinik semptomlarda, morbidite/mortalitesi oldukça yüksek hem insan hem de çeşitli türdeki memeli hayvanlarda enfeksiyon yapabilen kronik bir enfeksiyondur. MTBC içindeki tüberküloz nedeni türler başta *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. canettii*, *M. pinnipedii* ve *M. microti* olmak üzere son yıllarda gerçekleştirilen moleküler çalışmalarla MTBC üyelerinin 11 mikobakteri türünden oluştuğu bilinmektedir. Mikobakterilerin yüzden fazla türü vardır. Bazı atipik mikobakterilerin özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda tüberküloz dışı enfeksiyonlara neden olabildiği gözlenmiştir, bununla birlikte mikobakterilerin çoğu insanlarda hastalık oluşturmaz. (Gagneux, 2012 ve Thoen ve ark., 2014).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), Sığır TB'nu halk sağlığına ciddi tehdit oluşturan ihmal edilmiş yedi zoonozdan biri olarak kabul etmiştir. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE), Sığır TB'nun kontrol edilmesi ve ortadan kaldırılması çağrısında bulunmaktadır. İnsanlarda HIV-AIDS'in yayılmasıyla birlikte Sığır TB enfeksiyonunun önemi konusunda farkındalık artmıştır. HIV-AIDS hastalarında Sığır TB enfeksiyonu oranları genel popülasyondan daha yüksektir. Bu artan farkındalığa rağmen, Sığır TB'nin insanlarda akciğer (AC) dışı TB'nin küresel oranlarına ve genel TB'ye katkısı tam olarak belgelenmemiştir ve bu konuda ek araştırmalar yapılması gerekmektedir (OİE, 2021 ve WHO Global TB Report, 2020).

Sığır Tüberkülozu, sosyoekonomik etkisi ve halk sağlığı açısından önemi nedeni ile OIE listesinde yer alan bildiri zorunlu bir hastalıktır (OİE, 2021). Tedavi çok maliyetli olduğu için, mücadele bu etkenle enfekte olduğu düşünülen çiftlik hayvanları imha edilerek yapılmaktadır (Akdeşir ve ark., 2018). Sığır TB için birincil ana kaynak evcil sığırlardır. Bununla birlikte çoğu memeli türünde *M. bovis* rapor edilmiştir. Evcil hayvanlar, yaban hayatı ve insanları içeren geniş bir konakçı yelpazesine sahiptir. Sığır ve insanlarda TB enfeksiyonu için, diğer evcil hayvanlar ve yabani hayvanlar *M. bovis*'in potansiyel rezervuarları kabul edilmektedir (Thoen ve ark., 2014). Karmaşık epidemiyolojisi ve ekosistemler içinde çok çeşitli yaban hayvanları ile enfeksiyonun sürdürülmesi nedeniyle sığır TB'ü, kontrol edilmesi ve ortadan kaldırılması zor olan endemik hastalıklardan biridir (Dibaba ve ark., 2019).

Prodinger ve ark. (2014) *M. bovis* kaynaklı TB oranını İspanya'da %2,2, Fransa'da %2,9, Avusturya'da %0,94, Almanya'da %1, Türkiye'de %1,31-5,85 olarak bildirmişlerdir. Ülkemizde büyükbaş hayvanların yanı sıra insanlarda da patojen olarak tespit edilen *M. bovis*'in laboratuvarlarda tanımlaması genellikle MTBC düzeyinde yapılmaktadır. Ayrıca, *M. bovis* genellikle akciğer dışı seyrettiği için de tanımlama da gözden kaçabilmektedir (Aslan ve ark., 2009). Sığır tüberkülozunun moleküler tanısı, hastalığın epidemiyolojik bilgisinde önemli bir rol oynamaktadır. Ülkemiz dahil tüm dünyada *M. bovis* kaynaklı sığır tüberkülozu bildirimlerinin artmış olması, hayvan kaynaklı tüberkülozun yayılımının kontrolü yanı sıra tüberküloz teşhisi yöntemlerinin geliştirilmesinin önemini artırmıştır (Aslan

ve ark., 2009 ve Yardımcı ve ark., 2007). Suşların antimikrobiyallere karşı duyarlılıklarının tespit edilerek tedaviye başlanılmasının gerekliliği kabul edilmiştir. Tüm dünyada tüberkülozu eradike etmek için uygulanan programlarda, elde edilen suşlar moleküler yöntemlerle tanımlanarak epidemiyolojik olarak izlenmektedir. (WHO Global TB Report, 2020).

Bu tez çalışmasında; tüberkülozlu sığırlardan kesim sonrası alınan AC biyopsilerinden ve tüberküloz basili ile enfekte olduğu düşünülen insanlardan alınan çeşitli örneklerden, MTBC üyelerinin izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen *M. bovis* izolatlarının; öncelikle ters hibridizasyon tekniği ile identifikasyonları yapılmış, sonrasında epidemiyolojik önemlerinin tespiti amacı ile spoligotiplendirme ve 24 lokus MIRU-VNTR yöntemleri ile genotiplendirmeleri yapılmıştır.

1.1. Tarihçe

Doğada her yerde, bol miktarda bulunabilen mikobakteriler, milyonlarca yıl önce ortaya çıkmıştır. M.Ö. 8000 yıllarına ait Almanya'da bulunan insan iskeletlerinde ait lezyonlar bilinen en eski tüberküloz vakasının kalıntıları kabul edilmektedir. Mumyaların kemik kalıntılarında M.Ö. 4000-2400 yıllarına tarihlenen tüberküloza ait lezyonlar bulunmuş; PCR, IS6110 RFLP ve ARB teknikleri ile tüberkülozun varlığı gösterilmiş ve suş tayinleri ise spoligotipleme ile yapılmıştır. Avrupa'da sanayi devrimi döneminde, 17. ve 18. yüzyıllarda, beslenme yetersizliği çeken birarada yaşayan yoksul nüfusun artışı tüberküloz salgınlarına da neden olmuştur. TB salgınının İngiltere odağında başladığı, burdan batı Avrupa'ya yayıldığı; batı Avrupa'dan da tüm dünyaya yayılarak bütün dünyada yaygın bir enfeksiyon halini almıştır (Erkan, 1996).

Tüberküloz, tarih boyunca değişik klinik özelliklerle kendini göstermiş, pek çok hayvan ve insanın ölümüne neden olmuştur. Günümüzde ise dünya üzerinde her yıl yaklaşık 2 milyon insan tüberküloz enfeksiyonu nedeniyle hayatını kaybetmekte ve yaklaşık 10 milyonda yeni tüberküloz vakası görülmektedir

(Avsever ve ark., 2017 ve WHO Global TB Report, 2020). Gelişmekte olan ülkelerde insanlarda görülen sığır kökenli TB vakalarının %7-8'e varan oranlarda olduğu tahmin edilmektedir (Cosivi ve ark., 1998).

Robert Koch'un 1905 yılında kendisine Nobel ödülü kazandıran buluşu, 1882'de TB'nin nedeni *M. tuberculosis* olan enfektif bir hastalık olduğunu ispatlamasıdır (Kaufmann ve ark., 2006). Koch, TB aşısını geliştirmek için çok çaba sarfetmiştir. İnsanlardan ve hayvanlardan elde ettiği tüberküloz kültürlerine yüksek ısı ile uygulayarak bir solüsyon elde etmiş ve bu solüsyona 'old tüberkülin' ismini vermiştir. Daha sonra old tüberkülini aşı denemelerinde kullanmıştır. 1930'lu yıllarda F. Seibert, old tüberkülini saflaştırarak saflaştırılmış proteini (PPD) elde etmiş ve TB enfeksiyonunun varlığını tespit etmekte PPD ile denemeler yapmıştır (Erkan, 1996).

Calmette ve Guerin, tüberküloza karşı bir aşı yapabilmek için öncelikle virülansı daha düşük bir mikobakteri üretmek istemişlerdir ve bu amaçla bir inekten elde ettikleri virülan TB basilinin patates, gliserin ve sığır safrası içeren besi yerlerine 13 yıl boyunca 230 pasaj ekimini yapmışlardır. İstedikleri sonuca ulaşmışlar ve bağışıklık yapabilme özellikli bu basili Bacille Calmette Guerin (BCG) olarak adlandırmışlardır. Paris'te, 1921'de ilk aşılama çalışmaları başlatılmıştır. Anneleri tüberküloz hastalığına yakalanmış 600 çocuk BCG ile aşılanmış ve çocukların hepsinin bağışıklığı gözlenmiştir. Bundan sonra, BCG ile aşı çalışmaları genişleyerek uygulanmaya devam etmiştir (Pereira ve ark., 2007).

1854 yılında Almanya'da TB tedavisinde yeni bir çağ, ilk sanatoryumun açılmasıyla başlamıştır. 1895 yılında sanatoryumlar; fluoroskopik görüntüleme işlemleri ve bakteriyolojik incelemelerin yapıldığı verem araştırma ve tedavi merkezleri halinde hizmet verir olmuştur. Bunda W. Roentgen'in X ışınlarını buluşunun payı büyüktür (Erkan, 1996).

1885 yılında, İstanbul'da balgamda TB basili saptanmıştır. 1890'lı yıllarda Avrupa ile aynı zamanlarda tüberkülozdan korunmada tüberkülin kullanılmış ve pnömotoraks tedavisinde denenmiştir. Osmanlı'da II. Abdülhamit döneminde tüberküloz ile mücadele başlamıştır. İzmir ve İstanbul'da TB kayıtları tutulmaya başlanmıştır (Sabar, 1956). Türkiye'de 1900'lü yıllarda başlayan sığır tüberkülozu üzerine çalışmaların bildirimleri yapılmaktadır. OIE tarafından, Türkiye TB'un bulunduğu ülkeler arasında ilan edilmiştir (OİE, 2021).

Avrupa'da 20. Yüzyılın ikinci yarısında yapılan eradikasyon çalışmaları sonucunda TB önemli ölçüde önlenmiştir. 1991 yılına kadar sadece sporadik vakalar bildirilirken, İspanya (%108), Fransa (%3), İrlanda (%88), Yunanistan (%3), İtalya (%37) gibi Avrupa Birliği üyesi ülkelerde yüksek hastalık görülme oranları bildirilince 1996 yılında bir komisyon oluşturulmuştur. Komisyonda alınan karara göre, hayvan sürülerinin %99,9'unda 10 yıl boyunca tüberküloz vakası görülmeyen ülkeler tüberkülozdan ari kabul edilecektir. OIE ise hastalığın taranmasında pozitif hayvan sayısı, toplam sürünün %2 olmayan ülkeleri tüberkülozdan ari saymaktadır (Akay ve ark., 1984).

Geçmişte kolera, çiçek ve veba gibi hastalıklarla birlikte birçok salgına neden olan TB, günümüzde immün yetmezliğe neden olan viral enfeksiyonlar (AIDS), immün supresif tedaviler ve yoksul dünya nüfusunun artışı ile birlikte yeniden tehdit edici boyutlara ulaşmıştır (WHO Global TB Report, 2020).

Ülkemizde sığır tüberkülozu konusunda bilimsel çalışmalar (Akdeşir ve ark., 2018 ve Avsever ve ark., 2017) ve vaka bildirimleri (Aslan ve ark., 2009) yapılmasına rağmen, TB'nin insidansı ve prevalansı konusunda yeterli sayıda güncel araştırma ve kapsamlı bilgi sınırlı sayıdadır (Çavuşoğlu ve Yılmaz, 2017; Gülcü ve Hadimli, 2020 ve Tuzcu ve Köksal, 2020).

1.2. Epizootiyoloji ve Epidemiyoloji

TB, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBC) tarafından oluşturulan, solunum sistemi organları başta olmak üzere birçok dokuda kazeöz ve kazeokalsifiye görünümlü granulomlar ile karakterize, enfeksiyöz ve bakteriyel kronik bir zoonozdur (Avsever ve ark., 2017). İnsan TB vakalarının çoğuna *Mycobacterium tuberculosis* neden olur. Zoonotik TB ise ağırlıklı olarak MTBC üyesi bir tür olan *M. bovis*'in neden olduğu insanlarda görülen bir TB şeklidir. Sığırlarda hastalığın nedeni olan *M. bovis*, önemi göz ardı edilmiş bir zoonozdur. *M. bovis*, hayvanlarda tüberküloza neden olmasının yanı sıra, insanlarda da TB'a neden olabilir. Sığır tüberkülozu etkeni *M. bovis*'in başta sığırlar olmak üzere diğer evcil hayvanlarda ve vahşi yaşamdaki varlığı; insanlara bulaşması ile birlikte insanlarda da hastalık oluşturmaya olasığını artırmaktadır (Thoen ve ark., 2006). *M. bovis* enfeksiyonunun esas konağı sığır türleri ve insanlardır. Küçükbaş hayvanlarda bu hastalık çok nadir bildirilmiştir (Aytekin ve ark., 2010). MTBC için konak türlerinin duyarlılığı; bulaş yolu ve mikroorganizmanın miktarı ile farklılık göstermektedir. İnsanlar, primatlar ve kobaylar *M. tuberculosis*'e çok duyarlıdır. Sığırlar, tavşanlar ve kediler *M. bovis*'e duyarlı ve *M. tuberculosis*'e oldukça dirençlidir. Toynaklı yaban hayvanları genellikle *M. bovis*'e duyarlıdır, ancak *M. tuberculosis* izolasyonu hakkında çok az çalışma mevcuttur. Domuz ve köpekler hem *M. bovis*'e hem de *M. tuberculosis*'e duyarlıdır (Thoen ve ark., 2014).

Sığır tüberkülozu; genellikle kronik bir hastalık olmasına rağmen, bazen akutta seyredebilir. Çoğunlukla lenf nodülleri (baş ve toraks), solunum sistemi, gastrointestinal sistem, dalak, karaciğer, plevra ve peritonda lezyonlar gözlenir (Avsever ve ark., 2017 ve Özbey ve ark., 2008). *M. bovis* klinik olarak *M. tuberculosis*'dan ayırdedilememektedir. İnsidansı bilinemediğinden, *M. bovis*'in neden olduğu TB ile mücadele edilememektedir. *M. bovis*'in bazı suşlarında çoklu antibiyotik direnci olması, immün yetmezlikli bireylerde izole edilmesi ve HIV ile koenfeksiyonu sebebi ile dikkate alınması ve uygun tedavi yöntemleri geliştirilmesi gerekmektedir. Gelişmiş ülkelerde, *M. bovis* temelli TB insidansının, sütlerin pastörize edilmesi ve başarılı eradikasyon programlarını sonucu azaldığı

bildirilmiştir. Değişik ülkelerde yapılan çalışmalarda enfeksiyonunun taşınmasında insanların rezervuar olabileceği belirtilmektedir. İnsanlarda *M. bovis* enfeksiyonunun yeni vaka sayısını (insidans) belirlemek için paylaşılan verilerin sınırlı sayıda olması, verilerin tartışmaya açık olmasına da neden olmaktadır (Aslan ve ark., 2009 ve OİE, 2021).

İnsanlarda Sığır TB, hayvanlardaki hastalık yükü ve hayvanlar ile insanlar arasındaki bulaşma riskleri ele alınmadan anlaşılabilir. Hastalığın birincil bulaşma şekli, türe göre ve ülkelerdeki hayvancılık uygulamalarına bağlı olarak değişmektedir. Pastörize edilmemiş süt tüketimi, insanlar için *M. bovis*'in en önemli bulaş kaynağıdır. Hasta hayvanlarla direkt temas edilmesi ve hasta hayvanların enfeksiyöz aerosollerini solunum ile ortaya vermesi sonucu insanların bu aerosollerini inhale etmesi ile de bulaş gözlenmektedir. Hasta olan sığırlar tüm vücut sıvıları ile etkeni bulaştırabilirler. Pastörize edilmemiş süt ürünleri tüketen veya *M. bovis* içeren az pişmiş et ürünlerini tüketen bireylerin yanı sıra enfekte sığırlarla yakın etkileşime giren kişilerde de zoonotik TB'ye yakalanma riski daha yüksektir (Cadmus ve ark., 2019 ve Oruene ve Ndukwe, 2020). İnsandan insana TB bulaşı, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış kişiler arasında bildirilmiştir ve çok nadirdir (Collins, 2011). İnsanlar için *M. tuberculosis* 'den daha az patojenitesi olsa da *M. bovis* insandan, potansiyel olarak diğer insanlara akciğer tüberkülozu bulaştırabilmektedir. Kişiden kişiye yayılma kaydedilmiştir. Ancak tüberküloz olguları *M. bovis* yönünden ayrıntılı olarak araştırılmamıştır (Thoen ve ark., 2006). Sığırlara TB enfeksiyonunun canlılar arasında taşınmasında *M. bovis*'in bulaş kaynağı olarak insanların sayılabileceği belirtilmektedir (Wei ve ark., 2004).

Sığır tüberkülozunun patolojik ve klinik bulgularının insan tüberkülozuna fazlaca benzer olması dolayısıyla TB'li hastalarda *M. bovis*'in hakiki insidansı bilinmemekte ve tüberkülozdan korunma ve tedavi çalışmaları negatif yönde etkilenmektedir. Sığır TB'nin ekonomik maliyetleri, kontrol programlarının olmadığı veya etkisiz olduğu sanayileşmemiş ülkelerde daha yüksektir. Dikkate alınması gereken diğer önemli bir faktör ise yoksulluktur. Çünkü yoksulluk, imha edilmesi gereken kontamine et ve et ürünlerinin tüketimine yol açar. Yetersiz beslenme ve

HIV-AIDS TB'ye duyarlılığı artırır (WHO Global TB Report, 2020). Sütün kaynatılmadan ve etin iyi pişirilmeden yendiği durumlarda mezenterik ve servikal lenfadenit gibi hastalığın klinik formları görülmesi ile ilişkili çalışmalar mevcuttur (Thoen ve ark., 2006).

Nedeni *M. bovis* olan insan enfeksiyonları nadiren bildirilmektedir. TB hastalarından alınan numunelerden izole edilen hastalık etkeni, sürveyans sistemleri haricinde MTBC olarak tanımlanmaktadır. Tür düzeyinde tanımlanmaz. Bu nedenle, hayvandan insana bulaşın neden olduğu TB'un miktarının tahmini zordur. Hastalığın prevalansının yüksek olduğu bölgelerde, sığır TB öyküsü olan sürü sahiplerinde TB defalarca gözlenmiş olabilir. Moleküler suş tipleme tekniklerinin uygulanması ile sığır TB'nin nadir olmayan bir meslek hastalığı olduğu ve bu alanda çalışan veteriner hekimlerde de hastalık riski oluşturduğu kanıtlanmıştır (Thoen ve ark., 2006).

Sığırlar arasında ana bulaşma şekli inhalasyondur. Aerosol iletimi özellikle kapalı bir hava sahasında ve kalabalık olan sığır sürüleri için önemlidir. Bunun yanında otlatma yapılırken enfekte su damlacıklarına maruz kaldıklarında ve enfekte toz parçacıklarını solumaları halinde de hastalık gelişebilir (Dibaba ve ark., 2019). Çiftlik hayvanlarındaki *M. bovis*'in neden olduğu verim kaybı, yoksul topluluklardaki geçim kaynaklarını etkiler. Enfekte sürüler karantina altına alınır ve bu sürülerden kesim haricinde sığır satılmasına izin verilmez. Hayvanlarda Sığır TB'nun bu şekilde kontrol edilmesi, evcil hayvanlardan yaban hayatına yayılmanın erken müdahalesi ve önlenmesi insan popülasyonuna bulaşma riskini en aza indirir (Chambers ve ark., 2018). Yaban hayatta yayılmada çiğ kontamine et veya sakatat yenilmesinin rolü olduğu düşünülse de tam olarak aydınlatılamamıştır (Thoen ve ark., 2006).

Mevcut ulusal ve Avrupa Birliği yasalarına göre, tüberkülin testi pozitif olan sığırların sağlıklı olanlardan ayrı olarak kesimi yapılır ve postmortem muayene edilir. Karkaslar generalize enfeksiyon yok ise imha edilmez ve ilgili kurallara göre tüketime uygun ilan edilir. Karkasın tamamı, yalnızca generalize TB durumunda insan tüketimi için uygun değildir. Lokalize lezyonlar sadece lezyonlu sakatatın imha

edilmesini gerektirir. Yetiştiricilerin en büyük kayıpları, infekte sığırların imhasından kaynaklanmaktadır (Thoen ve ark., 2006).

TB, pek çok ülkede, yıllardır kapsamlı kontrol ve imha programları uygulanmaya çalışılmasına rağmen, ekonomik kayıplara neden olmaya devam etmektedir. Ulusal kontrol önlemlerini uygulayamayan ülkelerde, enfeksiyonun zoonotik bulaşması, her yaşta insanda morbidite ve mortaliteye yol açmaya devam etmektedir (Chambers ve ark., 2018). Zoonozlara yönelik insan ve veteriner tıbbi yaklaşımını tanımlamak için benimsenen 'Tek Sağlık' yaklaşımını uygulamak, ülkelerdeki insan, çiftlik hayvanları ve yaban hayatı popülasyonlarındaki farklılıklar göz önüne alındığında Sığır TB ile ilişkili zorlukları ele almak için TB'yi kontrol etmeye yönelik küresel stratejide kritik öneme sahiptir.

Ülkemiz düşük sosyoekonomik ve sosyokültürel düzeye sahip olduğu için TB ve sığır TB'ü için yüksek riske sahip bir ülkedir. Uygulanan büyükbaş hayvan politikaları, tüberkülozun yoğun görüldüğü gelişmemiş ülkelere alınan yoğun göç, hayvansal gıda üretiminde hijyen kurallarına uyulmaması, hayvancılıkla uğraşan insanların hayvanlarla iç içe yaşamaları gibi etkenler ülkemizde insan ve hayvan topluluklarında *M. bovis*'in TB olgularının *M. tuberculosis* kadar her geçen gün artmasına neden olmaktadır (Thoen ve ark., 2014).

Sığır TB'nun sığırlar ve diğer hayvanlar üzerindeki olumsuz etkileri, ülkelerin ekonomisi ve geçim kaynakları üzerine etkisi kapsamlı bir şekilde belgelenmesine rağmen, küresel insan TB'ü salgınındaki rolü gerektiği kadar anlaşılabilmiştir. Bu hastalığın mücadelesinde ilk olarak hastalık etkeninin insan toplumundan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunun için *M. bovis*'in bulaş özelliklerinin iyi bilinmesi ve toplumdaki yayılımının kontrol edilmesi gerekmektedir (Thoen ve ark., 2006).

1.3. Mikobakterilerin Özellikleri

Mikobakteriler fakültatif aerob, kapsülsüz, katalaz pozitifdir. Hücre içi yaşayan, hafif kıvrık veya düz çomak şeklinde 1,0-10 µm boyunda, 0,3-0,6 µm eninde ince basillerdir (Coros ve ark., 2008). Mikobakterilerin optimum üreme şartları pH 5-6 aralığında, %5-10 CO₂ içerikli ve sıcaklığın 37°C olduğu ortamdır. Hücre duvarının lipid içeriği oldukça fazla olduğundan alkole, asidik ve alkali çözeltilere ve ortamın kuruluğuna karşı direnç gösterir. Basiller 18-24 saatte bir bölünür ve yaklaşık 10-15 günde gözle görülür büyüklükte, deve tüyü renginde, karnabahar şekline benzeyen, buruşuk düzensiz koloniler oluşturmaya başlar (Costa ve ark., 2014). Mikobakteriler hücre duvarı lipid yapılarından dolayı gram boya ile boyanıp olarak sınıflandırılmazlar. Birçok bakteri %3'lük hidroklorik asit ve %95'lik etil alkol'den oluşan asit-alkol çözeltisi ile dekolarize olurlarken mikobakteriler bu şekilde davranmazlar ve bu sebeple 'aside dirençli bakteri' (ARB) olarak adlandırılırlar (Gedikoğlu, 1997).

Mikobakterilerin hücre duvar yapılarındaki hidrofobik lipid miktarı oldukça yüksek olduğundan dolayı aside dirençlidirler. Gram (+) bakterilerde lipid içeriği %0,5 oranında iken Gram (-) bakterilerde bu oran %3'tür. Mikobakterilerin duvarındaki lipid içeriği ise %25'tir. Mikobakterilerin hücre duvarlarının yüksek lipid yapısı, Gram boyamada kullanılan anilin boyaların geçişine izin vermediğinden bazik fuksinin fenol içinde çözündürülmüş yoğun çözeltileri ile boyanırlar. Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) veya Kinyoun yöntemleri ile boyanarak mikroskopta görünür hale getirilen mikobakterilerin dekolorizasyonunda %3'lük asit-alkol uygulanır, tek başına sadece alkolle dekolorizasyon yetersiz kalmaktadır. Asit-alkol uygulamasına rağmen mikobakterilerde ilk boya mikolik asitten dolayı hücre duvarında kalmaktadır. Dekolorizasyon işleminden sonra EZN veya Kinyoun yöntemlerinde zıt boya olarak metilen mavisi kullanılır. Bu boyama yöntemleri kullanılarak mikroskopik inceleme yapıldığında, TB basilleri mavi zeminde kırmızı çomaklar şeklinde görülür. Mikobakteri basillerinin birbirlerinden ayrılmayarak, yılankavi şeklinde oluşturdukları yapıya trehaloz dimikolat-kord faktör (serpentine cord) adı verilir (Borrell ve Gagneux, 2009).

Hücre duvarlarındaki lipid yoğunluğu mikobakterilerin patojenik ve immunolojik özelliklerini önemli ölçüde belirler. Koloni yapıları, serolojik spesifiteleri, bakteriyofaj duyarlılıkları ve fagositoza dayanıklılıkları hücre yüzeylerindeki peptidoglikan ve glikolipidler tarafından belirlenir. Nötrofil hareketini baskılayan, mitokondriyel aktiviteyi bozan, hücrel bağışıklığı tetikleyerek granülom oluşumunu indükleyen hücre duvarı bileşikleri vardır. Hücre duvarındaki sülfolipidler ve fosfatidil inositol mannozid; fagolizozom oluşumunu oksijen radikallerini baskılayarak vde oksijen radikallerinin etkinliğini azaltarak önler, bakteriyi fagositoza dirençli hale getirir. Hücre duvarı yapısındaki mikobaktinler, demir bağlamada görevlidirler. Gecikmiş tip aşırı duyarlılığı reaksiyonunu tetikleyen tüberkülinler ise bakteriyel büyüme sırasında ortama salınan peptitlerdir. Antibiyotiklere karşı dayanıklılıkta, hücre duvarındaki mikolik asidin rolü göz ardı edilemez (Ayele ve ark., 2004).

Mikobakterileri kültürde üretmek için Löwenstein-Jensen besiyeri (yumurta bazlı) veya Middlebrook 7H10/7H11 (agar bazlı) veya Middlebrook 7H9/7H12/Kirshners ortamı gibi sıvı besiyerleri kullanılmaktadır. Hücre bölünme süresi en az 12 saattir, koloniler ise haftalar sonra görülür hale gelir. Mikobakteriler, pek çok antimikrobiyal maddeye, dezenfektanlara, boyalara ve kuru ortama dayanıklıdır. Uzun süre toprakta canlılıklarını koruyabilirler. Fenolik dezenfektanlara karşı çok dayanıksızdırlar. Güneş ışığı, ultraviyole ışık ve pastörizasyona maruz kalırlarsa kısa sürede ölürler (Ayele ve ark., 2004).

1.4. Mikobakterilerin Sınıflandırılması

Mikobakteriler, Actinomycetales takımının Mycobacteriaceae ailesinde sınıflandırılmaktadır. Mycobacteriaceae ailesinin tek generusu *Mycobacterium spp*'lerdir. Mikobakteri türlerinin genomu, yaklaşık 4,4 milyon baz çifti büyüklüğünde olup, GC (Guanin ve Sitozin) oranının yüksek olması (%65-70) ile *Rhodococcus* (%59-69) ve *Nocardia* (%60-69) gibi mikolik asit içeren diğer bakterilerle benzerlik gösterirler. Bütün mikobakterilerin atasının; türünün evrimine

katkıda bulunabilecek şekilde kendisiyle ilişkisiz çevresel bakterilerle genetik materyal değişimini çok nadir görülen yatay (horizontal) gen transferi ile gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Namouchi ve ark., 2012 ve Veyrier ve ark., 2011). Bu durum tür içerisinde klonal evrimle sonuçlanmıştır (Coros ve ark., 2008). Yapılan çalışmalarda, bu türün Rv0986-8 operonu gibi virülans işlevlerine sahip çeşitli genleri taşıdığı belirlenmiştir. Bu durum araştırmacılar tarafından klonal evrim sürecinde, muhtemelen bir proteobakteriyel türden bu özellikleri elde ettiği şeklinde yorumlanmıştır (Jang ve ark., 2008).

Mycobacterium cinsinin genomunda tür ve alt tür düzeyinde farklılıklar meydana getiren insersiyon ve delesyonlar meydana gelmiştir. Bu verilerle farklı kompleksler, genomik düzeyde benzerlik gösteren türler dahil edilerek tanımlanmıştır. Bakteriyolojik ve DNA benzerliği yönünden birbirleriyle yakın ilişkili türlere ‘kompleks’ denilmiştir ve *M. bovis*, genetik özelliklerinden dolayı kendisine benzeyen bir grup türle birlikte bir MTBC üyesidir (Çizelge 1.1). *M. bovis*, uzun yıllardır değişmeyen genom yapısına sahip bir mikobakteridir. MTBC; halk sağlığı açısından *Mycobacterium* cinsinin en önemli kompleksidir (Hall ve Howard, 1994).

Çizelge 1.1. Mikobakterilerin sınıflandırılması (Hall ve Howard, 1994).

Alem	Prokaryot
Bölüm	Firmicutes
Sınıf	Actinobacteria
Takım	Actinomycetales
Aile	Mycobacteriaceae
Cins	<i>Mycobacterium</i>
Tür	<i>Mycobacterium bovis</i>

Mikobakteri türlerinin sınıflandırılmasında Ernest Runyon, 1950’lerin sonlarında tüberküloz dışı mikobakteri (TDM) türlerini katı besiyerinde üreme

hızları, koloni morfolojileri ve pigment üretimlerini dikkate alarak aşağıdaki gibi dört grupta sınıflandırılmıştır (Runyon, 1967). Çizelge 1.2’de gösterilmiştir.

Runyon sınıflandırmasına göre;

- Runyon I (fotokromojenler): Yavaş üreyerek, ışıkta pigment oluşturanlar;
- Runyon II (skotokromojenler): Yavaş üreyerek, ışıkta ve karanlıkta pigment oluşturanlar;
- Runyon III (nonkromojenler): Yavaş üreyerek, zayıf pigment oluşturanlar veya hiç pigment oluşturmayanlar;
- Runyon IV (hızlı üreyenler): 24°C ve 37°C’de 7 günde koloni oluşturanlar.

Çizelge 1.2. Runyon Sınıflandırması (Runyon, 1967).

Mycobacterium	Klinik belirti	Pigmentasyon	Üreme
Sınıflandırılmayan <i>M. tuberculosis</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. bovis</i> <i>M. leprae</i>			
Runyon Grup 1 <i>M. marinum</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. simiae</i>	Genelde patojen	Fotokromojen	Yavaş
Runyon Grup 2 <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. xenopi</i>	Nadir patojen	Skotokromojen	Yavaş
Runyon Grup 3 <i>M. avium intracellulare</i> <i>M. avium</i> <i>M. haemophilum</i>	Fırsatçı patojen	Nonkromojen	Yavaş
Runyon Grup 4 <i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i>	Nadir patojen	Nonkromojen	Hızlı

1987 yılında Washington ve Woods, Runyon sınıflandırmasını yetersiz bulmuşlar ve *M. tuberculosis*’i de içeren yeni bir gruplandırma önermişlerdir. Çizelge 1.3’de gösterilmiştir (Woods ve Washington, 1987).

Çizelge 1.3. Woods ve Washington sınıflandırması (Woods ve Washington, 1987).

En sık etken olan Mikobakteriler	<u>M. tuberculosis kompleks (MTBC)</u> <i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis (M. bovis BCG)</i> <i>M. africanum</i> <i>M. microti</i> <i>M. canetti</i>		
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>		
Nadiren hastalık yapan saprofitik türler	<u>Yavaş üreyenler</u> <i>M. gordonae</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M.terrae-triviale</i> kompleks <i>M. shimoidei</i> <i>M. gastris</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. paratuberculosis</i>	<u>Orta hızda üreyenler</u> <i>M. flavescens</i>	<u>Hızlı üreyenler</u> <i>M. thermoresistible</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i> <i>M. phlei</i> <i>M. parafortuitum</i> kompleks

1.4.1. *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks

MTBC içindeki ve TB'ye sebep olan türler başta *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. canettii*, *M. pinnipedii* ve *M. microti* olmak üzere son yıllarda gerçekleştirilen moleküler çalışmalarla MTBC üyelerinin 11 mikobakteri türünden oluştuğu bilinmektedir. Tür sayısı tüzü aşan mikobakterilerin çoğunluğunun insanlarda hastalık etkeni olmadığı, ancak bazı tüberküloz dışı mikobakterilerin bağışıklık sistemi baskılanırsa tüberküloz dışı hastalıklara neden olduğu bilinmektedir (Clarke ve ark., 2016).

1.4.1.1. *M. tuberculosis*

Robert Koch (1882) tarafından tanımlanan basil, insan TB'unun en yaygın etkeni olarak bilinmektedir. *M. tuberculosis* makrofaj hücreleri içerisinde yaşamını devam ettirir ve makrofajlar içinde çoğalır. En sık damlacık yoluyla yayılmaktadır. İlk başlarda yapılan araştırmalarda *M. tuberculosis*'in *M. bovis*'ten köken alarak hayvandan insana adapte olmuş versiyon olduğu ifade edilse de son genomik çalışmalar *M. bovis* genomunun *M. tuberculosis* genomundan daha küçük olduğunu ve evrimsel süreçte *M. tuberculosis*'in daha genç bir bakteri olduğunu göstermektedir (Brosch ve ark., 2002). TbD1 delesyonu ile atasal suştan ayrılan *M. tuberculosis*'in ana konağı insandır. Aerop bir bakteri olan *M. tuberculosis* katı besiyerlerinde R tipi koloni oluşturarak, 37°C'de 2-4 haftada ürer. Sıvı besiyerinde kord faktör oluşturan *M. tuberculosis* pigmentsizdir. Nitratları nitritlere indirgeyebilir ve Niasin testi pozitifdir. TCH hidrazid içeren ortamda üreyebilir. 68°C'ye kadar katalaz testi pozitifdir daha yüksek sıcaklıkta bu özelliğini kaybetmektedir. Pirazinamidaz aktivitesi pozitifdir (Brudey ve ark., 2006).

1.4.1.2. *M. bovis* ve BCG

Sığırlarda görülen TB'nin etkenidir. Fakat insanların da içinde yer aldığı diğer memeli türlerinde de TB'ye sebep olur. Sıvı ve katı besiyerlerinde, oksijeni bol şartlarda 6 ila 8 haftada üremeler gözlenir. Piruvat eklenen üreme ortamında üremesi artar. Katı besiyerinde R veya S koloni şeklinde görülür. Güçlü katalaz aktivitesi gösterir. Niasin ile reaksiyon vermez ve nitratları nitrite çeviremez. Pirazinamidaz enzimi yoktur. *M. bovis* suşunun invitro şartlarda 230 defa pasajlanarak atenüasyonu ile elde edilmiş ve zayıflatılmış canlı formu olan aşı, TB'ye karşı kullanımda olan tek aşıdır. Calmette ve Guérin tarafından TB'yi önlemek için geliştirilen Bacillus Calmette Guérin (BCG) aşısı ilk kez 1921'de insana uygulanmıştır. Küresel olarak en yaygın şekilde uygulanan aşıdır ve rutin yeni doğan bağışıklama programında yer alır. Bu aşı ayrıca mesanenin yüzeysel karsinomunun tedavisinde de kullanılır (Okaför ve Momodu, 2019).

1.4.1.3. *M. caprae*

İlk kez İspanya'da keçilerden bildiri yapılan bu basil, keçi tüberkülozunun dünya çapında etkenidir. Domuz ve kızıl geyik, insanların da dahil olduğu diğer memelilerde, vahşi ve evcil hayvanlarda TB'ye sebep olur. Hayvancılıkla uğraşan bireylerden de vaka bildiri yapılmıştır (Erler ve ark., 2004 ve Pavlik ve ark., 2002). Bu patojen, Avustralya'da tanı almış fakat normalde Avrupa'da yaşayan bir vaka ile Cezayir'de bir inekten izole edilmesi dışında, hiçbir zaman Avrupa kıtası dışında izole edilmemiştir (Sahraoui ve ark., 2009 ve Sintchenko ve ark., 2006). Uzun süre boyunca biyokimyasal test özellikleri benzediği için *M. bovis* olarak kabul edilen bu varyant spoligotiplendirme ile *M. caprae* olarak tanımlanmıştır (Aranaz ve ark., 1999). Pirazinamid duyarlılığı dışında değişik gen polimorfizm (*pncA*, *oxyR*, *katG* ve *gyrA*) kombinasyonları göstermektedir (Groenheit, 2011).

1.4.1.4. *M. africanum*

Afrika kıtasındaki akciğer TB vakalarının %60'ından sorumlu tutulan *M. africanum*, 1968'de ilk kez Senegalli bir hastadan tanımlanmıştır (Bonard ve ark., 2000). Hem insan hem de vahşi hayvanlarla ilişkili olan, genomdaki RD9 bölgesinin kaybı ile karakterize edilmiş farklı suşları olan tek soy *M. africanum*'dur (Brosch ve ark., 2002). İnsanlarda *M. tuberculosis*'den daha az sıklıkta saptanan *M. africanum*, ortamda %5-10 CO₂ olunca daha iyi ürerler, nitratı indirgemez ve TCH hidrazid varlığında üremez. Pirazinamidaz aktiviteleri de vardır. Coğrafi sınırlılıklar ve laboratuvar klasifikasyon eksikliğine bağlı olarak identifikasyonu yetersiz yapılmaktadır (Groenheit, 2011).

1.4.1.5. *M. microti*

Doğal konakçısı özellikle tarla fareleri ve diğer küçük kemirgenlerdir, oldukça nadir de olsa diğer memelilerde özellikle kediler, domuzlar ve lamalarda

enfeksiyon oluşturduğu gözlenmiştir. TB'ye sebep olur. İlk olarak 1998 yılında immün sistemi baskılanmış hastalarda bildirilmiştir. *M. microti* enfeksiyonunun insandan insana geçişinin nadir olduğu bildirilmektedir. Diğer MTBC üyelerinden farklı olarak S koloni yapar, fazlasıyla yavaş ürerler (Groenheit, 2011). Farklı karakteristik IS6110 bant profili ve spoligotiplendirme paternine sahip olan *M. microti*'nin lama ve sıçan tipi olmak üzere iki farklı spoligotiplendirme paterni tanımlanmaktadır (Pfyfer ve ark., 2003).

1.4.1.6. *M. canettii*

Çok nadir bir biyotip ve çevresel bir izolattır. İnsanlarda nadir ve sporadik TB sebebi olarak tanımlanır. Düzgün bir koloni morfolojisine sahip bu varyant ilk olarak 1969'da Canetti tarafından Somali doğumlu bir hastadan izole edilmiştir (Van Soolingen ve ark., 1997). *M. canettii* suşları arasında IS1081 kopya sayısı, housekeeping gen polimorfizmi, hücre duvarı lipid içeriği, koloni morfolojisi gibi farklı özellikler bulunmuştur. Yapılan delesyon tiplendirme çalışmalarında *M. canettii* genomunda RD, RVD ve TbD1 bölgelerinin korunarak değişmediği görülmüştür (Groenheit, 2011).

1.4.1.7. *M. pinnipedii*

İlk kez 1993 yılında deniz aslanlarından izole edilmiştir (Cousins ve ark., 1993). Güney yarımkürede birkaç fok türünde, deniz aslanları gibi deniz memelileri ile tapirler ve devalerde endemik TB'ye sebep olduğu bilinmektedir (Cousins ve ark., 2003). Deniz memelileriyle yakın temas halinde olan bireylerden izole edildiği bilinmektedir (Kiers ve ark., 2008). Pirazinamide duyarlı olması *M. bovis*'ten farklı bir özelliğidir (Groenheit, 2011).

1.4.1.8. *M. mungi*

Botswana ve Kuzey Batı Zimbabwe bölgesinde yaşayan firavun farelerinde tüberkülozun sebebi olarak gösterilmiştir (Alexander ve ark., 2010). Patojen koku alma sırasında enfekte sekresyonlar yoluyla bulaşır. 2013 yılında enfekte farelerle yapılan çalışmada suşun genomik yapısı incelenerek *M. mungi* olarak tanımlanan patojenin MTBC içerisinde yer alması gerektiği düşünülmüştür. Basiller, konakçıya nazal yoldan girer ve enfeksiyon sistematik olarak lenfatik veya hematojen yolla yayılır. *M. mungi* piruvatla zenginleştirilmiş Lowenstein-Jensen besiyerinde 5-6 haftada üretilebilir (Clarke ve ark., 2016).

1.4.1.9. *M. suricattae*

M. mungi ile ortak atayı paylaşırlar. Çöl faresinden izole edilmiştir. Dasse bacillus ile de genomik olarak yakındır. BACTEC MGIT ortamında da izolasyonu gerçekleştirilen bakteri, piruvat ile zenginleştirilmiş LJ besiyerinde 10 haftada ancak yeterli koloni oluşturabilmiştir. *M. suricattae* MTBC üyeleri arasında hiçbir spoligotip kalıbına uymamasıyla benzersizdir (Dippenaar ve ark., 2015).

1.4.1.10. *M. orygis*

2012 yılında tanımlanmıştır. Afrika'daki potansiyel konakları olan orkiskler, su kuşları ve ceylanlar ile Güney Asya'da yaşayan sığırlar ve rhesus maymunlarında ve daha az bilinen nadir türlerde TB'nin sebebi olarak gösterilir (Marcos ve ark., 2017 ve Van Ingen ve ark., 2012).

1.4.1.11. *Dassie bacillus*

MTBC'nin nadir görülen varyantlarından olan ve yapısı en çok *M. microti*'ye benzeyen Dassie Bacillus, Güney Afrika yaban fareleri'nde (*Procavia capensis*) görülen TB'nin sebebi olarak bilinir. İlk kez 1954 yılında Güney Afrika'da Nieu-Bethesda izole edilmiştir (Wagner ve ark., 1958). Yapılan çalışmalarda kobaylar için patojenik olmadığı bildirilen bu türün insanlardaki enfeksiyonu henüz gösterilememiştir. Dassie basili, gliserol içermeyen yumurtalı besiyerinde 4-6 hafta içerisinde gözle görülür koloni oluşturmaktadır (Clarke ve ark., 2016).

1.4.2. MTBC'nin Evrimi ve *M. bovis*

MTBC popülasyonunun; yaklaşık 15-35 bin yıl önce genetik çeşitliliğinin azalmasına neden olan bir gelişimsel daralma sonucu tek bir soydan çoğalarak eski *M. tuberculosis* köklerini ve günümüzde görülen TbD1 geni delesyona uğramış modern *M. tuberculosis* köklerini oluşturabileceği görüşü kabul görmektedir (Barış, 2003 ve Burgos ve Pym, 2002).

Kısa bir süre öncesine kadar *M. bovis*'in hayvandan insana adaptasyonu ile *M. tuberculosis*'in geliştiği sanılmakta ve kabul edilmekteydi. Bu görüşün kabul edilmesinin bir nedeni, *M. tuberculosis*'in *M. bovis*'e kıyasla çoğunlukla insanlarda hastalık oluşturması ve *M. bovis*'in daha geniş konak yelpazesine sahip olmasıydı (Karboul ve ark., 2006). Artık genomdaki mutasyona neden olan delesyonların incelenmesi sonucu günümüzde, *M. bovis*'in, delesyona neden olan mutasyonlar sonrası meydana çıkan yeni bir soy olduğu, *M. tuberculosis*'in atasal suşlarından ayrımından sonra olduğu görüşü kabul görmektedir. *M. tuberculosis*'in atasal suşlarından ilk olarak *M. africanum*, ikinci sırada *M. microti*, daha sonra *M. pinnipedii*, *M. caprae* ve *M. bovis* olacak şekilde mikobakteriler evrimleşmiştir. Bu delesyonlar nedeniyle *M. bovis*'in genomu, *M. tuberculosis*'in genomundan ~60 kb daha kısadır. *M. bovis*'e has özgün bir gen kümesinin bulunmaması da bu görüşü

destekleyen bir buluştur (Collins ve ark., 2011; Garnier ve ark., 2003 ve Yardımcı, 2006).

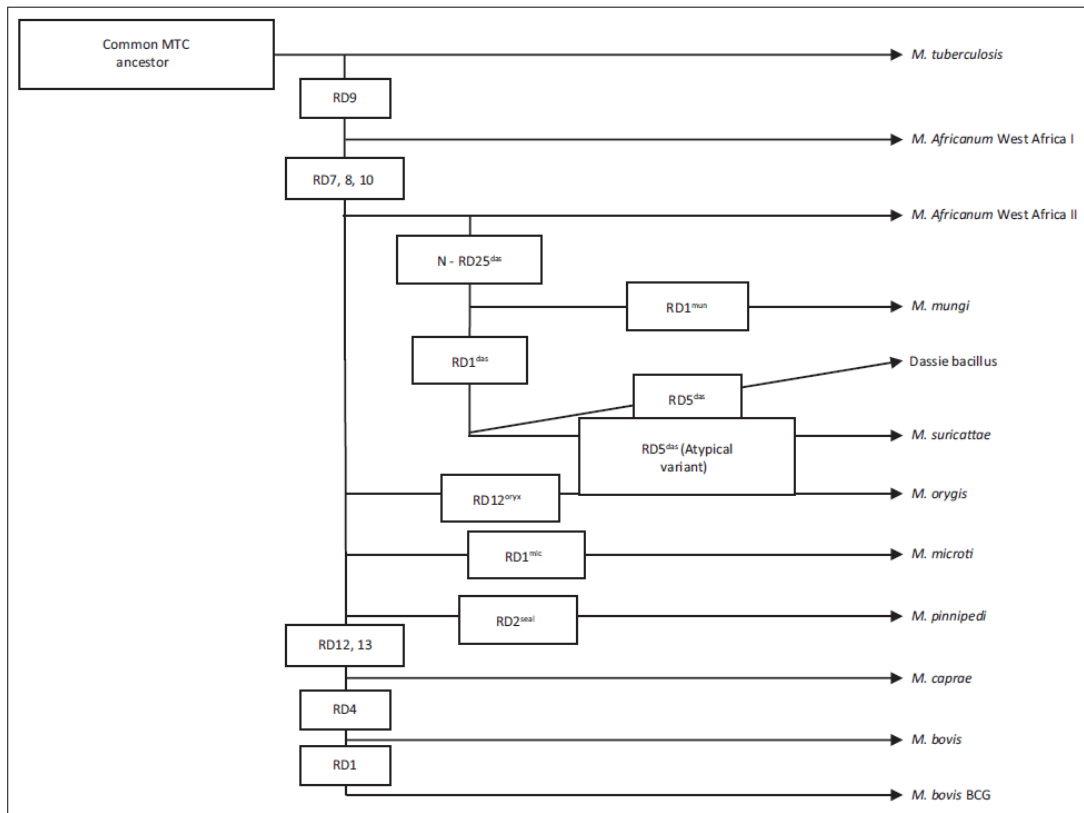
Moleküler yöntemlerle yapılan araştırmalar sonucunda, MTBC'in daha kapsamlı bir mikobakteri grubunun bir alt grubu olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak; *M. prototuberculosis* olarak adlandırılan tür; MTBC'nin çok eski zamanlarda köken aldığı soydur. Sinonim nükleotit çeşitliliği yöntemiyle *M. prototuberculosis*'in yaşı yaklaşık 2,8 milyon yıl olarak hesaplanmıştır (Garnier ve ark., 2003 ve Yardımcı, 2006).

M. bovis, *M. pinnipedii* ve *M. caprae* kökenlerinde TbD1 gen bölgesinin bulunması ortak bir özellik iken, RD7, RD8, RD9 ve RD10 gen delesyonlarının varlığı gözlenen bir diğer ortak özelliktir. *M. caprae* ve *M. pinnipedii*; *M. bovis*'ten köken alan *M. bovis*'in farklı kökenleri olarak bilinmektedir. *M. pinnipedii* RDseal fok izolatlarında, *M. caprae* RD12, RD13 delesyonu keçi izolatlarında ve RD4, RD12 ve RD13 delesyonu ise *M. bovis* izolatlarında gözlenmiştir. Bu gözlemler neticesinde *M. caprae*'nin *M. bovis*'den daha eski olduğu düşünölmektedir. Klasik *M. bovis*'de bulunan RD1, RD14 ve RD2 gen bölgelerinin delesyona uğraması sonucunda *M. bovis* BCG'nin attenüasyonunun gerçekteştiği bildirilmektedir. RD1 bölgesi, ESAT-6 ve CFP-10 proteinlerini kodlayan gen bölgesidir. *M. tuberculosis*'de bulunan en az 61 gen *M. bovis* BCG'de kaybolmuştur ve kaybolan gen bölgelerin konakçı yelpazesinden ve virulans kaybının sorumlusu olabileceği düşünölmelidir (Garnier ve ark., 2003 ve Oral Zeytinli ve Köksal, 2012).

Avirulan *M. microti* ve *M. bovis* BCG insanlarda aşı olarak kullanılmaktadır. Bu aşı suşlarındaki RD lokuslarının dağılımları genomik düzeyde karşılaştırılıp değerlendirilerek virulan ve attenüe suşlar arasında attenuasyona sebep olabilecek değişikliklerin nedeni araştırılmıştır. *M. microti* ve *M. bovis* BCG'nin RD1 gen bölgeleri karşılaştırılarak enfektif köklerde yer alan ESAT-6 ve CFP-10 proteinlerinin aşı köklerinde kaybedildiği bildirilmiştir. RD3, RD5, RD4, RD9 veya RD7 gen bölgeleri ile benzer bir ilişki gösterilememiştir *M. bovis*'in attenüasyonuna RD1 delesyonunun neden olduğu düşünölmekle birlikte attenüasyonun sorumlu

mutasyonları tam olarak bilinmemektedir. Sadece RD1 gen bölgesinin geri tamamlanmasıyla BCG kökenlerinde virulans tamamen geri dönmemektedir. Bu bilgiler ışığında birçok RD bölgesinin ve nokta mutasyonların *M. bovis* BCG’de RD1 ile birlikte virulans rol oynadığı görülmektedir (Esen, 2005).

MTBC içerisinde yer alan türler, nükleotit düzeyinde %99’dan daha fazla genetik benzerliğe sahipken, coğrafi dağılımlarına göre konak tropizmi, fenotip ve patojenite açısından büyük farklılıklar gösterirler (Brosch ve ark., 2002). MTBC üyelerinin çoğu konağa adaptasyon ile birbirlerinden farklılaşmıştır. Son çalışmalara göre kültürlenme yoluyla adaptasyonu değiştirilmiş suş olan *M. bovis* BCG ile birlikte MTBC 11 üyeden oluşur (Şekil 1.1). *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti* ve *M. bovis*, insan enfeksiyonu ile ilişkili en çok karşılaşılan MTBC suşlarıdır. Spoligotiplendirme gibi yöntemlerle genotipik olarak MTBC farklı filogenetik soylara ayrılmıştır (Boniotti ve ark., 2009 ve Clarke ve ark., 2016).



Şekil 1.1. MTBC’nin filogenetik ağacı (Clarke ve ark., 2016).

1.4.3. *M. bovis*'in Genomu

M. bovis genomu nükleotid düzeyinde %99,95 *M. tuberculosis* genomuna benzer fakat yaygın olarak duplikasyon, translokasyon ve inversiyon göstermez. *M. bovis*'in genomik dizilimi, çok büyük bir oranda *M. tuberculosis* genomik yapısına benzemektedir. *M. tuberculosis*'ten farklı olarak *M. bovis*'in genomunda oluşan delesyonlar ile genom boyu azalmıştır. Farklı gen ekspresyonlarının insan veya hayvan tüberküloz etkenlerinin konak seçiciliğinde rol oynadığı düşünülmektedir. Garnier ve ark. (2003), izole ettikleri bir *M. bovis* suşunun genom dizisini inceledikleri çalışmalarında; *M. bovis* genomu GC oranını %65,63 bulmuşlardır. Genomun tek sirküler kromozoma sahip 4.345.492 bp uzunluğunda olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, 3.951 gene sahip, 42 adet IS elementi içeren bir genom gözlemlediklerini belirtmişlerdir.

Delesyon, *M. bovis*'in genomunu oluşturan baskın mekanizmadır. *M. bovis*'de TbD1 olarak adlandırılan gen bölgesi bulunmasına rağmen, TbD1 delesyonlu modern *M. tuberculosis*'te yoktur (Barış, 2003).

M. tuberculosis H37Rv ile *M. bovis* karşılaştırıldığında 2,437 adet Single Nucleotide Polymorphism (SNP), *M. tuberculosis* CDC1551 ile *M. bovis* kıyaslandığında 2,423 adet SNP vardır. *M. bovis*'te pirazinamid antitüberküloz ilaç direnci, *pncA* geninde meydana gelen nokta mutasyon sonucunda oluşmuştur ve ortamda niasinin birikmesine engel olur. İdentifiye edilmiş 3 ayrı genomda 2,504 CDS (coding sequences) incelendiğinde; *M. bovis* genomunun *M. tuberculosis* H37Rv ile 1629 CDS'nin benzer olduğu, *M. tuberculosis* CDC1551 ile 1656 CDS'nin neredeyse aynı olduğu gösterilmiştir. *M. bovis* genomunun *M. tuberculosis* H37Rv ile 2,082 CDS'i; *M. tuberculosis* CDC1551 ile 1629 CDS'i tamamen aynı bulunmuştur. Bu 2,082 CDS bölgesi için *M. bovis* ve *M. tuberculosis* H37Rv karşılaştırıldığında 506 sinonim, 769 nonsinonim SNP görülürken; *M. tuberculosis* CDC1551 ile *M. bovis* karşılaştırıldığında 506 sinonim, 800 nonsinonim SNP ortaya çıkarılmıştır. Her iki standart *M. tuberculosis* suşu karşılaştırıldığında ise 241 sinonim, 339 nonsinonim SNP gösterilmiştir. Bu bulgular, MTBC üyeleri arasında

genomik dizilimin korunmuş olması yanı sıra *M. tuberculosis* ile *M. bovis* genomları arasında da farklılıklar olduğuna dikkat çekmektedir (Garnier ve ark., 2003).

M. tuberculosis ve *M. bovis*'in hücre duvarı yapıları ve burdan salgılanan proteinleri kodlayan gen bölgeleri arasında dikkat çekici ölçüde değişiklik vardır. *M. bovis* genomunda lipoproteini kodlayan genlerdeki farklılıklar ve benzerlikler birbirleriyle karşılaştırıldığında IpgT, IprM, IppO ve IpqG genleri frameshift ya da delesyon mutasyonlarına uğradıkları bununla birlikte, IppA geninin aksine iki kopyası bulunduğu görülmüştür. *M. bovis* genomundaki rpfA geninin ise büyümeyen veya dormant halde olan basilin yeniden canlanmasını sağlayan proteini kodladığı saptanmıştır (Mukamolova ve ark., 2002).

ESAT-6 familyası; *M. bovis*'in genomunda delesyonların en çok tesir ettiği bilinen antijen grubudur. Kuvvetli T hücre mutajeni proteinlerden biri olan ESAT-6 proteini, *M. tuberculosis* tarafından 20 farklı formda salgılanan bir antijendir. *M. bovis*'te değişmiş veya kaybolmuş genler, *M. tuberculosis*'te ESAT-6 proteinini kodlayan genlerdir. Bu genlerdeki kaybın önceden bilinmesi zordur. Sekrete edilen proteinlerdeki değişik varyasyonlar *M. bovis*'deki MPB70 ve MPB83 antijen salınımını artırmaktadır (Hewinson ve ark., 1996).

M. tuberculosis'in virulan yapısını etkilemeyen mangan (Mn^{+2}) transportunu sağlayan proteinleri kodlayan mntH geninin inaktivasyonu; *M. bovis*'de bu genin gerekli olan fonksiyonlarını aksatmaktadır. Hatta, mangan ve fosfat transportunda meydana gelen değişikliklerin tüm gen düzenleme mekanizmalarını etkileyebileceği öngörülmektedir (Weber ve ark., 2000).

Standart suşların genom özelliklerinin karşılaştırılması ve Çizelge 1.4'de gösterilmiştir (Garnier ve ark., 2003).

Çizelge 1.4. Genom Karşılaştırılmaları (Garnier ve ark., 2003).

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

M. tuberculosis invitro tek karbon kaynağı olarak gliserole ihtiyaç duyar iken *M. bovis* piruvata ihtiyaç duymaktadır. Bunun nedeni, *M. bovis*'in gliserol metabolizmasındaki kusurlar olabilir. GlpK, *M. bovis* AF2122-97 suşunda gliserol kinaz enzimini kodlayan genidir ve gliserolün fosforile edilmesini engelleyerek gliserolün besin kaynağı olarak kullanılmasını sağlar. UgpA geni, gliserol-3-fosfat aktarımını sağlayan enzimleri kodlayan genidir. *M. bovis* BCG'de glpK ve ugpA mutasyonları bulunmamaktadır ve gliserinli besiyerine piruvat ilavesine gereksinim duymamaktadır (Brosch ve ark., 2002 ve Garnier ve ark., 2003).

1.4.4. *M. bovis*'in Üreme Özellikleri

M. bovis besiyerlerinde (katı ve sıvı), O₂'li koşullarda 6 ila 8 haftada üremektedir. Katı besiyerlerinde S veya R tipi koloni yapmaktadır. *M. bovis*'in kolonileri *M. tuberculosis*'ten daha geç ortaya çıkmaktadır. Yumurta katkılı besiyerlerinde küçük, yuvarlak, kabarık veya düz, ıslakimsi veya kuru, beyazımtırak ve en bilinen tanımıyla deve tüyü rengi kolonileri ortalama 4. haftadan sonra oluşmaya başlar. Uzun, ince, 0,2-0,6 µm çap ve 1-10 µm uzunlukta, kapsülsüz ve sporsuz bakterilerdir. Hareket yetenekleri olmayıp nitrat ve niasin redüksiyonu yapamazlar. Tiyofen-2-karboksilik asit (TCH)'e duyarlı ve katalaz aktivitesini yoğun gösterirler. Diğer mikobakterilerden ayrılmasında bu özellikleri önemlidir. *M. bovis*

subsp. bovis pirazinamide direçli, *M. bovis subsp. caprea* pirazinamide duyarlı olmalarıyla da birbirlerinden ayrılırlar (Bilgehan, 1999). Katı besiyeri içeriğindeki gliserin, *M. bovis*'in üremesini olumsuz etkiler. *M. bovis* izolasyonunda sodyum piruvatla zenginleştirilmiş, gliserinsiz besiyeri önerilmektedir (Munyeme ve ark., 2009).

Dezenfektanlara ve çevresel faktörlere karşı dirençli olmalarının sebebi, büyük ölçüde hücre duvarı yapısındaki yüksek miktardaki lipid nedeniyledir. Beş ay toprak ve sularda yaşayabilirler. 12 yıl 37°C'de besiyerinde canlı kalabildikleri virulanslarını kaybetmedikleri görülmüştür. Güneş ışığı faktörü ortada yokken sokakta 10 gün canlı kalabilmişlerdir. Soğuga karşı dirençlidirler. 20°C'de %2'lik gluteraldehit ile 30 dakikadan fazla tutulduğunda %2'lik gluteraldehitin tüberkülosidal etkisi *M. bovis* BCG ve *M. tuberculosis* üzerinde gösterilmiştir. Serbest iyot %0,0625 ve daha yüksek konsantrasyonlarda oda sıcaklığında 5 dakikada tüberkülosidal etkilidir. %5'lik sodyum hipoklorit ve %3-8'lik formaldehit ise 10-30 dakika sürede tüberkülosidal etkili bulunmuştur. *M. bovis*, ultraviyole ışınlarına, direk gelen güneş ışığına, pastörizasyona ve basınçlı buharla yapılan sterilizasyona duyarlıdır (Durupınar, 1996).

1.5. Virulans

1.5.1. Mikobakteriyel Proteinler

1.5.1.1. Old Tuberkülin (OT)

Old Tuberkülin (OT), MTBC basillerinin kültür ekstraktıdır. İlk kez Koch tarafından üretilmiştir. OT, MTBC basillerinin sıvı besiyerinde 37°C'de 6 ila 8 hafta üretilmesini takiben buharla öldürülmesi, ilk hacminin 1/10'u kalıncaya kadar ısıtılarak yoğunlaştırılması ile inaktive edilerek elde edilir. Filtrasyonla sterilize edilse de elde edilen ürün saf olmayan, diğer mikobakteriyel proteinleri de içeren bir

üründür. OT, çok önceden intradermal deri testi olarak kullanılmıştır. Saf olmadığı için PPD'nin geliştirilmesine gerek duyulmuştur (Barry III, 2001).

1.5.1.2. Tüberkülin-PPD (Purified Protein Derivative)

İlk kez Seibert ve Glenn tarafından tanımlanmıştır. Saflaştırılmış protein derivesi (Purified Protein Derivative-PPD), MTBC kültür ekstratının amonyum sülfatla çöktürülmesi ve kollodyon membranlardan süzdürülmesi gibi işlemlerden sonra elde edilen saf bir üründür. PPD, DSÖ tarafından kullanımı kabul gören deri test maddesi olma özelliğiyle birlikte uygulanan kişinin aktif TB'u olup olmadığından çok MTBC basilleriyle karşılaşmış ve karşılaşmadığını gösteren bir testtir. Tamamen saflaştırılmaması ve diğer mikobakterilerle çapraz reaksiyon vermesi gibi dezavantajlara sahiptir (Barry III, 2001).

1.5.1.3. Isı Şok Proteinleri (HspX: Heat Shock Proteins)

Th1 cevabını başlattığı düşünülen şaperon benzeri proteinlerdir. Hsp65Kda, Hsp38Kda, Hsp12Kda gibi farklı çeşitleri vardır. Konakta koruyucu immünite gelişmesini ve Th1 cevabının oluşturulmasını sağlarlar. Ayrıca dormant fazda TB basilinin hayatta kalmasını ve apoptozdan korunmasını sağlarlar (Barry III, 2001).

1.5.1.4. ESAT-6 (Early secretory antigenic target)

RD1 bölgesinden kodlanan ESAT-6, INF γ salınımını ve T hücre üretimini indükler. Ayrıca yapılan çalışmalarda ESAT-6'nın memeli hücre zarlarının bileşenlerinden olan dimiristoilfosfatidilkolin ve kolesterol içeren lipozomların kararsızlaşmasına ve parçalanmasına neden olduğu belirtilmiştir (De Jonge ve ark., 2007). ESAT-6 kaspaza bağımlı bir yol ile makrofajların apoptozisini de indükler (Derrick ve Morris, 2007).

1.5.1.5. 65 kDa Protein

Isı şok proteinlerine benzer özellikler gösteren bu antijenik protein, yüksek derecede immünojenik bir saflaştırılmış proteindir. Konak hücrede otoimmün reaksiyonlara yol açarak kazeifikasyon ve likefaksiyon nekrozuna neden olur, tüberküloz granülomlarındaki tipik görünümü ortaya çıkarmaktadır (Dubaniewicz, 2010).

1.5.1.6. CFP-10 (Culture filtrat protein)

Üretim mekanizmaları tam olarak bilinmeyen CFP'lere birçok örnek verilebilir. Erp proteini, Mas proteini, FadD26 ve Fad28 proteinleri, yağ asidi metabolizmasına katkıda bulunan CFP'ler; OmpA proteini, porin benzeri bir protein olan CFP ve SecA1 ve SecA2 gibi CFP'ler örnekler verilebilir. SecA2 gen bölgesini deneysel olarak kaybeden mikobakteri suşlarının kültür ortamlarında virulanslarını kaybederek üredikleri bildirilmiştir (Harboe ve ark., 1996).

1.5.1.7. 19 kDa Lipoprotein

Hücre duvarı proteini. İnterferon gama (INF γ) sentezini kodlayan genlerin bir alt kümesinin transkripsiyonunu bloke ederek makrofajların INF γ reseptörünü inhibe eder. Aynı zamanda, Toll like reseptör sinyalleri ile MHC sınıf I'in antijen işlemlerini ve nitrojen ara ürünlerinin üretimini de inhibe eder (Tobian ve ark., 2003).

1.5.2. Mikobakteriyal Lipidler

1.5.2.1. Kord Faktör

Kord faktörü (Trehaloz-6,6 Dimikolat), alternatif kompleman yolunu aktive eder. Konak hücrenin mitokondri membranına tutunarak oksidatif fosforilasyonda ve hücre solunumunda hasara neden olur. Ayrıca PMNL göçünü durdurarak granülom oluşumunda rol oynar (Kıyan, 1999).

1.5.2.2. WaxD

BCG aşısının mesane tümörlerinde gerilemeye neden olan immünoterapötik etkisinde rolü olduğu düşünülmektedir. Yapıları peptidoglikolipid haldedir (Kıyan, 1999).

1.5.2.3. Süfolipidler (Sülfatidler)

Fagolizozom oluşumunu engelleyerek, makrofajlarda TB basilini lizozomal enzimler tarafından sindirilmekten korumaktadırlar (Kıyan, 1999).

1.5.2.4. PIM (Fosfatidil İnozitol Mannozyd)

Hapten özelliğinde ve lipid yapısındadır. Çapraz koruyucu bağışıklıkta rolü olduğu bildirilmiştir (Astarie-Dequeker, 2010).

1.5.2.5. Lipoarabinomannan (LAM)

MTBC'nin hücre duvarı yapısında bulunur. Konağın tirozin fosfatını etkinleştirir. Ölü basillerin fagositozu sırasında LAM aracılığıyla sfingozin kinazın aktivitesinin sonlandırılmasına sebep olur. Bunu tirozin fosfatı uyararak başarır (Astarie-Dequeker, 2010). Virulan mikobakterilerde bulunan ManLAM (arabınan terminaline mannoz bağlı) ve hızlı üreyen avirulan mikobakterilerde bulunan LAM (fosfomiyoizitol bağlı) ve AraLAM (arabınan terminaline mannoz bağlı olmayan) olmak üzere üç farklı LAM vardır (Özbal, 2006).

1.5.3. Mikobakteriyel Enzimler

MTBC üyeleri; metabolizmalarının gereksinim duyduğu aminoasitler, karbonhidratlar, kofaktörler, pürin-pirimidinler ve önemli metabolitleri konak hücresi içerisinde çoğaldıkları ortamdan sağlarlar. Konak makrofajlarında oksidasyondan korunmak için antioksidan enzimler üretirler. MTBC basillerinin ürettiği en önemli enzimler; katalaz-peroksidaz, nitrat redüktaz, demir ile aktive olan süperoksit dismutaz, bakır ve çinko ile aktive olan süperoksit dismutaz, isopropilmalat izomeraz, pyrolin-5-karboksilat redüktaz, antranilat fosforibozil transferaz, metal transferazlar, lipazlar, esterazlar, izositrat liyaz, açıl CoA sentaz, fosfolipaz C gibi fonksiyonel enzimlerdir (Dedieu ve ark., 2013).

1.5.4. Transkript Regülatörleri

Mikroorganizmanın bulunduğu ortamdaki şartları düzenleyen regülatörler, gen transkripsiyonunu regüle ederler. Mikobakterilerde varlığı gösterilen regülatörler;

sigma-E, dezenfektanların varlığını algılayarak gen düzenlemeleri yapar.

sigma-A, genlerin salınımını düzenler.

sigma-F, basilin metabolizmasını bazal düzeye indirerek latent enfeksiyonlarda korunmasını sağlar.

sigma-H, üreme ortamındaki sıcaklık artışı ve oksidatif strese cevap olarak ekspresyonu artar (Rachman ve ark., 2006).

1.6. Bağışıklık

Tüberküloz enfeksiyonu konakta kazanılmış ve doğal bağışıklık oluşturmaktadır.

1.6.1. Doğal Bağışıklık

MTBC basilleri inhalasyonla konak vücuduna alındığında ilk önce doğal immün cevapla karşılaşır; siliyer mukoza hücreleri ile etkileşime geçen basiller yakalanarak dışarı atılır, yakalanamayan bir kısmı ise alveollere ulaşır. Üst solunum yolunun yapısal özelliğinin oluşturduğu engel, etkenin fagosite edilmesi, reaktif nitrojen ve oksijen ürünlerin fagositik hücrelerden salınması, inflamasyonda görevli hücreler ve inflamatuvar hücrelerden salgılanan sitokinler, kimyasal yapısı değişmiş alveoler makrofajlar, apoptoz, genetik faktörler ve üst solunum yolunun mikrobiyal florası doğal bağışıklığın elemanlarıdır (Zuniga, 2015).

Üst solunum yolunun yapısındaki siliyalı epitel, TB basillerini tutarak alt solunum yollarına geçmesini engeller. Üst solunum yolu anatomisi nedeni ile hava geçişi sırasında oluşan hava turbulansı ile mikroorganizmalar ve yabancı partiküller muköz maddeye doğru itilerek muköz maddeye yapışmaları sağlanır. Goblet hücreleri de IgA antikorlar salgılayarak solunum yolunda doğal bağışıklığın destek olmaktadır (Diker, 1998).

Alveollara ulaşan MTBC basillerinin virülans yeteneğine bağlı olarak yaklaşık %10 aktif TB geliştirme olasılığı vardır (Zuniga, 2015). Alveoler

makrofajlar ve monositler mikobakterileri fagosite ederler. Hücrede fagolizozom oluşur ve fagolizozom içinde pH düşmesi, proteolitik enzimler, fagositik hücrelerce üretilen oksijen ve nitrojen ve oksijen ara ürünleri ile mikobakteriler ortadan temizlenmeye çalışılır. Hücre duvarında bulunan lipitler (LAM, sulfolipitler, glikolipitler, 19 kDa lipoprotein) fagositozda büyük öneme sahiptir (Smith, 2003). MTBC hücre duvarı komponenti olan LAM, hücre içi Ca^{+2} artışını inhibe ederek Ca^{+2} /kalmudilin yolağına zarar vererek fagozom-lizozom füzyonunun gerçekleşmesini engeller ve böylece MTBC ortamda canlı kalır. Virulan mikobakterilerde bulunan ManLAM (arabinan terminaline mannoz bağlı) mikobakterilerin hücre içinde yaşamasını makrofaj cevabını inhibe ederek sağlamaktadır (Özbal, 2006, Yardımcı, 2006). Fagolizozom oluşturulamazsa mikobakteriler hücre içinde yok edilemez ve çoğalmaya başlarlar. Fagolizozom oluşturulabilirse de, fagolizozom içindeki düşük pH'ın nötralize ederek, hücre duvarındaki lipitler ile lizozomal hidrolitik enzimlere direnç geliştirerek ya da H_2O_2 sentezini önleyerek fagolizozomun öldürücü etkisinden korunurlar. MTBC'nın tanımlanmış bir endotoksini veya ekzotoksinin olmaması sebebiyle TB enfeksiyonuna karşı hemen konak yanıtı gelişmez. Konakta hücrel immün cevap gelişebilmesi için MTBC basillerinin belirli miktarda çoğalması gerekmektedir. TB basilleri makrofaj içinde çoğalarak makrofajı patlatır ve basiller serbest kalır (Zhai ve ark., 2019). Fagositler parçalanırsa ortama dağılan TB basilleri daha da çoğalarak lenf nodüllerine ve ilgili organlara yönelir ve yeni enfeksiyon mihrakları inşa etmeye başlarlar. Mikobakteriler, alveoler makrofajlar içinde isositrat liyaz enzimi ile yağ asitlerini besin kaynağı olarak kullanır. Yıllarca makrofajlar içinde persistan halde kalmalarını bu beslenme özelliğine borçludurlar (Smith, 2003). Mikobakteriyel antijenler tarafından uyarıldığında makrofajlardan IL-1, IL-12, IL-6, IL-8, TNF- α ve IFN- γ gibi sitokinler salgılanır (Duarte ve ark., 2005).

1.6.2. Kazanılmış Bağışıklık

Kazanılmış bağışıklığın uyarılmasıyla TB basillerinin bulunduğu alana, granülom oluşumunu sağlayan sitokin ve kemokinleri üreten makrofajlar, dentritik

hücreler, T lenfositler ve fagositlerin göçü başlar. Bu sayede TB basilleri enfeksiyon odağında lokalize kalmaktadır. Makrofajlardan, TNF- α ve IL-12 gibi inflamatuvar sitokinler salgılanır. TNF- α ve IL-12; CD4Th lenfositlerin CD8Tc'ye dönüşmesini uyarır. CD4Th1 lenfositleri; IL-2, TNF- α ve IFN- γ salgılar. IFN- γ ; fagositoz hızını artırır ve makrofajlardan TNF- α ve IL-12 salgılanmasını artırır. IL-2 ve TNF- α ; NK ve CD8Tc lenfositleri aktifleştirir. Uyarılan makrofajlar TB bisillerini parçalar. NK ve CD8Tc lenfositleri mikobakterileri içeren makrofajları yok ederek TB basillerini azaltmaya çalışırlar. CD4Th veya CD8Tc lenfositlerine makrofajlar veya dendritik hücreler tarafından mikobakteriyel antijenler sunulduğunda, tüberkülin (PPD) testi ile gözlenebilen gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu hücrel immünite ile birlikte gelişmektedir (Hingley-Wilson, 2003).

Konağın antijenlere karşı oluşturduğu inflamatuvar bir cevap olan gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu yavaş olmakta ve uzun zaman sürmektedir. Uyarılan makrofajlar, MHC-II molekülleri aracılığı ile mikobakteriyel antijenik peptitleri Th1 lenfositlerine sunarlar. Bunun sonucu antijene karşı uyarılan CD4Th1 lenfositlerinden, aynı antijenle yeniden karşılaşıldığında, INF- γ , TNF- α , GM-CSF (Granulosit Makrofaj-Koloni Stimüle Edici Faktör) gibi yangıya neden olan sitokinler salınır. Makrofajların kemotaksisi için GM-CS-F, aktivasyonunu için INF- γ , ölümleri için TNF- α görev almaktadır. Bunların salgılanmalarıyla önce gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşur, sonra granülom oluşumu gelişir. Hücrel immün yanıtın ardından gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu gelişmektedir (Diker, 1998).

Gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonuna en tipik örnek, PPD reaksiyonudur. Lenfositlerin aktifleşmesiyle salınan sitokinler ve diğer faktörlerin etkisiyle yangı oluşur. Sonuçta doku hasarı ve onu takiben nekroz gelişir (Velmurugan, 2007).

Gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonundan, en çok tüberkülin sorumludur. CD1 molekülleri üzerinden T lenfositlerine sunulan antijenler bu hücrel immün yanıtın oluşmasında önemli mikobakteriyel yapılardır (Özbal, 2006). Gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu, kazeöz nekroz ve kavite oluşumuna yol açarak konakta

doku hasarına sebep olur (Duarte ve ark., 2005 ve Hingley-Wilson, 2003). MTBC basilleri nekrotik hücre ölümüne neden olarak enfekte hücrelerden kaçır ve makrofaj apoptozunu inhibe ederek konak savunmasını önler (Velmurugan, 2007).

Tüberkülozda konağın gecikmiş tip aşırı duyarlılık cevabı ile kazeifikasyon, likeifikasyon ve kavitasyon gibi akciğer hasarları meydana gelmektedir (Ortatatlı, 1998). Konakta oluşan hücresel bağışıklık, TB basillerinin çoğalmasını ve yayılmasını hücresel immünite ile baskılar. Nekroz oluşumu, makrofaj aktivasyonu için gereklidir. Nekrotik bölgeden yayılmak isteyen TB basilleri makrofajlar tarafından tutularak fagosite edilirler. Uyarılan makrofajlar, fagosite ettikleri TB basillerinin çoğalmasını engellemek için hücresel bağışıklık ile gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu sonucu kazeöz nekroz alanları genişletirler (Özbal, 2006).

TB oluşumunda Th1 yanıtı Th2'ye dönüşür ve bu esnada oluşan kilo kaybı, ateş, doku hasarı gibi semptomlar Th1 yanıtı olan TNF- α 'nın sonucudur. Antijene spesifik T lenfositler TB enfeksiyonunun olduğu bölgeye toplanarak granülom lezyonlarının oluşumuyla doku hasarını başlatır (Fieweger, 2019).

1.6.3. Granülom Oluşumu

TB enfeksiyonunun başından 2-6 hafta sonra gelişen granülom oluşumu, alveolar makrofajlar ve lenfositlerin hücresel bağışıklık cevabı ile lezyon bölgesinde toplanmasıyla gelişir. Uyarılmış makrofajlardan salınan IL-8 ve MCP-1 gibi kemokinlerin ve mikobakteriyel lipitlerinin granülom oluşumunda etkileri vardır (Duarte ve ark., 2005). MTBC basillerinin nekroz doku içerisinde çoğalmasını ve yayılmasını sınırlayan granülomlar, makrofajları, T lenfositlerini ve diğer bağışıklık hücrelerini uyarır. Basillerin çoğu, granülomlarda yok edilir ve hastalığın ilerlemesi durdurulur. TB enfeksiyonuna karşı gelişen bu immün cevap ile oluşan granülomlar etkenin çoğalmasını ve yayılmasını sınırlamaktadır. Granülom oluşumunda etkenin virulans faktörlerine ve sayısına göre konağın başarısı farklılık göstermektedir. Granülomlarda uzun süre canlılıklarını koruyabilen TB basilleri, hücresel immün

yanıtın baskılandığı immünsüpresyon gibi durumlarda yeniden aktifleşebilmektedir (Duarte ve ark., 2005; Hingley-Wilson, 2003 ve Özbal, 2006).

1.7. Tüberkülozun Laboratuvar Tanısı

Sığır tüberkülozunun hem insanlarda hem de hayvanlarda doğru tanımlanıp zamanında teşhis edilmesi; bulaşın önlenmesi ve hastalığın takibi açısından çok değerlidir. Bunun yanı sıra insanlarda yanlış teşhis uygun olmayan tedavi alınıp tedavi maliyetlerinin artmasına neden olabilir (Kambashi ve ark., 2001).

1.7.1. İmmunolojik Tanı Testleri

1.7.1.1. Tüberkülin (PPD) Deri Testi (TDT)

Tüberkülin (PPD) deri testi (TDT), 1910'dan beri tüberküloz enfeksiyonunu saptamak için kullanılan in vivo bir testtir. Halen kullanılmakta olan en eski tanı testlerinden biridir. Ancak, TDT, düşük özgülüğe sahiptir. TDT, intradermal Mantoux testi ve PPD terimleri genellikle birbirinin yerine kullanılabilir. Saflaştırılmış protein türevi (PPD), *M. bovis* BCG ve çoğu tüberküloz dışı mikobakteride bulunan 200'den fazla antijeni içeren tüberküloz basiline bir kültür filtratıdır (Barne, 2006 ve Seibert ve Dufour, 1948).

Sığırlarda ve diğer hayvanlarda, *M. bovis*'in kültür filtratından amonyum sülfat (NH_4SO_4) veya trikloroasetik asit ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$) ile çökeltilerek hazırlanan intradermal tüberkülin, tüberkülozun tanımlanması için yaygın olarak kullanılmaktadır (Thoen ve ark., 2009). İntrakütan olarak uygulanan tüberkülin sonrası ortaya çıkan reaksiyon, gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonunun klasik örneğidir. Reaksiyon 48-72 saat sonra okunur. Ayrı papüller varsa en büyük papüllerin çapı ölçülür. Vezikül görüldüğünde sonuç kaydedilir ve pozitif olarak kabul edilir. Papüller birleştiğinde, en büyük endurasyon odağının çapı ölçülür. Bu

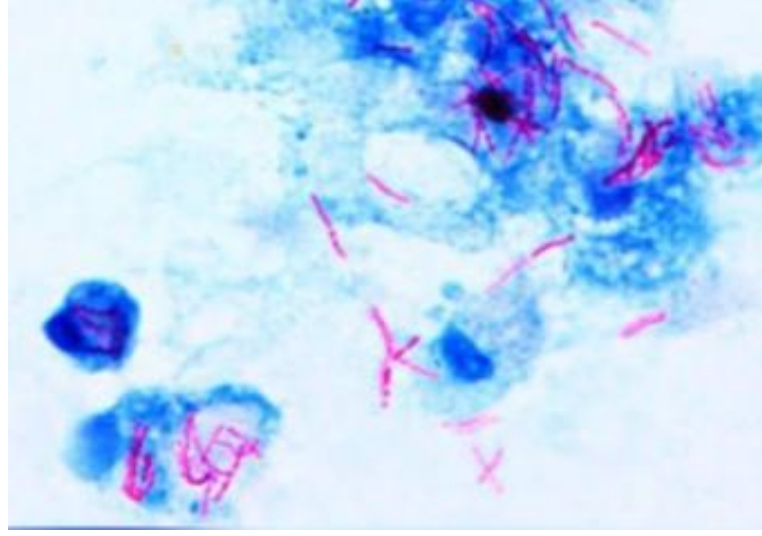
testin mekanizması; önceki enfeksiyon tarafından duyarlı hale getirilen T hücrelerinin lenfokin üretmeleri ile cilt yüzeyine çekilmesi ve bu lenfokinlerin, ödem, lokal vazodilatasyon, fibrin birikimi ve diğer inflamatuvar hücrelerin aktive olmasıyla bölgede endurasyona neden olmaları olarak özetlenebilir (Clark ve Kruse, 1990).

1.7.1.2. Gama İnterferon (IFN- γ) Testi

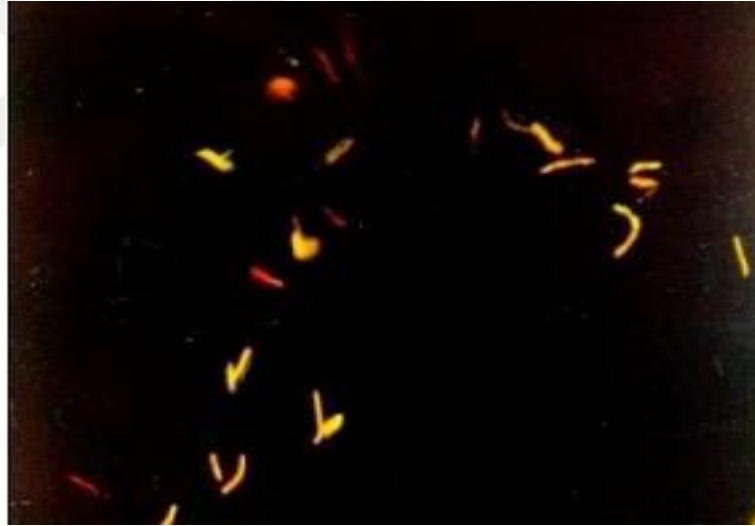
Gama interferon (IFN- γ) testi gibi hücresele bağışıklığı da ölçen kan testleri tanımlanmıştır. IFN- γ testinin duyarlılığı, tek intradermal tüberkülin testinden önemli ölçüde daha yüksektir (Wood ve ark., 1991). Uygulamada hem tüberkülin deri testi hem de IFN- γ testi, bağışıklığı baskılanmış konaklarda gizli tüberkülozu ve hastalığın erken düzeylerini belirlemede etkinliği en üst düzeye çıkarmak için kullanılmaktadır (Kim ve ark., 2009).

1.7.2. *M. bovis*'in Mikroskopik Tanısı

Afrika gibi yoksul ülkelerde, TB teşhisinin dayanak noktası mikroskopidir. EZN ile ışık mikroskopunda veya "auramin O" gibi floresan boyalar ile floresan mikroskobu kullanılarak mikroskopik inceleme gerçekleştirilebilir. Yayma preparatlarının uygun şekilde hazırlanıp yorumlanması gereklidir. *M. bovis* tanımlamasının ön aşaması, boyama özelliklerine olduğu kadar koloni morfolojisine de bağlıdır. *M. bovis* ve tüm mikobakteri türleri, kırmızı kokobasil veya 3 ila 4 μ m uzunluğunda kısa çubuklar olarak görünür ve EZN boyaması ile mavi arka planda kırmızı basillerin görünümü tipiktir (Şekil 1.2). Floresan mikroskopunda ise aside dirençli tüberküloz basili sarıdan turuncuya bir renk aralığında floresan çubuklar olarak görünürler (Şekil 1.3) (Marais ve ark., 2008 ve UTTR, 2014).



Şekil 1.2. EZN boyama ile ARB görünümü.



Şekil 1.3. Floresan boyama ile ARB görünümü (UTTR, 2014).

EZN boyamalı yöntemden daha hassas bir yöntem olmasına rağmen, floresan boyamalı yöntem; pahalı bir floresan mikroskobu yanı sıra karanlık bir oda gerektirmektedir. Düşük maliyetli floresan LED mikroskobu teknolojisindeki son gelişmeler, yüksek hassasiyete sahip cihazların, bu tekniğe ihtiyaç duyulan alanlarda kullanılmasına olanak sağlamıştır (Mizuno ve ark., 2009).

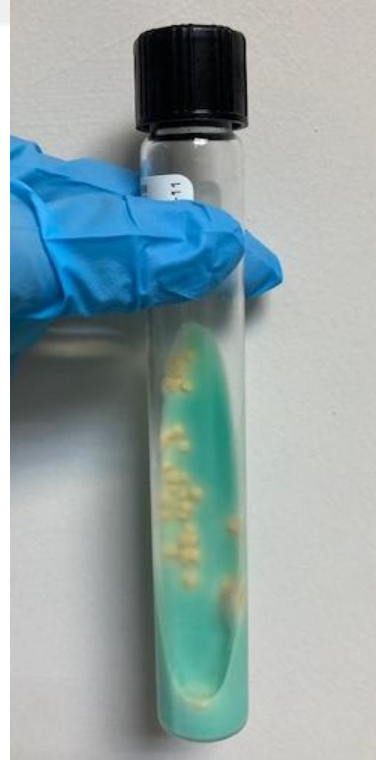
1.7.3. *M. bovis*'in Kültürde Tanısı

Kültür, hastalığın *M. tuberculosis* veya *M. bovis* enfeksiyonu ile ilişkili olup olmadığına bakılmaksızın, MTBC enfeksiyonlarının tanısında “altın standart” olarak kabul edilir. Ancak TB tedavisi gören hastalarda her zaman pozitif bulunmayabilir. Tanı, MTBC'nin Löwenstein-Jensen besiyeri (yumurta bazlı) veya Middlebrook 7H10/7H11 (agar bazlı) veya Middlebrook 7H9 (Şekil 1.4), Middlebrook 7H12 ve Kirshners ortamı gibi sıvı olan farklı seçici besiyerlerinde büyümesi ve izolasyonu ile doğrulanır. Stonebrink'in gliserol içermeyen sodyum piruvat içeren besiyeri de mikobakteriler için iyi besiyeri olabilir. Katı kültür ortamında *Mycobacterium bovis* kolonilerinin, CO₂'li veya CO₂'siz 37°C±1'de minimum 8 hafta (10-12 haftaya kadar uzayabilir) inkübasyonundan sonra ortaya çıkması beklenir (Strong ve Kubica, 1981) (Şekil 1.5).

MGIT 960 (Becton Dickinson, New Jersey, USA) sisteminde Middlebrook 7H9 broth benzeri besiyeri kullanılır ve tüpte oksijene bir florofor bağlanır. Organizmalar oksijeni kullandığında, bu florofor serbest bırakılır ve analizör tarafından algılanır. MB/BacT (BioMerieux, France) sisteminde ise benzer bir besiyeri ortamı kullanılır, ancak algılama yöntemi MGIT 960'tan farklıdır. Bölünen organizmalar tarafından üretilen artan CO₂ varlığında olan pH düşmesini, pH'a bağlı bir sensör algılar (Parrish ve ark., 2009). BACTEC yönteminin dezavantajları, bu yöntemin daha pahalı olması, kültür şişesi okuma cihazı gerektirmesi ve radyoizotopların işlenmesini içermesidir (Ayele ve ark., 2004). Kültür, doğru tür tanımlaması, ilaç duyarlılık testi ve genotipleme testleri için de yapılmalıdır.



Şekil 1.4. MGIT sıvı kültür şişesinde MTBC üremesi.



Şekil 1.5. LJ katı besiyerinde MTBC üremesi.

1.7.4. Fenotipik Özelliklere Dayalı Tanı Testleri

Mycobacterium tuberculosis kompleksi (MTBC) alt türlerinin ayrımı, organizmanın fenotipik özelliklerine dayalı laboratuvar testleri ile gerçekleştirilebilir. Bu testler şunları içerir: koloni morfolojisi, farklı ortamlardaki büyüme özellikleri ve biyokimyasal testler.

Koloni morfolojisi, MTBC alt türleri arasında değişiklik gösterir; kuru ve pürüzlüden düz, düz, kubbeli parlak kolonilere kadar değişir (Pfyffer, 2015). Mikobakterilerin koloni morfolojisi dönüşümünün glikolipidler, lipooligosakkaritler ve mikoitler dahil olmak üzere organizmanın hücre duvarı içeriğindeki değişikliklerle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Belisle ve Brennan, 1989).

Biyokimyasal testler; izonikotirik asit hidrazid (INH), sikloserin, tiyofen-2-karboksilik asit (TCH) inhibisyonu, niasin birikimi, siklosporin, nitrat indirgenmesi, üreaz aktivitesi, nikotin amidaz ve pirazinamidaz aktivitesini içerir. *Mycobacterium bovis*, INH ve TCH duyarlıdır. *M. bovis* için niasin üretimi ve nitrat indirgenmesi negatif iken bunlar *M. tuberculosis* için pozitifdir. *M. bovis*, üreaz pozitif, pirazinamidaz ve nikotinamidaz negatifdir. Tween 80 kullanımı, tellürit indirgenmesi, demir ihtiyacı ve NaCl'a dayanıklılık daha fazla bilgi sağlayabilecek diğer testlerdir. Biyokimyasal testler genellikle Löwenstein–Jensen ortamında yapılır ve sonuçların alınması üç haftaya kadar sürer. Bu testler basit ve ucuz olmasına rağmen, yoğun emek gerektiren, zaman alıcı ve organizmanın yeterli büyümesine bağlı testlerdir. Ayrıca bu testler rutin olarak tüm laboratuvarlarda yapılamamakta ve elde edilen sonuçlar da kesin değildir (Babady ve Wengenack, 2012).

1.7.5. Genotipik Özelliklere Dayalı Tanı Testleri

Tüm moleküler tanı yöntemlerinin temeli, MTBC genomunun belirli bölgelerinde zaman içinde genetik mutasyonların elde edilmesine dayanır, bu nedenle izolatlar arasında benzersiz profiller oluşmaktadır.

PCR tabanlı tiplendirme yöntemleri basit ve ucuz olmasından dolayı kullanılmaktadır. ERIC PCR ve OUT PCR özellikle *M. tuberculosis* ve *M. bovis*'in tiplendirmesi amacıyla kullanılmıştır (Ceyhan, 2010; Gutierrez ve ark., 1995 ve Sechi ve ark., 1999).

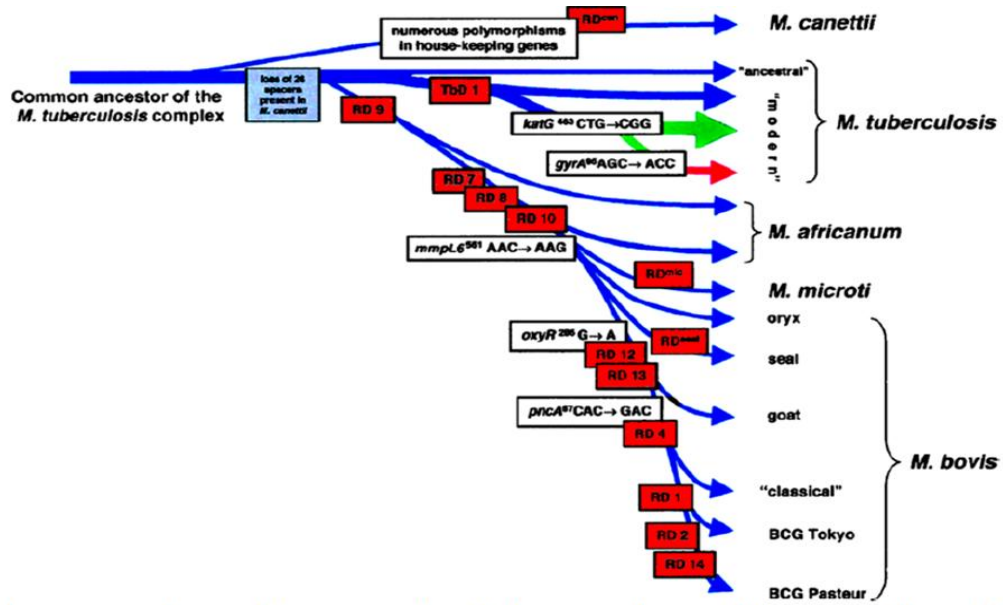
Aynı türdeki iki bakteri suşunda hemen hemen aynı genom olsa da birkaç lokusta farklılıkların ortaya çıkması doğaldır. *M. bovis* için standart referans parmak izi yönteminden başka moleküler epidemiyolojik metodlar tarif edilmiştir (Van Soolingen ve ark., 1991).

1.7.5.1. Genomik Delesyon Tiplendirme (RD delesyon tiplendirme)

Genomik delesyon tiplendirme yöntemi, insanlarda ve hayvanlarda TB'ye neden olduğu bilinen MTBC üyeleri arasında, çeşitli genomik farklılık bölgelerinin (RD: Region Of Different) delesyon tiplendirmesine bağlı olarak ayırım yapmak için geliştirilmiştir. MTBC'nin çeşitli üyelerinin genomları arasındaki antijenik proteinlerin genleri tanımlanmış ve MTBC'nin genetik soyu ve RD'ler, farklı insan popülasyonlarından ve farklı hayvan türlerinden izole edilen MTBC suşlarında değişken genom bölgelerinin dağılımının analizleriyle belirlenmiştir. Bu RD'lerin çoğu DNA sekans delesyonlarından oluşmaktadır. RD'lerdeki rekombinasyon bilinmediğinden, kayıp bir DNA dizisi geri kazanılamaz ve delesyon, MTBC soyunu süresiz olarak karakterize eder (Brosch ve ark., 2002). Hayvana adapte konakçı suşların soyu, RD9 spesifik bölgesinin yokluğu ile karakterizedir (Smith ve ark., 2006). Bu soy grubunda *M. bovis*, *M. microti* ve *M. africanum* vardır ve RD9'un silinmesiyle *M. tuberculosis*'ten ayrılırlar. Korunmuş RD bölgelerinin varlığına veya yokluğuna dayanarak, MTBC'nin son ortak atası ile bir ilişki düzeyi, *M. tuberculosis* ve *M. bovis* soylarının, *M. tuberculosis*'e özgü delesyon TbD1 gerçekleşmeden önce ayrıldığı öne sürülmüştür. Bu bilgilere dayanarak, *M. bovis*'in *M. tuberculosis*'in atası olamayacağı, ancak *M. tuberculosis*'in soyundan geldiği veya bağımsız olarak ortaya çıktığı öne sürülmüştür (Şekil 1.6.) (Brosch ve ark., 2002). RD4 delesyonu, *M. bovis* ve *M. bovis* BCG'yi *M. caprae* ve *M. pinnipedii* gibi yakından ilişkili diğer soylardan

ayırır. *M. bovis* ve *M. tuberculosis* genomları arasındaki aşırı değişken bölgelerin tanımlanması ile MTBC suşlarında önemli değişiklik gösteren birkaç lokus tanımlanmıştır. RD'lerin dağılımı, *M. bovis* suşları arasındaki beş ana grubu ayırt etmemizi sağlar. MTBC'nin önerilen evrimsel şeması, korunmuş ve delesyona uğramış bölgelerin varlığı veya yokluğu yanı sıra seçilen beş gendeki dizi polimorfizmlerine dayanmaktadır (Gordon ve ark., 2001).

M. bovis BCG, antijenik proteinler için genler de dahil olmak üzere bir grup genden (Rv3971 ila Rv3879) ve kültür büyümesi sırasında erken dönemde MTBC tarafından üretilen RD1 bölgesinden yoksundur. *M. tuberculosis* suşlarında RD 1, 2, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 13 ve RD14 bölgeleri yüksek oranda korunur. Bu RD'ler, *M. tuberculosis* suşlarının MTBC'nin diğer üyelerinden, coğrafi kökenlerinden ayırt edebilmesini sağlayan bölgelerdir. Bu bölgelerin *M. tuberculosis*'in konakçı özgüllüğü ile ilişkisi olabilir (Brosch ve ark., 2002). *M. tuberculosis* ve *M. bovis* arasındaki RD4-RD11 bölgelerinin genomik delesyonları ve *M. bovis* suşunun tekrarlanan alt kültürlenmesine bağlı olarak RD1'in delesyona uğraması, *M. bovis* BCG suşunun ortaya çıkması ile sonuçlanmıştır (Gonzalo-Asensio ve ark., 2017).



Şekil 1.6. Belirli soylarda DNA'nın art arda silinmesini gösteren MTBC'nin önerilen evrimsel şeması (Brosch ve ark. 2002).

Şema, korunmuş ve delesyona uğramış bölgelerin varlığı veya yokluğu yanı sıra seçilen beş gendeki dizi polimorfizmlerine dayanmaktadır.

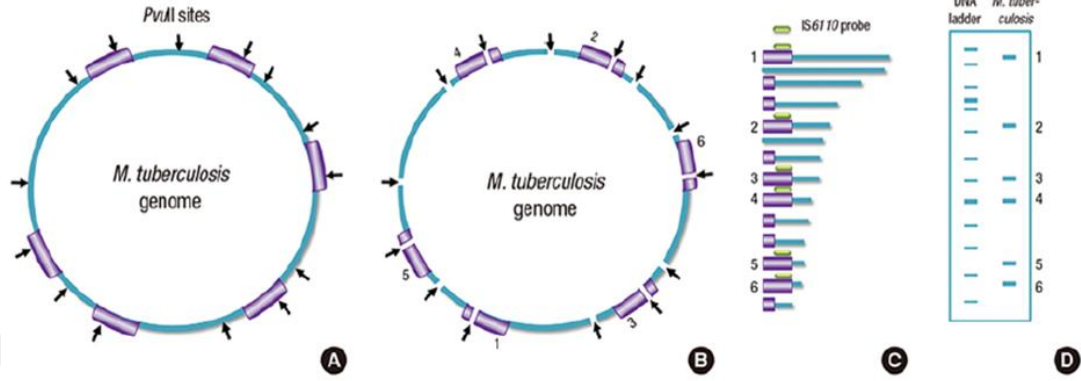
1.7.5.2. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

İnsersiyon segmentleri (IS), çoğu bakteri genomunda yaygın olarak bulunan küçük transpoze edilebilir genetik elementlerdir. IS6110, enterobakteriyel ekleme dizisi elemanlarının IS3 ailesinin bir üyesidir ve MTBC'nin üyelerine özgü çoklu kopyalar halinde sunulduğu düşünülmektedir. MTBC türleri arasında genomda bulunan 0 ila 26 arasında değişen IS6110 kopya sayısı, büyük farklılıklar gösterir ve çoğu suşun 8 ila 15 kopyası vardır ve bu da farklı bir MTBC polimorfizmine neden olur. Örneğin, *M. tuberculosis* genomu 19 kopyaya kadar IS6110 taşıyabilirken, *M. bovis* sadece 1 ila 5 kopya içerir, entegrasyonları için belirli noktalar olmasına rağmen, bu elementler genom arasında dağılmıştır (Flores ve ark., 2010 ve Van Soolingen ve ark., 1991). IS6110 kullanarak yapılan moleküler fingerprinting; organizmanın üretilmesine, genomik DNA ekstraksiyonuna, enzim restriksiyon RFLP'sine, agaroz jel elektroforezine, Southern blotting'e ve işaretli bir prob ile IS elemanlarının saptanmasına dayanır. Bu nedenle, kullanılan restriksiyon enzimi ve probun DNA dizisi birlikte, genomik DNA'daki polimorfizmlerin görselleştirilmesini sağlar (Van Embden ve ark., 1993).

Bu tekniğin ilk adımı DNA'nın kültürden saflaştırılmasıdır, ardından genomu birkaç parçaya bölen, ancak IS6110'u yalnızca bir kez bölen, genomik DNA'nın "PvuII" restriksiyon enzimi ile sindirimi gelir. Elde edilen DNA fragmanları daha sonra agaroz jelleri üzerinde elektroforezlenir ve daha sonra southern blot hibridizasyonunun gerçekleştirildiği bir nitroselüloz membrana aktarılır. İşaretli prob, IS6110 dizisinin 3' ucuna tamamlayıcı olarak hibridize edilir. Hibridizasyon paternindeki her bant, PvuII bölünme bölgeleri arasındaki mesafeye bağlı olarak, farklı uzunluklarda DNA ile çevrili tek bir IS6110 kopyasını gösterir. Son olarak, işaretli prob ile etkileşime giren membrana, tipik olarak fotoğraflanabilen ışıldayan bir reaksiyon üreten bir algılama sistemi uygulanır (Şekil 1.7) (Ei ve ark., 2016).

IS6110-RFLP, ayırmacı gücü yüksek olmasına rağmen zaman alıcıdır ve yüksek DNA kalitesi ve yoğun emek gerektirir. Ayrıca, IS6110-RFLP, *M. bovis* suşları sadece 1 ila 5 kopya IS6110 taşıdığı için *M. bovis* izolatlarının tespiti için

daha az kullanışlıdır. Ek olarak, bu elementler genellikle bu yöntemin diferansiyel kabiliyetini sınırlayan birkaç *M. bovis* suşunun 1.9-kb PvuII fragmanında bulunur (Van Soolingen ve ark., 1991).



Şekil 1.7. RFLP'nin ilkeleri.

(A) PvuII bölünme bölgelerini gösteren insersiyon segmenti IS6110 olan *M. tuberculosis* genomu. (B) Tüm genomun PvuII ile sindirimi. (C) Jel içinde çalıştırıldıktan sonra farklı boyutlardaki DNA segmentleri bir zara aktarılır ve ardından hibridizasyon yapılır. (D) Farklı uzunluklarda DNA ile çevrili IS6110'un tek bir kopyasını temsil eden görselleştirilmiş fragmanlar (Ei ve ark. 2016).

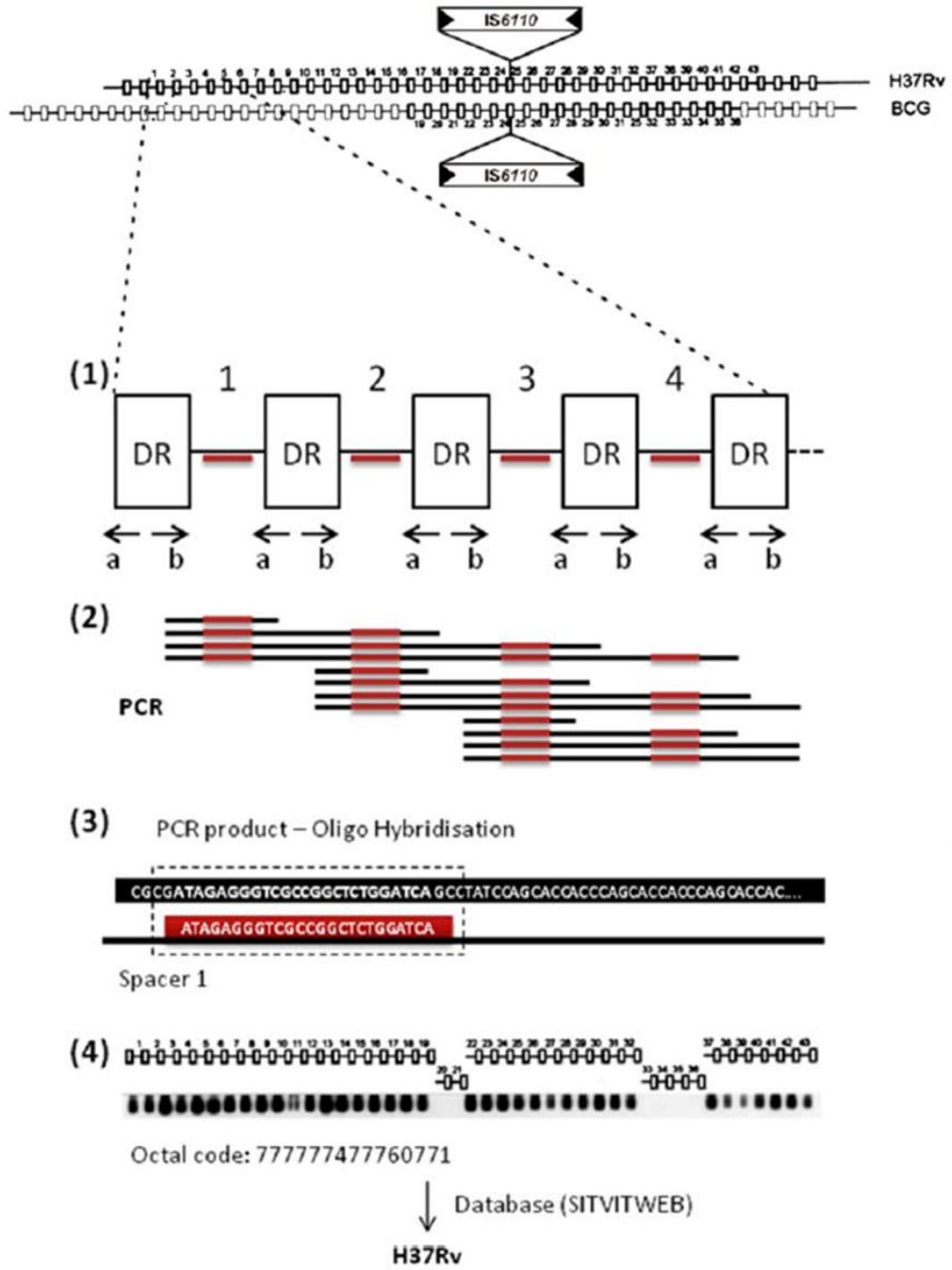
1.7.5.3. Spoligotiplendirme

Spoligotiplendirme (spacer oligonükleotid tiplendirmesi), tüberkülozun tanı ve epidemiyolojisi için hibridizasyona dayalı parmak izi tekniklerine alternatif bir teknik olarak önerilen PCR bazlı moleküler tiplendirme yöntemidir (Kamerbeek ve ark., 1997). Spoligotiplendirme, MTBC suşlarının doğrudan klinik örneklerden saptanmasını ve farklılaşmasını sağlayan ilk genotipik yöntemdir. Bu yöntem, MTBC genomunun doğrudan tekrar (DR: Direct repeat) lokusu içinde bulunan ara birimlerdeki DNA polimorfizmlerinin saptanmasına bağlıdır. Bu lokus, uzunluğu 35-41 bp arasında değişen tekrarlamayan spacer'ların DNA dizileri ile ayrılmış 36 bp uzunluğundaki çoklu doğrudan tekrarlardan (DR'ler) oluşur (Groenen ve ark., 1993). Bu tek lokus, MTBC'in genomik DR bölgesinde 43 serpiştirilmiş spacer (aralayıcı) diziden (daha önce H37Rv laboratuvar suşunda ve *M. bovis* BCG aşısı suşu P3'te tanımlanmış) oluşur. MTBC suşları, DR'lerin sayısına ve belirli spacer dizilerinin varlığına veya yokluğuna göre değişir. DR lokusu 60'tan fazla tür spacer içerir, ancak

bu yöntemin temeli olarak bir dizi 43 spacer seçilmiştir. Bu DR bölgeleri, farklı paternlere sahip suşlar arasında farklılaşmaya izin verir (Smith ve Upton, 2012). MTBC suşlarında, bu spacer'ların yokluğu, DR bölgesinde neredeyse her zaman mevcut olan IS6110 ekleme dizilerinin homolog rekombinasyonu veya transpozisyonu nedeniyle meydana gelebilir (Groenen ve ark., 1993).

Spoligotiplendirme paternleri, tam DR lokusu için PCR amplifikasyonu ile elde edilir ve bu bölgedeki tüm ara parçaların amplifikasyonuna izin verir. Bu PCR, DR bölgesinin biyotinile edilmemiş ve biyotinile primerlerini içerir. Amplifiye ürünler daha sonra bir membran üzerine bir dizi serbest aralayıcı oligonükleotide ters hibridize edilir, her biri, bir dizi MTBC suşundan dizilmiş olan DR içindeki 43 potansiyel benzersiz aralayıcı DNA dizisinden birine karşılık gelir. İkinci antikor daha sonra paternleri görselleştirmek için kullanılır, bu da bir floresan emisyonu ile sonuçlanır (Kamerbeek ve ark., 1997). Spoligotiplendirmenin çıktısı, ortaya çıkan 43 dizinin her birinin hibridizasyonunun sonuçta varlığının veya yokluğunun belirlenmesiyle elde edilir.

Bazı aralayıcıların olmaması, bazı *M. tuberculosis* ve farklı *M. bovis* suşlarını ayırt etmede yardımcıdır. *M. tuberculosis* H37Rv referans suşu; 20, 21 ve 33 ila 36 ara parçalarının yokluğu ile karakterize iken, *M. bovis* BCG, 3, 9, 16 ve 39 ila 43 ara parçalarının yokluğu ile karakterizedir (Şekil 1.8) (Kamerbeek ve ark., 1997). Ayrıca, *M. bovis*'in kaydedilen spoligotip kalıplarının uluslararası veri tabanı ve diğer RD9 delesyonlu soylar, farklı ülkelerden elde edilen sonuçların karşılaştırılmasını kolaylaştırmış ve suşların dağılımını ve yayılmasını aydınlatmaya yardımcı olmuştur. Bu veri tabanı çevrimiçi olarak serbestçe kullanılabilir (Brudey ve ark., 2006). Spoligotiplemeye dayalı MTBC genotiplerinin uluslararası en büyük veri tabanları SİTVİT2 ve SİTVİTWEB'dir (Couvin ve ark., 2019). Spoligotipleri WGS veritabanından çıkarmak için başka araçlar da geliştirilmiştir (Coll ve ark., 2012).



Şekil 1.8. Spoligotip belirleme adımları.

1) *M. tuberculosis* genomunda DR lokus yapısı. 2) Korunmuş DR bölgesini tamamlayan PCR amplifikasyon ürünleri. 3) PCR ürünü-Aralayıcı sekans problemlerini içeren membran üzerine amplifiye DNA fragmanının Oligo Hibridizasyonu. 4) Hibridizasyon paterni sonucu ve sekizli kod türetilir. Spoligotipler, en son, en geniş uluslararası spoligotip veritabanı (SITVIT2) kullanılarak türetilmiştir (Couvin ve ark., 2019).

Spoligotiplendirme, transmisyon bağlantılarını izlemek, endojen reaktivasyonlar gibi iletim modellerini tanımlamak için uygulanabilir. *M. bovis* ve dolaşımdaki basiller ile olası zoonozları tespit etmek için kullanılabilir. Dahası, bu yöntem az miktarda DNA gerektirir ve kültüre, parafine gömülü numunelere ve hücre kültürü lizatlarına ihtiyaç duymadan doğrudan balgam gibi klinik numunelerde kullanılma potansiyeline sahiptir (Driscoll ve ark., 1999). Bu yöntem aynı zamanda belirli bir ülkede *M. tuberculosis* izolatlarının yeni klonal bileşiminin tanımlanmasına ve tüberküloz dinamiklerinin ve göçle ilişkili epidemiyolojik etkilerin izlenmesine de olanak sağlamaktadır (Zozio ve ark., 2005). Bununla birlikte, tek başına spoligotipleme her zaman bilgilendirici değildir ve *M. bovis* suşları arasında yeterli ayrımcılık sağlamaz. Paylaşılan spoligotipleri olan suşlar değişken eşleştirilmiş IS6110 profillerine sahip olabilir, bu nedenle spoligotiplendirmeye tek başına MTBC'nin evrimsel çalışmaları için bir yöntem olarak güvenilemez, ancak VNTR veya RFLP gibi diğer tekniklerle birleştirilebilirse güvenli olur (Kremer ve ark., 2004).

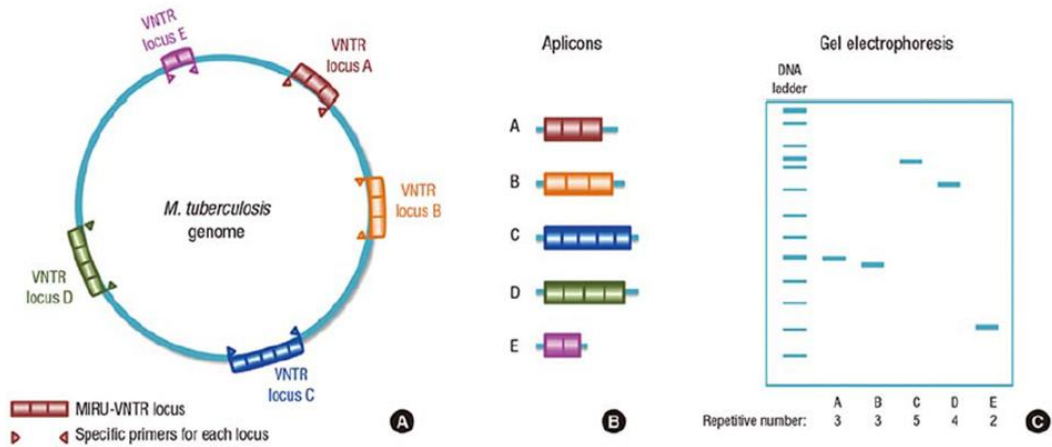
1.7.5.4. Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number Tandem Repeat (MIRU-VNTR)

MIRU, genellikle *M. tuberculosis*'in *senX3-regX3* operonunun intergenik bölgesi boyunca tanımlanan küçük tandem tekrarlayan DNA dizileridir (Supply ve ark., 2001). MIRU tiplendirmesi, MTBC'nin genomu içinde dağıtılan 40-100 bp arasında değişen 41 VNTR'de tanımlanan polimorfizmlere dayanır. Bu değişken tekrar sayısı, seçilen 12, 15 veya 24 MIRU lokusunda tanımlanmıştır ve PCR tabanlı bir yöntem kullanılarak genotipleme için kullanılabilir. Bu PCR tabanlı tiplendirme tekniği ilk olarak adli vakalarda ve babalık testleri için kullanılmıştır (Supply ve ark., 2006).

MIRU-VNTR tiplendirme yöntemi, her bir lokusun, yan bölgelere tamamlayıcı spesifik primerlerle PCR amplifikasyonu ve ardından ampikonların boyutunun saptanması için jel elektroforezi kullanılarak gerçekleştirilir.

Amplikonların büyüklüğü doğrudan tandem tekrar sayısı ile ilişkilidir, önceden bilinen tekrar ünitesinin referansına göre belirlenebilir. Tandem tekrarların sayısı daha sonra her bir basamağın her bir lokusun kopya sayısını temsil ettiği bir koda dönüştürülür (Şekil 1.9) (Supply ve ark., 2001). MIRU lokusları, diğer suşlarda senX3-regX3 interistronik bölgenin 53 bp MIRU'sunun varlığı ve *M. bovis* BCG suşlarından yokluğu nedeniyle *M. bovis* BCG ve virülan MTBC suşları arasında ayırım yapmak için kullanılmıştır. *M. tuberculosis* genomundan bir lokus olan MIRU 21'in tüm *M. bovis* suşlarında bulunmadığı bulunmuştur (Supply ve ark., 2000).

MIRU-VNTR tiplendirme sonuçları dijitaldir ve doğrudan kültüre uygulanabilir, DNA saflaştırmasına yoktur. Bu yöntem *M. tuberculosis* için oldukça ayırmacıdır, ayrıca *M. bovis* tiplemesi için tercih edilen bir yöntem olma potansiyeline sahiptir. *M. bovis* transmisyonunu değerlendirmek için VNTR tiplemesi de kullanılmıştır (Roring ve ark., 2004). MIRU-VNTR belirteçleri daha büyük popülasyona dayalı çalışmalar için yararlı olabilir ve ayrıca suşların sınıflandırılması için değerli tahminler sağlayabilir (Huang ve ark., 2013). Bununla birlikte, henüz standartlaştırılmamıştır ve lokusların allelik çeşitliliği MTBC türleri arasında ve farklı ülkeler arasında farklılık gösterebilir (Supply ve ark., 2001).



Şekil 1.9. MIRU-VNTR genotiplendirme prensibi.

(A) *M. tuberculosis* genomunda dağılmış farklı tekrarlayan sayılara sahip MIRU-VNTR lokusları, her lokus için spesifik primerler ile güçlendirilir. (B) PCR'dan sonra farklı boyutlarda ampliconlar. (C) Her bir VNTR lokusunun tekrarlayan sayısını yansıtan farklı boyutlarda jel elektroforezinden sonra ampliconlar görülebilir (Ei ve ark., 2016).

1.8. Tüberküloz Tedavisi

1.8.1. İnsanlarda Tedavi Yaklaşımı

İnsanlarda tüberkülozun geleneksel tedavisi, izoniazid, rifampin, pirazinamid ve etambutol antibiyotiklerini içeren altı aylık standart bir rejimdir. *M. tuberculosis* ile komplike olmayan TB enfeksiyonu olan insanlar için etkili bir ilaç tedavisi olmasına rağmen, özellikle *M. bovis*'in neden olduğu ekstrapulmoner tüberkülozun hala özel bir tedavisi yoktur ya da oldukça zordur (Maas ve ark., 2013). Ayrıca, *M. bovis* pirazinamid antibiyotiklere karşı doğal bir dirence sahiptir, bu nedenle *M. bovis* enfeksiyonlarının etkin tedavisi için uzun süreli bir antibiyotik kürü gereklidir. Tüberküloz tedavisi etken duyarlı ise, birinci seçenek ilaçlardan oluşan tedavi rejimleri ile yapılmaktadır. Çoğu *M. bovis* kaynaklı vakada hastalarda tüberküloz kaynağının izi sürülmemekte ve bu nedenle insanlarda tedaviye başlamadan önce *M. tuberculosis* enfeksiyonu ile *M. bovis* enfeksiyonu arasında ayırım yapılmamaktadır. Bunun yanı sıra *M. bovis*'in *M. tuberculosis*'ten daha yüksek ölüm oranına sahip bir hastalığa neden olduğu belirtilmektedir (Miller ve Olea-Popelka, 2013).

TB görülme sıklığını azaltmak ve antitüberküloz ilaç direnci gelişmesini engellemek amacıyla hastanın ilaçlarını kullanmasındaki uyumsuzluğu ortadan kaldırmak için Doğrudan Gözetimli Tedavi (DGT) stratejisi ülkemizde de uygulanmaktadır. Hastalar bir gözetmen eşliğinde ilaçlarını alırlar ve bu kayıt altına alınır. DGT ile hastalar saha ziyaretleri ve telefon görüşmeleri ile aktif olarak takip edilmektedirler. Sağlık Bakanlığı'nca tüm veriler aylık olarak toplanmaktadır (Genç Kuzuca, 2016).

Antitüberküloz ilaçlarının ortak özellikleri; konağın dokularında çoğalmakta olan MTBC basillerini hızla öldürmek ve hastalığın görüldüğü bölgeleri sterilize ederek ilaca dirençli mutant suşların ortaya çıkmasını önlemektir (Velayati ve ark., 2009).

DSÖ, antitüberküloz ilaçları, etkinliği ve kimyasal özellikleri gibi çeşitli kriterlere göre beş sınıfta gruplandırmıştır. Birinci sınıfta oral kullanılan ve EMB, INH, PZA ve RIF bulunur. İkinci sınıfta parenteral kullanılan Amikasin, Kapreomisin, Viomisin, Kanamisin ve Streptomisin bulunur. Üçüncü sınıfa dahil olan ilaçlar; Ofloksasin, Levofloksasin, Moksifloksasin, Gatifloksasin eski ve yeni kuşak florokinolonlardır. Dördüncü sınıfa dahil olan ilaçlar ise oral bakteriostatik etkili ikinci seçenek ilaçlardır ve Sikloserin, Etionamid, Para-Amino Salisilik Asit, Protionamid, Terizidon ile Tiasetazon dördüncü sınıftaki ilaçlardır. Beşinci sınıfa dahil ilaçlar ise etkinliği şüpheli ilaçlardır ve Amoksisilin/Klavulanat, Klaritromisin, Klofazimin, İmipenem, Linezolid, Bedakulin Delamanid bu sınıfın üyelerini oluşturur (Sotgiu ve ark., 2015).

DSÖ'nün önerileri ile günümüzde TB tedavisi, birinci seçenek ilaçlar olan INH, RIF, PZA ve EMB'nin iki ay boyunca kullanılıp sonrasında dört ay INH ve RIF ile tedaviye devam edilmesi şeklindedir. İlaça direnç gelişimi ya da intolerans gibi durumlar nedeniyle tedavi başarısızlığı durumunda genellikle daha toksik ve daha düşük etkili olan PAS, Kapreomisin, Florokinolonlar, Kanamisin, Sikloserin ve Etionamid gibi ikinci seçenek antitüberküloz ilaçlar tedaviye dahil edilmektedir (Zhang ve ark., 2006).

1.8.2. Hayvanlarda Tedavi Yaklaşımı

Sığır TB, Hayvan Sağlık Zabıtası Kanunu'na göre bildirim zorunlu bir hastalıktır. Süt sığırcılığı yapanlar her yıl ineklerini TB açısından muayene ettirmeye ve Tüberkülin (PPD) testi yaptırmaya zorunludur. Veteriner hekim, PPD sonucuna göre sağlıklı hayvanlara sağlık belgesi düzenler ve sahibine verir. Hastalıklı hayvanlara ise hastalık raporu düzenlenir ve hastalık çıkışı ilan edilir. Tüberkülozlu hayvanlar değerinin dörtte üçü tazminat olarak verilerek kesilir, etleri düşük değerli et olarak satılır. Hasta hayvanlarda sağaltıma gidilmez (Hayvan Sağlığı ve Zabıtası Kanunu, 1986).

Birçok ülkede sığır TB kontrol programları rutin et muayenesi şeklindedir. Ekonomik olmaması ve TB taşıyıcılığının önlenememesi nedeniyle çiftlik hayvanlarında tedavi önerilmez. Vahşi hayvanlar arasında da tüberkülozun varlığını sürdürmesi eradikasyonu için önemli bir engeldir (Sığır Bovine Tüberkülozu Yönetmeliği, 2009). Pet hayvanlarında TB olgularında ise uygulanan tedavi rejimleri vardır (Gökalp ve Gökalp, 2020).

Tüberkülin (PPD) testi, sığırlarda Sığır TB saptanması için uluslararası uygulanan standart bir yöntemdir. PPD testinde de yanlış pozitiflik ve negatiflik görülebilmektedir, testin duyarlılığı ve özgünlüğü yeterli değildir. Yeni doğum yapmış hayvanlarda hatalı değerlendirmelere neden olabilir. Yanlış negatif sonuçlar hastalığın erken safhasında ya da ileri derecede enfekte hayvanlarda meydana gelebilir. Sığırlara PPD testi, genellikle boynun orta kısmına intradermal tüberkülin enjeksiyonu ile yapılır. Kuyruğun kaudal kıvrımında PPD uygulanabilen bir bölgedir. Testten üç gün sonra uygulama yerinde şişme (gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu) saptanır. Avian ve sığır tüberkülinler karşılaştırmalı olarak uygulanırsa sonuç daha sağlıklı değerlendirilebilir. (Sığır Bovine Tüberkülozu Yönetmeliği, 2009).

1.9. Korunma

Elde edilen bağışıklık düzeyi ve TB enfeksiyona karşı koruması farklılıklar göstermesine rağmen uzun yıllardır tüberküloza bağışıklık sağlamak için var olan tek aşı; BCG aşısıdır. Yeni aşı geliştirme çalışmalarının diğer enfeksiyon etkenlerine olduğu gibi TB enfeksiyonları için de planlanmasının gerekliliği söz konusudur. BCG aşısından farklı seçenekler için hayvan ve insanlarda çalışmalar yapılmaktadır. Attenüe *M. bovis* aşıları, ölü non tüberküloz mikobakteri aşıları, mutant BCG aşıları, DNA aşıları, subunit protein aşıları, viral vektör aşıları ve bunların BCG ile kombinasyonları denenerek aşı geliştirme çalışmaları yürütülmektedir (Mustafa ve ark., 2006).

Sığır tüberkülozu, insanları doğrudan temas ile enfekte edebileceği gibi et, süt ve hayvansal besinlerin yenmesi ile de bulaşabilir. Bu nedenle, ilk olarak insan sağlığı için birtakım önlemler alınması gerekmektedir. Tüberkülin testi ile portör hayvanlar belirlenip imha edilmelidir. Hayvanların alım satımlarında hasta olmayan hayvanlara sağlık sertifikası verilmeli ve bu sertifika alım satımlarda sorgulanmalıdır. Tüm mezbahalarda tüberkülozlu hayvanlar PPD ile belirlenmeli ve bu hayvanların geldiği sürüler izlenerek başka taşıyıcı hayvanların varlığı da araştırılmalı ve PPD pozitif hayvanlar kesilmelidir. Sütler uygun pastörizasyon veya sterilizasyona tabi tutulmalı, bu işlemi gerçekleştiren işletmeler izlenmeli ve sokakta denetimsiz süt satılması engellenmelidir. Hayvan ithalatının tüberküloz ari ülke veya bölgelerden yapılması sağlanarak hayvan kaçakçılığı önlenmelidir. Sığır tüberkülozunu eradike etmeye yönelik proje ve programlar insan ve hayvan sağlıkları ön amaç olarak planlanmalıdır. Yaban hayatındaki hayvanların da tüberküloz bulaşındaki rolleri unutulmamalı ve yaban hayatındaki TB portörleri ile de mücadele edilmelidir. Sığır tüberkülozu ve insan tüberkülozu ile mücadele eş zamanlı yapılarak tek sağlık uygulamaları ile insan kaynaklı tüberkülozun da hayvanlara bulaşı, hayvan kaynaklı tüberkülozun da insanlara bulaşı önlenmeye çalışılmalıdır.

Bu tez çalışmasında, insan ve hayvan kaynaklı *Mycobacterium bovis* izolatlarının spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR yöntemleri ile epidemiyolojik analizinin yapılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmaya Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı bünyesindeki Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı'nda rutin laboratuvar çalışmalarında izole edilen insan kaynaklı *Mycobacterium bovis* suşları (58 suş; 17 adet *M. bovis* BCG ve 41 adet *M. bovis* spp. *bovis*) ve Tarım ve Orman Bakanlığı Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü bünyesindeki Tüberküloz Paratüberküloz ve Ruam Teşhis Laboratuvarı'nda Veteriner Hekim muayenesi sonucu Sığır Tüberkülozu pozitif bulunan 108 sığır kaynaklı doku nekropsi örneklerinden Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı'nda izole edilerek tanımlanan hayvan kaynaklı *Mycobacterium bovis* suşları (50 suş; 50 adet *M. bovis* spp. *bovis*) dahil edildi.

2.1. Gereç

2.1.1. *M. bovis* Suşlarının İzolasyonu ve İdentifikasyonu İçin Gereçler

- Işık mikroskobu
- Preparat kurutucu
- Boya sehpası
- EZN Boyama Seti
- LJ (Lowenstein Jensen) katı besiyeri
- MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) sıvı besiyeri
- Sınıf II Biyogüvenlik Kabini
- CO₂'li İnkübatör
- MGIT 960 otomatize kültür cihazı
- Otoklav

- MTBC-TDM ayrımı için immunokromatografik kaset test
- Birinci seçenek ilaçların (SİREP: Streptomisin, İzoniazid, Rifampisin, Etambutol, Pirazinamid) çözeltileri
- GenoType Mycobacterium MTBC (Hain Lifescience, Almanya) kiti
- Isı döngü cihazı
- Hibridizasyon cihazı
- Otomatik pipetler
- Vorteks
- Santrifüj
- Cryovial tüp 2 ml
- PCR tüpü (0,5 mL -1,5 ml)
- Buzdolabı
- Derin dondurucu

2.1.2. *M. bovis* Suşlarının Genotiplendirmesi İçin Gereçler

2.1.2.1. Spoligotiplendirme İçin Gereçler

- DR bölgesini PCR ile çoğaltmak için primerler (Çizelge 2.1)

Çizelge 2.1. Spoligotiplendirme için kullanılan primerler.

DRa	5'-GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3' (5'ucu biotin ile işaretli)
DRb	5'-CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3'

- *M. bovis* BCG ve *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) standart suşları
- Ultra saf su

- 2X Buffer mix
- Buz aküsü
- Spoligotiplendirmede kullanılacak çözeltiler

20X SSPE: Hazırlandıktan sonra en fazla 6 ay raf ömrü vardır. 175,3 g NaCl, 27,6 g NaH₂PO₄.H₂O ve 7,4 g EDTA karıştırıldı. 10N NaOH ile pH 7,4'e ayarlandı. Hacmi H₂O ile 1 L'ye tamamlandı. Otoklavlandı.

%10 SDS (stok): Her çalışmada taze hazırlanmalıdır. 10 g SDS tartıldı. 100 ml su eklendi. Isıtıcı-karıştırıcı da içine balık konularak eritildi.

2XSSPE: 100 ml 20X SSPE ve 900 ml su steril şişe içerisinde karıştırıldı

2XSSPE 0,1% SDS: 100 ml 20X SSPE, 10 ml 10% SDS ve 890 ml su steril şişe içerisinde karıştırıldı.

2XSSPE 0,5% SDS: 100 ml 20X SSPE, 50 ml 10% SDS ve 850 ml su steril şişe içerisinde karıştırıldı.

%1 SDS: 50 ml %10 SDS ve 450 ml su steril şişe içerisinde karıştırıldı.

M EDTA (pH 8,0): 46,53 g EDTA ve 250 ml su steril şişe içerisinde karıştırıldı. pH 8,0'e ayarlandıktan sonra otoklavlandı.

20mM EDTA (pH 8,0): 40 ml 0,5M EDTA ve 960 ml su steril şişe içerisinde karıştırıldı.

- Isı döngü cihazı (SensoQuest, Germany)
- Spoligotiplendirme membranı (Isogen, Hollanda)

- Miniblotter (FINEPCRcombi-SV120)
- Aspirasyon cihazı
- Hibridizasyon fırını
- Naylon membran
- Streptavidin-peroksidase
- Amersham solüsyonu kiti (ECL Detection kit, Amersham Pharmacia Biotech)
- Görüntüleme cihazı (QUANTUM-ST4 3020-WL/BLUE/20M)

2.1.2.2. MIRU-VNTR Genotiplendirme İçin Gereçler

- MIRU-VNTR öncesi PCR için forward ve reverse primerleri (Çizelge 2.2)
- *M. bovis* BCG ve *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) standart suşları
- 2X HS Prime Taq
- 5 X Q
- MgCl₂
- Agaroz jel elektroforez cihazı ve sarfları
- 1000 bp'lik bir DNA merdiveni (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA)
- Kapiller jel elektroforez cihazı (Beckman Coulter CEQTM 8000 Genetic Analysis System, ABD)
- Görüntüleme cihazı (QUANTUM-ST4 3020-WL/BLUE/20M)

Çizelge 2.2. 24 Lokus MIRU-VNTR metodu için kullanılan primerler ve mix'ler.

MIRU primerler	Primer sequences (5' to 3')	Primer İsimleri	Mix'ler
MIRU 4; ETR D	GCGCGAGAGCCCGAACTGC (FAM) GCGCAGCAGAAACGCCAGC	MIRU4_ETR D-F MIRU4_ETR D-R	Mix1
MIRU 26	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG (VIC)	MIRU26-F MIRU26-R	
MIRU 40	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT (NED) GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA	MIRU40-F MIRU40-R	
MIRU 10	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT (FAM)	MIRU10-F MIRU10-R	Mix2
MIRU 16	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCCTCGTGACGCCCTGGTAC (VIC)	MIRU16-F MIRU16-R	
MIRU 31	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT (NED)	MIRU31_ETR E-F MIRU31_ETR E-R	
Mtub04	CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC (FAM)	Mtub04-F Mtub04-R	Mix3
ETR C	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT (VIC) AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA	ETR_C-F ETR_C-R	
ETR A	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT (NED) CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT	ETR_A-F ETR_A-R	
Mtub30	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT (FAM) ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA	Mtub30-F Mtub30-R	
Mtub39	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC (VIC) TAGAGCGGCACGGGGAAAGCTTAG	Mtub39-F Mtub39-R	Mix4
QUB-4156	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT (NED)	QUB-4156-F QUB-4156-R	
QUB-11b	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT (FAM)	QUB-11b-F QUB-11b-R	
Mtub21	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC (VIC) CAACATCGCCTGGTTCTGTA	Mtub21-F Mtub21-R	Mix5
QUB-26	AACGCTCAGCTGTCCGAT (NED) CGGCCGTGCCGGCCAGTCTCCCGAT	QUB-26-F QUB-26-R	
MIRU 2	TGGA CTTCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT (FAM)	MIRU2-F MIRU2-R	
MIRU 23	CTGTGATGGCCGCAACAAAACG (VIC) AGCTCAACGGGTTCCGCTTTTGTGTC	MIRU23-F MIRU23-R	Mix6
MIRU 39	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT (NED)	MIRU39-F MIRU39-R	
MIRU 20	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG (FAM) GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA	MIRU20-F MIRU20-R	
MIRU 24	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA (VIC)	MIRU24-F MIRU24-R	Mix7
MIRU 27; QUB-5	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA (NED)	MIRU27_QUB-5-F MIRU 27_QUB-5-R	
Mtub29	GCCAGCCCGGTGCATAAACCT (FAM) AGCCACCCGGTGTGCCTTGATGAC	Mtub29-F Mtub29-R	
ETR B	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT (VIC) CGACGGGCCATCTTGATCAGCTAC	ETR_B-F ETR_B-R	Mix8
Mtub34	GGTGCGCACCTGCTCCAGATAA (NED) GGCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC	Mtub34-F Mtub34-R	

2.2. Yöntem

2.2.1. *M. bovis* Suşlarının İzolasyonu ve İdentifikasyonu için Uygulamalar

Tüm örnekler DHK (Dekontaminasyon-Homojenizasyon-Konsantrasyon) işlemi uygulandıktan sonra çalışıldı. İşlenmiş örneklerden preparat hazırlandı. Hazırlanan preparatlar iki saat elektrikli preparat kurutucuda 65-75 °C’de tespit edildi. Preparatlar EZN yöntemiyle boyandı. Boyalı preparatlar ışık mikroskopunda ARB pozitifliği yönünden değerlendirildi. Mikobakteriler mavi zeminde kırmızı basiller olarak değerlendirildi. Diğer mikroorganizmalar mavi renkte gözlendi. DHK işleminden sonra, örneklerden hem LJ besiyerine hem MGIT sıvı besiyerine ekim yapılarak 37 °C’de inkubasyona bırakıldı. 8 hafta besiyerlerindeki üreme olup olmadığı takip edildi. Kontaminasyon gelişen kültürler tekrar ekim yapılarak inkubasyona bırakıldı. Sıvı kültürlerden immunokromatografik kaset test ile pozitif bulunan mikobakterilere ilaç duyarlılık testi (İDT) uygulandı. İDT, MGIT 960 otomatize kültür cihazında birinci seçenek ilaçların çözeltileri kullanılarak proporsiyon yöntemi ile yapıldı. İlaçlara duyarlılık ve direnç durumları değerlendirilerek kaydedildi. Pirazinamid direnci olan izolatlar *M. bovis* yönünden değerlendirme için ayrıldı. Pirazinamid direnci olan izolatlara alttür identifikasyonu yapıldı. Sıvı kültürlerdeki üremelerden ekstraksiyon kiti ile DNA ekstraktı elde edildi. GenoType Mycobacterium MTBC kitinin talimatlarına göre test uygulandı. Mikobakteriler testin yorumlanma rehberine göre alttür düzeyinde identifiye edildi. Kalan DNA ekstraktları genotiplendirme çalışmaları için derin dondurucuya kaldırıldı (UTTR, 2014).

2.2.2. *M. bovis* Suşlarının Genotiplendirmesi

2.2.2.1. Spoligotiplendirme

Derin dondurucuda (-20 °C’de) saklanan DNA ekstraktları çalışma öncesi çıkarıldı. Spoligotiplendirme Kremer ve ark. (2004)’a göre çalışıldı.

DR bölgesini SpoligoPCR ile çoğaltmak için primerler temin edildi. Her bir spoligotiplendirme çalışmasında pozitif kontrol olarak *M. bovis* BCG ve *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) standart suşlarından elde edilen saf DNA ve negatif kontrol olarak ultra saf su kullanıldı. DRa primeri (biotinle işaretli olduğu için +4 °C) ve DRb primerinin (-20 °C’de) saklama koşullarına titizlikle uyuldu. Her bir suş için Çizelge 2.3’deki gibi PCR miksi hazırlandı.

Çizelge 2.3. Bir örnek için PCR miksi.

Reajen	Hacim
2X Buffer mix	25 µl
DRa (20 pmol)	4 µl
DRb (20 pmol)	4 µl
H ₂ O	7 µl
Template DNA	10 µl
Toplam	50 µl

Temiz odada ependorfların içine PCR reaksiyon karışımı hazırlandı. Hazırlanan ependorflar ısı döngü cihazına (Applied Biosystem AB) konularak Çizelge 2.4’deki PCR döngüleriyle oluşturulan programda amplifiye edildi.

Çizelge 2.4. Spoligotiplendirme öncesi PCR döngüleri.

Isı (°C)	Süre	Döngü Sayısı
95 °C	10 dk	25 siklus
96 °C	1 dk	
55 °C	1 dk	
72 °C	30 sn	
72 °C	5 dk	
4 °C		∞

Kaynat patlat yapacağımız altı düz olmayan vida kapaklı ependorflar 1'den 40'a kadar numaralandırıldı. H37Rv ve *M. bovis* BCG için 2'şer ependorf hazırlandı. Her birine 20 µl PCR ürünü ve 150 µl 2XSSPE 0,1% SDS eklendi. Isı bloğunun üzerinde tencerede 10 dk kaynatılarak denatüre edildi ve hemen buz aküsüne alındı. Fazla kalırsa donacağı için donmadan spora alındı. Hibridizasyon fırını 60°C'ye ayarlandı. Spoligotiplendirme membranı 250 ml 2XSSPE 0,1% SDS ile 60°C'de 5 dakika hibridizasyon fırınında hazırlandı. Membran yastığı ve membran miniblotter'a (Miniblotter-3024) yerleştirilirken, miniblotter ve membranın birbirlerine dikey konumda olmalarına dikkat edildi. Miniblotter'ın slotlarda kalan sıvılar aspirasyon cihazı ile aspire edildi. Slotlara denatüre edilmiş PCR ürünü yavaşça konuldu. İlk iki sıraya ve son iki sıraya 2XSSPE 0,1% SDS koyuldu. Miniblotter yatay olarak 60°C'de 60 dakika hibridizasyon fırınında hibridize edildi. Miniblotter'ın slotlardan ürünler aspirasyon cihazı ile aspire edildi. Penset ile membran miniblotter'dan alındı. Yıkama kutusuna koyuldu. Membran her defasında 250 ml 2XSSPE 0,5% SDS ile 60°C'de iki kere 10'ar dk çalkalanarak yıkandı. Naylon membran (mavi) 42°C olan 2XSSPE 0,5% SDS ile ıslatıldı ve membran, naylon membran ile sarıldı. Membran şişeye koyuldu ve soğutuldu. 3 µl streptavidin-peroksidase ve 15 ml 42°C olan 2XSSPE 0,5% SDS tüpte karıştırıldı. Karışım şişenin içine eklendi. Bütün membranın karışım ile ıslanması sağlandı. Hibridizasyon fırınında rotora takılan şişe dönerek 42°C'de 60 dk inkübe edildi. Membran şişeden çıkarıldı ve her defasında 250 ml 2XSSPE 0,5% SDS ile 42°C'de iki kere 10'ar dk çalkalanarak yıkandı. Membran 2XSSPE ile 5 dk oda sıcaklığında çalkalanarak yıkandı. Streptavidin-peroksidaz ile inkübe edildikten sonra, aralayıcılar gelişmiş kemilüminesans saptaması ile saptandı. 15 ml Amersham solüsyonu hazırlandı. (7,5 ml solüsyon A ve 7,5 ml solüsyon B). 2XSSPE uzaklaştırıldı ve Amersham solüsyonu eklendi ve çalkalandı. Spacer'ların görüntülenmesi membran cihaza yerleştirilerek görüntüleme cihazı ile yapıldı. Değerlendirme sonuçları excel formatında hazırlandı.

Membranın tekrar kullanılabilmesi için görüntüleme sonrasında talimatlara uyularak aşağıdaki gibi yıkandı. 250 ml %1 SDS ile 80°C'de 30'ar dk iki kere yıkandı. 20 mM EDTA ile oda sıcaklığında 10 dk yıkandı. 20 mM EDTA membranın

üzerini örtecek şekilde koyuldu. Kutunun üzerine membranın kullanım sayısı ve tarih yazılarak buzdolabına (+4°C) kaldırıldı.

2.2.2.2. MIRU-VNTR Genotiplendirme

Derin dondurucuda (-20°C) saklanan DNA ekstraktları çalışma öncesi çıkarıldı. MIRU-VNTR Supply ve ark. (2006)'a göre çalışıldı.

Çalışılacak MIRU lokusları için Çizelge 2.2'de verilen primerler temin edildi. Her bir MIRU-VNTR çalışmasında pozitif kontrol olarak *M. bovis* BCG ve *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) standart suşlarından elde edilen saf DNA ve negatif kontrol olarak ultra saf su kullanıldı. Primerlerin (-20°C'de) saklama koşullarına titizlikle uyuldu. Her bir suş için öncelikle PCR ile amplifikasyon yapıldı. PCR için reaksiyon karışımı Çizelge 2.5'de belirtildiği şekilde hazırlandı.

Çizelge 2.5. Bir örnek için PCR miksi.

Reajen	Hacim
2X HS Prime Taq	12,5 µl
5X Q	5 µl
Forward Primer	3 µl
Reverse Primer	1,5 µl
MgCl ₂	1 µl
Template DNA	2 µl
Toplam	25 µl

Hazırlanan reaksiyon karışımı ısı döngü cihazında Çizelge 2.6'da belirtilen ısı, süre ve döngü sayısında amplifiye edildi.

Çizelge 2.6. MIRU öncesi PCR döngüleri.

Isı (°C)	Süre	Döngü Sayısı
95 °C	10 dk	25 siklus
94 °C	45 sn	
57 °C	1 dk	
72 °C	1 dk	
72 °C	5 dk	
4 °C		∞

PCR sonrası oluşan ampliconlara 120 Voltta, 60 dakika, GelRed ile boyanmış %1,5'lik agaroz jelde elektroforez uygulandı. PCR ürünlerinin varlıkları 1000 bp'lik bir DNA merdiveni ile karşılaştırılarak gözlemlendi. Elektroforez sonrası jelin görüntülenmesi görüntüleme cihazı ile yapıldı. Amplicon gözlenen örnekler, kapiller jel elektroforez cihazında analiz edildi. Analiz plate'ine 2 µl dilüe edilmiş PCR örneği, üzerine 31 µl Sample loading mix (0,5 µl Size Marker ve 30 µl Sample Loading Solution) eklendi. Ayrıca Separation plate'i hazırlanarak cihaza yüklendi. Cihaz çalışması bittikten sonra her bölgenin fragman uzunlukları not edilerek kod'ları referansa göre hesaplandı. Her bölgenin fragman uzunluklarına göre kod'larının olduğu referans Çizelge 2.7'de verilmiştir. Allellerin tekrarlanma sayıları, fragman büyüklüklerine dayanılarak her bir MIRU lokusu için belirlendi. Cihazdan alınan fragman uzunlukları excel formatında hazırlandı.

Çizelge 2.7. MIRU lokuslarının MIRU-VNTR tekrar sayıları ve amplikon boyutları.

Locus Convention	Mix 1		Mix 2		Mix 3		Mix 4					
	MIRU 04 580	MIRU 26 2996	MIRU 40 802	MIRU 10 960	MIRU 16 1644	MIRU 31 3192	Mtub04 424	ETRA 2165	ETRC 577	Mtub30 2401	Mtub39 3690	QUB4156 4156
Allele												
0	175	285	354	482	565	492	537	195	171	252	272	563
1	252	336	408	537	618	545	588	270	208	305	330	622
2	329	387	462	590	671	598	639	345	266	363	388	681
3	406	438	516	643	724	651	690	420	324	421	446	740
4	483	489	570	696	777	704	741	495	382	479	504	799
5	560	540	624	749	830	757	792	570	440	537	562	858
6	637	591	678	802	883	810	843	645	498	595	620	917
7	714	642	732	855	936	863	894	720	556	653	678	976
8	791	693	786	908	989	916	945	795	614	711	736	1035
9	868	744	840	961	1042	969	996	870	672	769	794	1094
10	1022	846	894	1014	1095	1022	1047	945	730	827	852	1153
11	1099	897	1002	1067	1148	1075	1098	1020	788	885	910	1212
12	1176	948	1056	1173	1254	1181	1200	1170	904	1001	1026	1330
13	1253	999	1110	1226	1307	1234	1251	1245	962	1059	1084	1389
14	1330	1050	1164	1279	1360	1287	1302	1320	1020	1117	1142	1448
Locus Convention												
Allele												
0	67	116	153	402	150	540	437	395	498	335	347	326
1	136	149	264	455	200	593	514	447	551	392	404	380
2	205	206	375	508	253	646	591	501	604	449	461	434
3	274	263	486	561	306	699	668	555	657	506	518	488
4	343	320	597	614	359	752	745	609	710	563	575	542
5	412	377	708	667	412	805	822	663	763	620	632	596
6	481	434	819	720	465	858	899	717	816	677	689	650
7	550	491	930	773	518	911	976	771	869	734	746	704
8	619	548	1041	826	571	964	1053	825	922	791	803	758
9	688	605	1152	879	624	1017	1130	879	975	848	860	812
10	757	662	1263	932	677	1070	1207	933	1028	905	917	866
11	826	719	1374	985	730	1123	1284	987	1081	962	974	920
12	895	776	1485	1038	783	1176	1361	1041	1134	1019	1031	974
13	964	833	1596	1091	836	1229	1438	1095	1187	1076	1088	1028
14	1033	890	1707	1144	889	1282	1515	1149	1240	1133	1145	1082
15	1102	947	1818	1197	942	1335	1592	1203	1293	1190	1202	1136
Locus Convention												
Allele												
0	2163	Mtub21 1955	QUB26 4052	MIRU 02 154	MIRU 23 2531	MIRU 39 4348	MIRU 20 2059	MIRU 24 2687	MIRU 27 3007	Mtub29 2347	ETRB 2461	Mtub34 3171

3. BULGULAR

3.1. *M. bovis* Suşlarının İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Sığır TB olduğu düşünölen 108 sığırdan alınan granuloılu sığır nekropsi materyallerinden 50 adet *M. bovis* izolatu elde edildi. EZN boyama ile %46,3 (50/108) pozitiflik saptandı. Tüberküloz etkeni tespiti için çalışılan insan örneklerinden izole edilen 58 mikobakteri izolatuının ise EZN boyama ile 24'ünün ARB pozitif olduğu retrospektif incelemede göröldü. Örnekten yapılan preparatta ARB negatif değeriendirilse de pozitif sıvı költürlerden yapılan EZN boyama ile ARB pozitifliğı gözlendi. Tüm izolatlar sıvı költürlerinden yapılan immunokromatografik kaset test ile pozitif bulunarak MTBC olarak tanımlandı. MTBC'lere sıvı költürlerinden İDT yapıldı. İzolatların tamamının SİRE (Streptomisin, İzoniazid, Rifampisin, Etambutol) antitüberküloz ajanlarına duyarlı ve pirazinamide dirençli olduğu göröldü. Sıvı költürdeki üremelerden DNA ekstraktı elde edildi ve moleküler çalışmalarda kullanıldı. *M. bovis* olabileceğı ön görölen pirazinamid dirençli izolatlara GenoType Mycobacterium MTBC kiti ile çeşitli numunelerden izole edilen 58 insan kaynaklı *M. bovis* izolatuının 17'si (%29,3) *M. bovis* BCG olarak tanımlanırken, 41'i (%70,7) *M. bovis* spp. *bovis* olarak tanımlandı. Çizelge 3.1'de çalışmadaki insan kaynaklı izolatların identifikasyon bulguları gösterildi. Sığır akciğer lenf yumrularından izole edilen 50 hayvan kaynaklı izolatların tamamı GenoType Mycobacterium MTBC kiti ile *M. bovis* spp. *bovis* olarak tanımlandı. Çizelge 3.2'de çalışmadaki hayvan kaynaklı izolatların identifikasyon bulguları gösterildi.

Çizelge 3.1. İnsan kaynaklı izolatların kodları ve identifikasyon bulguları.

Suş Kodu	Orijin	Numune	Şehir	Tarih	SIRE-P	MTBC Alt türü
H-1	İnsan	Doku Biyopsi	Erzincan	2019	SSSS- R	<i>M.bovis BCG</i>
H-2	İnsan	Abse	Trabzon	2019	SSSS- R	<i>M.bovis BCG</i>
H-3	İnsan	Balgam	İstanbul	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-4	İnsan	Balgam	Konya	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-5	İnsan	Doku Biyopsi	Konya	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-6	İnsan	Balgam	İstanbul	2019	SSSS- R	<i>M.bovis BCG</i>
H-7	İnsan	İdrar	Konya	2019	SSSS- R	<i>M.bovis BCG</i>
H-8	İnsan	Abse	Konya	2019	SSSS- R	<i>M.bovis BCG</i>
H-9	İnsan	Lenf Nodu Biyopsi	Ankara	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. caprae</i>
H-10	İnsan	AMS	İstanbul	2019	SSSS- R	<i>M.bovis BCG</i>
H-11	İnsan	Doku Biyopsi	Şırnak	2020	SSSS- R	<i>M.bovis BCG</i>
H-12	İnsan	Balgam	İstanbul	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-13	İnsan	Doku Biyopsi	İstanbul	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-14	İnsan	AMS	İstanbul	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-15	İnsan	BAL	Konya	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-16	İnsan	Doku Biyopsi	Trabzon	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-17	İnsan	Doku Biyopsi	Aksaray	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-18	İnsan	Balgam	Zonguldak	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-19	İnsan	Balgam	Antalya	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-20	İnsan	Doku Biyopsi	Erzurum	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-21	İnsan	Abse	Konya	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-22	İnsan	Balgam	İstanbul	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-23	İnsan	Doku Biyopsi	Konya	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-24	İnsan	Balgam	Eskişehir	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-25	İnsan	Balgam	Tekirdağ	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-26	İnsan	Doku Biyopsi	Konya	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-27	İnsan	BAL	Ankara	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-28	İnsan	Doku Biyopsi	Aksaray	2021	SSSS- R	<i>M.bovis BCG</i>
H-29	İnsan	Doku Biyopsi	Denizli	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-30	İnsan	BAL	Konya	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-31	İnsan	Balgam	Antalya	2021	SSSS- R	<i>M.bovis BCG</i>
H-32	İnsan	Yara aspiratı	Kayseri	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-33	İnsan	Balgam	Bolu	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-34	İnsan	Doku Biyopsi	Gaziantep	2021	SSSS- R	<i>M.bovis BCG</i>
H-35	İnsan	Balgam	Konya	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-36	İnsan	Abse	Konya	2021	SSSS- R	<i>M.bovis BCG</i>
H-37	İnsan	Abse	Mardin	2021	SSSS- R	<i>M.bovis BCG</i>
H-38	İnsan	Balgam	Diyarbakır	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-39	İnsan	Abse	Adana	2021	SSSS- R	<i>M.bovis BCG</i>
H-40	İnsan	Abse	İstanbul	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>

Çizelge 3.1. Devamı. İnsan kaynaklı izolatların kodları ve identifikasyon bulguları.

Suş Kodu	Orijin	Numune	Şehir	Tarih	SIRE-P	MTBC Alt türü
H-41	İnsan	Balgam	İstanbul	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-42	İnsan	Balgam	Burdur	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-43	İnsan	Abse	Kırıkkale	2021	SSSS- R	<i>M.bovis BCG</i>
H-44	İnsan	Abse	Ankara	2021	SSSS- R	<i>M.bovis BCG</i>
H-45	İnsan	Balgam	Tekirdağ	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-46	İnsan	Balgam	Konya	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-47	İnsan	Balgam	Gaziantep	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-48	İnsan	Balgam	Bilecik	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-49	İnsan	Doku Biyopsi	Bilinmiyor	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-50	İnsan	Doku Biyopsi	Diyarbakır	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-51	İnsan	Doku Biyopsi	Diyarbakır	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-52	İnsan	Doku Biyopsi	Rize	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-53	İnsan	Abse	Ankara	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-54	İnsan	Doku Biyopsi	Diyarbakır	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-55	İnsan	Doku Biyopsi	Diyarbakır	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
H-56	İnsan	Abse	Şırnak	2022	SSSS- R	<i>M.bovis BCG</i>
H-57	İnsan	Abse	Konya	2022	SSSS- R	<i>M.bovis BCG</i>
H-58	İnsan	Balgam	Ankara	2022	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>

H: Human (İnsan) olarak kodlanmıştır.

S: Duyarlı

R: Dirençli

Çizelge 3.2. Hayvan kaynaklı izolatların kodları ve identifikasyon bulguları.

Suş Kodu	Orijin	Numune	Tarih	SIRE-P	MTBC Alt türü
B-1	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-2	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-3	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-4	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-5	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-6	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-7	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-8	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-9	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-10	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-11	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-12	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-13	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-14	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-15	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-16	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>

Çizelge 3.2. Devamı. Hayvan kaynaklı izolatların kodları ve identifikasyon bulguları.

Suş Kodu	Orijin	Numune	Tarih	SIRE-P	MTBC Alt türü
B-17	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-18	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-19	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-20	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-21	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-22	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-23	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2019	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-24	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-25	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-26	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-27	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-28	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-29	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-30	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-31	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-32	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-33	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-34	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-35	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-36	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-37	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-38	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-39	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2020	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-40	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-41	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-42	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-43	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-44	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-45	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-46	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-47	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-48	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-49	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>
B-50	Hayvan	AC Lenf yumrusu	2021	SSSS- R	<i>M.bovis spp. bovis</i>

B: Bovis (Sığır) olarak kodlanmıştır.

S: Duyarlı

R: Dirençli

AC: Akciğer

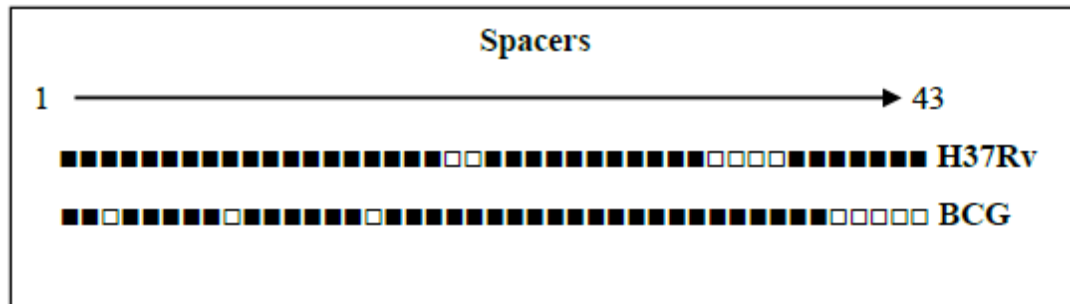
3.2. *M. bovis* Suşlarının Genotiplendirme Bulguları

3.2.1. Spoligotiplendirme Bulguları

Spoligotiplendirme metodunda sonuçların yorumlanmasında spacer bölgelerinin varlığı değerlendirilirken, membrana bağlı oligonükleotidlerin PCR ürünleri ile hibridizasyonu sonucu oluşan koyu görülen bölgeler pozitif olarak değerlendirildi. Sonuçlar excel formatında spacer'ların varlığına göre '1' ve yokluğunda '0' olacak şekilde hazırlandı. Spoligotiplendirme sonuçlarının değerlendirilmesinde Şekil 3.1'deki oktal kodlar kullanılmıştır.

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

Şekil 3.1. Spoligotiplendirme sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan oktal kodlar.



Şekil 3.2. Spoligotiplendirme paternleri (*M. tuberculosis* H37Rv ve *M. bovis* BCG).

M. tuberculosis H37Rv suşunda 20–21 ve 33-36 spacerları yoktur ve *M. bovis* BCG suşunda 3, 9, 16 ve 39-43 ara parçaları yoktur. Bu suşlar, spoligotiplendirme için kontrol olarak kullanıldı (Şekil 3.2).

Elde edilen sonuçlar Mbovis.org (<http://www.mbovis.org>) ve SITVIT2 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2/links.jsp>) databaselerinde değerlendirildi, kümeler ve familyalar (clade) belirlendi.

İnsan Kaynaklı İzolatların SIT, Lineage ve SB Number Bulguları:

Spoligotiplendirme çalışmaları sonucu elde edilen veriler ile binary ve octal kodlar elde edildi. Binary ve octal kodlar, SITVIT2 database'inde değerlendirildiğinde SIT, lineage ve hexadecimal kodları elde edildi. SB number kodları ise binary ve octal kodların Mbovis.org database'inde değerlendirilmesiyle elde edildi. İnsan kaynaklı izolatların spoligo binary, oktal ve hexadecimal kodları, SIT, spoligofamilya (Lineage) ve SB sayıları Çizelge 3.3'de gösterildi.

Bulgular incelendiğinde spacer gözlemlenmeyen H-8'in SB2277 olarak kodlandığı görüldü. SIT ve lineage tanımlanamadı. H-11 ve H-31 değerlendirilemedi. Standart suş *M. bovis* BCG ile birlikte 16 izolat (%27,6) SIT482/SB0120 ve lineage BOV_1 olarak tanımlandı. Çalışmada insan kaynaklı izolatlar en sık SIT482/SB0120 tipinde görülmüştür. Bunun yanı sıra 8 izolat (%13,8) SIT1118/SB0989 ve lineage BOV_1, 7 izolat (%12,1) SIT685/SB0288 ve lineage BOV, 4 izolat (%6,9) SIT3529/SB0920 ve lineage BOV_1, bir izolat SIT1185/SB0897 ve lineage BOV_1, bir izolat SIT3710/SB1595 ve lineage BOV_1, bir izolat SIT688/SB0129 ve lineage BOV_1 olarak tanımlandı.

SIT kodu tanımlanamayan 18 izolattan bir izolat SB0419 ve lineage BOV_4-CAPRAE, bir diğeri SB1231 ve lineage BOV_1 olarak tanımlandı. 4 izolat (%6,9) SB2466, birer izolat sırasıyla SIT3687/SB1625 ve SB2277 kodunda iken bu izolatların SIT ve lineage kodları database'de bulunamadı. 10 adet izolatın (%17,2) hiçbir kodu database'de bulunamadı ve bu izolatlar 'yeni izolat' olarak yorumlandı.

Hayvan Kaynaklı İzolatların SIT, Lineage ve SB Number Bulguları:

Spoligotiplendirme çalışmaları sonucu elde edilen veriler ile binary ve octal kodlar elde edildi. Binary ve octal kodlar, SITVIT2 database'inde değerlendirildiğinde SIT, lineage ve hexadecimal kodları elde edildi. SB number kodları ise binary ve octal kodların Mbovis.org database'inde değerlendirilmesiyle elde edildi. İnsan kaynaklı izolatların spoligo binary, oktal ve hexadecimal kodları, SIT, spoligofamilya (Lineage) ve SB sayıları Çizelge 3.4'de gösterildi.

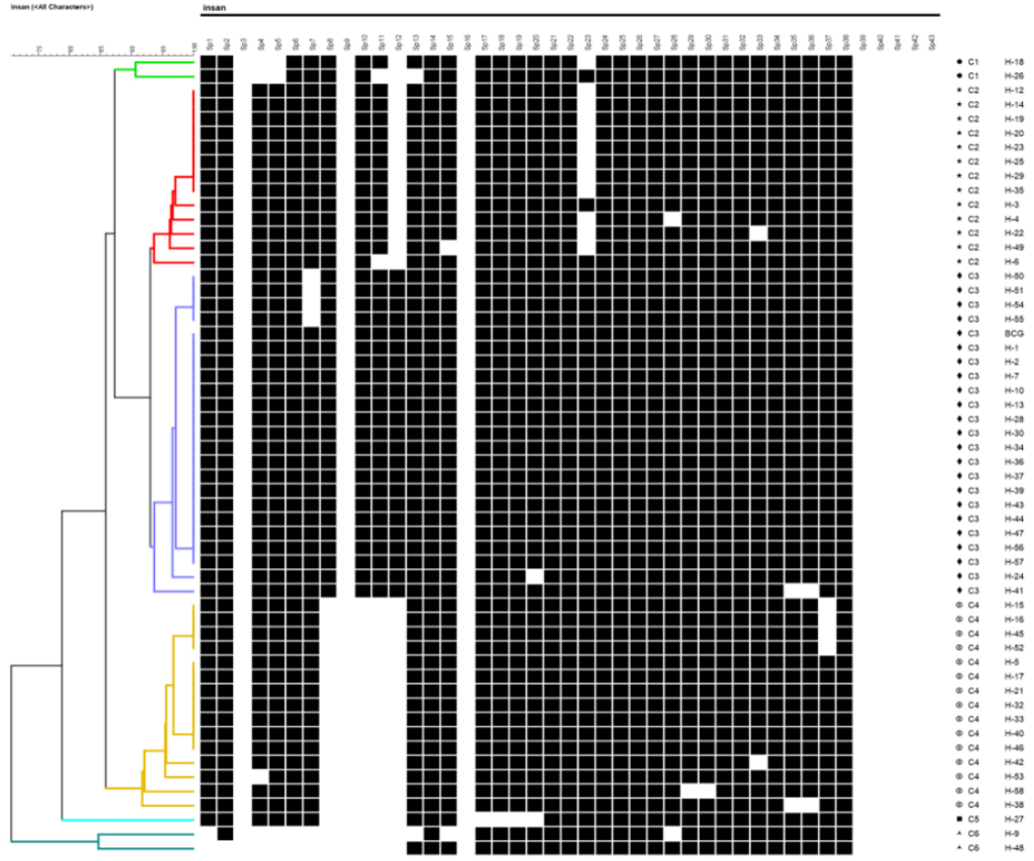
Bulgular incelendiğinde spacer gözlemlenmeyen B-21'in SB2277 olarak kodlandığı görüldü. SIT ve lineage tanımlanamadı. Standart suş *M. bovis* BCG ile birlikte bir izolat SIT482/SB0120 ve lineage BOV_1 olarak tanımlandı. Çalışmada hayvan kaynaklı izolatlar en sık 12 izolatta (%24) SIT1118/SB0989 ve lineage BOV_1 tipinde görülmüştür. Bunun yanı sıra, 6 izolat (%12) SIT685/SB0288 ve lineage BOV, bir izolat SIT1185/SB0897 ve lineage BOV_1 olarak tanımlandı.

SIT kodu tanımlanamayan 29 izolattan bir izolat SB0419 ve lineage BOV_4-CAPRAE olarak tanımlandı. 13 izolat SB1593, bir izolat SB2510 kodunda iken bu izolatların SIT ve lineage kodları database'de bulunamadı. 14 adet izolatın (%28) hiçbir kodu database'de bulunamadı ve bu izolatlar 'yeni izolat' olarak yorumlandı.

Spoligotiplendirme sonucunda elde edilen kodlar BioNumerics software 7.5 (Applied Maths, East Flanders, BE) bilgisayar programı ile analiz edildi. Dendrogramlar, BioNumerics software 7.5'de (Applied Maths, East Flanders, BE) UPGMA (unweighted pair-grouping method analysis algorithm) kullanılarak oluşturuldu. İzolatlar arasındaki benzerlik katsayıları hesaplanarak köken ilişkisi belirlendi.

İnsan Kaynaklı Suşlarda Spoligotiplendirme ile Dendogram Bulguları:

Spoligotiplendirme çalışmaları sonucunda, H-11 ve H-31 tüm spacer'ları pozitif olduğu için; H-8'in hiçbir spacer'ında pozitiflik gözlenmediğinden dendogram oluşturulurken değerlendirme dışı bırakıldı. 55 insan kaynaklı izolat ve *M. bovis* BCG standart suşunun binary kodları ile dendogram oluşturuldu. İnsan kaynaklı izolatlarda 6 farklı kümelenme görüldüğü Şekil 3.3'de gösterildi. Spoligotiplendirme sonucu insan kaynaklı izolatlarda görülen kümeler ve görülme oranları Çizelge 3.5'de özetlendi. Spoligotiplendirilen izolatların %40'ı *M. bovis* BCG standart suşu ile birlikte C3 kümesinde bulunuyordu. *M. bovis* BCG standart suşu ile tamamen aynı binary koda sahip olan 16 izolat *M. bovis* BCG olarak değerlendirildi. C3 kümesi en çok izolata yer aldığı kümedir. C1 ve C6 kümelerinde ikişer izolat yer almaktaydı. C6 kümesindeki iki izolattan biri (H-9) Mbovis.org ve SITVIT2 databaselerinden elde edilen verilerle birlikte *Mycobacterium caprae* olarak değerlendirildi. Diğer izolat ise (H-48) *M. bovis* spp. olarak değerlendirildi. İzolatların %27,3'ünün bulunduğu C4 ve %23,6'sının bulunduğu C2 kümeleriyle birlikte C5 kümesindeki tek izolat ve C2 kümesindeki izolatlar Mbovis.org ve SITVIT2 databaselerinden elde edilen veriler de dikkate alınarak *M. bovis* spp. *bovis* olarak değerlendirildi.



Şekil 3.3. İnsan kaynaklı izolatların spoligotiplendirme ile dendogramı.

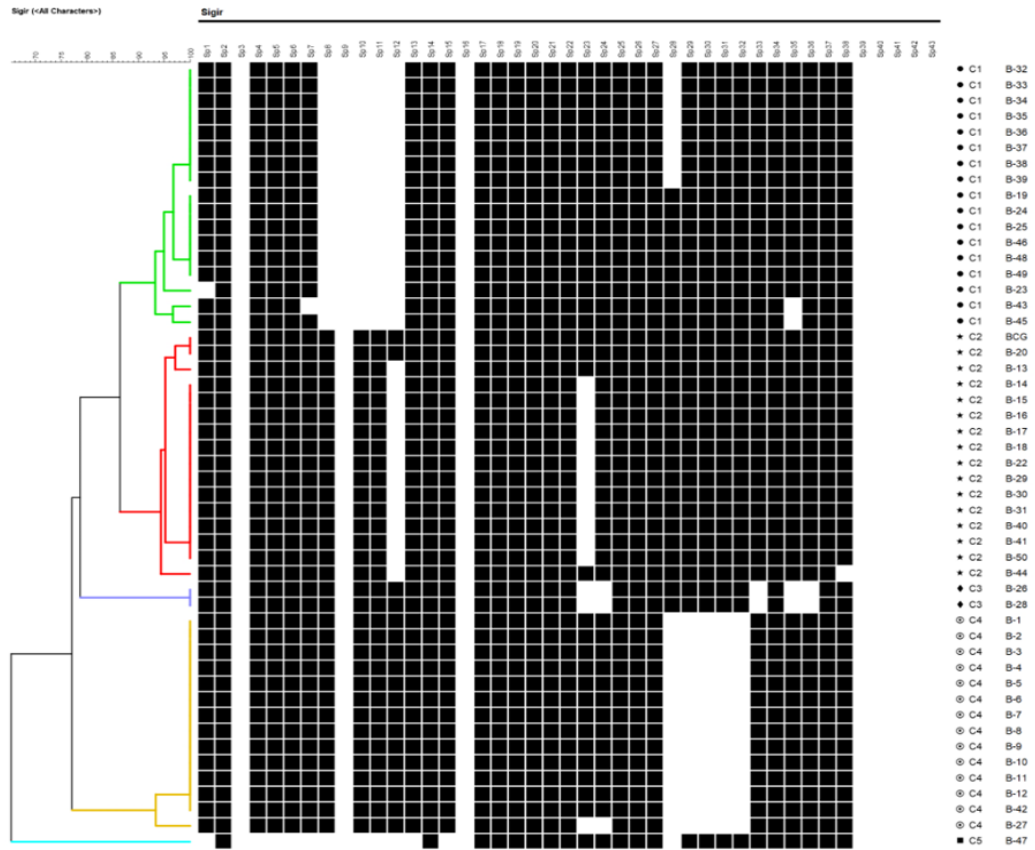
Çizelge 3.5. Spoligotiplendirme sonucu insan kaynaklı izolatlarda görülen kümelenmeler.

Renk	Adet	Küme	Yüzde
Yeşil	2	C1	3,6
Kırmızı	13	C2	23,6
Mavi	22+BCG	C3	40
Sarı	15	C4	27,3
Yanık	1	C5	1,8
Yeşilimsi	2	C6	3,6

Hayvan Kaynaklı Suşlarda Spoligotiplendirme ile Dendogram Bulguları:

Spoligotiplendirme çalışmaları sonucunda, B-21'de hiç spacer gözlenmediğinden dendogram oluşturulurken değerlendirme dışı bırakıldı. 49 sığır kaynaklı izolat ve *M. bovis* BCG standart suşunun binary kodları ile dendogram oluşturuldu. Hayvan kaynaklı izolatlarda 5 farklı kümelenme görüldüğü Şekil 3.4'de gösterildi. Spoligotiplendirme sonucu hayvan kaynaklı izolatlarda görülen kümeler ve görülme oranları Çizelge 3.6'da özetlendi. Spoligotiplendirilen izolatların %30,6'sı *M. bovis*

BCG standart suşu ile birlikte C2 kümesinde bulunuyordu. *M. bovis* BCG standart suşu ile tamamen aynı binary koda sahip olan bir izolat (B-20) *M. bovis* BCG olarak değerlendirildi. En çok izolatanın yer aldığı C1 kümesinde izolatların %34,7'si yer almaktaydı. İzolatların %28,6'sının bulunduğu C4 ve 2 adet izolattan oluşan C3 kümeleriyle birlikte C1 kümesindeki izolatlar Mbovis.org ve SITVIT2 databaselerinden elde edilen veriler de dikkate alınarak *M. bovis spp. bovis* olarak değerlendirildi. Tek izolatl C5 kümesinde (B-47) ise Mbovis.org ve SITVIT2 database verileriyle MTBC üyesi *Mycobacterium caprae*'nin bulunduğu görüldü.



Şekil 3.4. Hayvan kaynaklı izolatların spoligotiplendirme ile dendogramı.

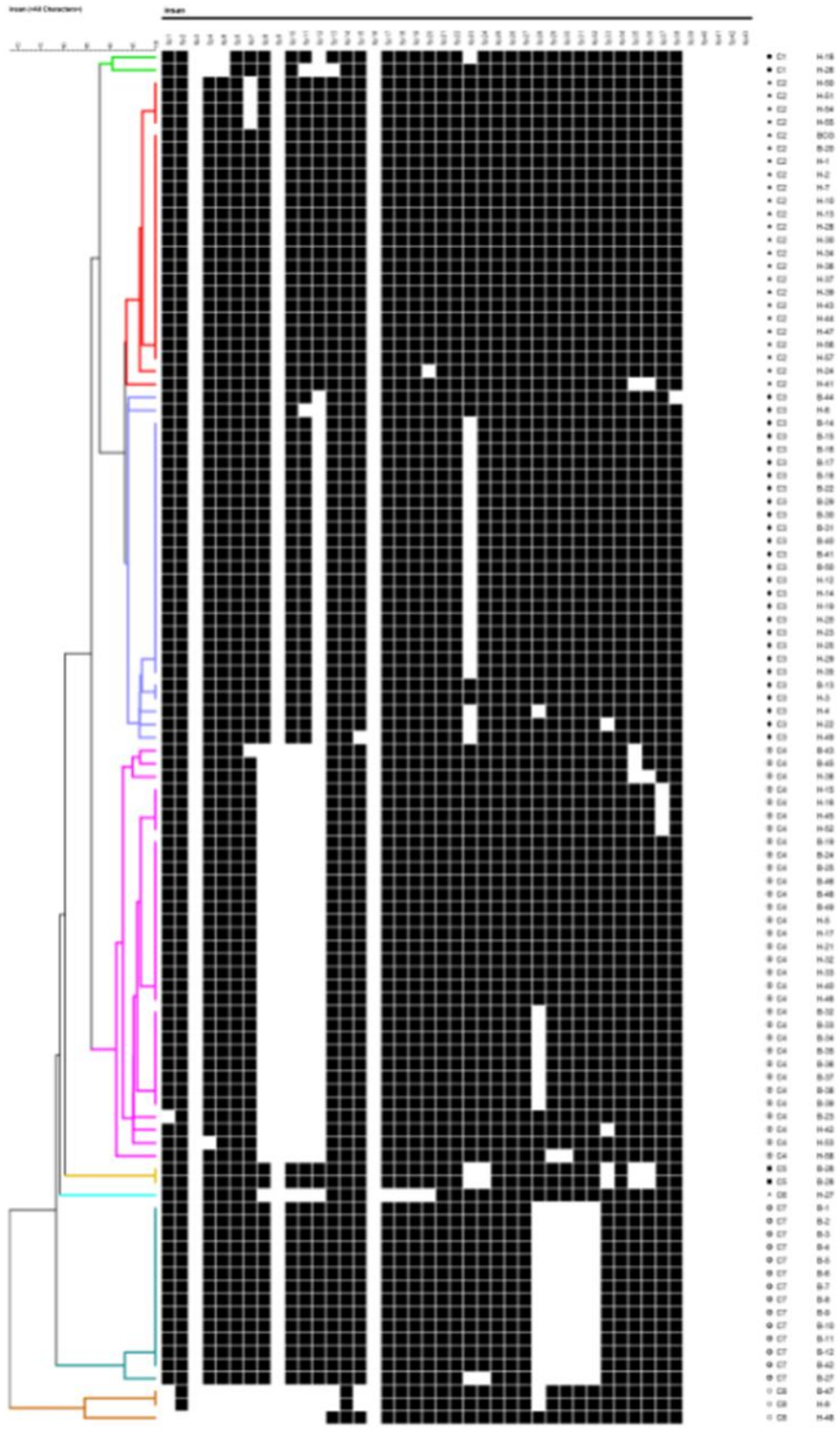
Çizelge 3.6. Spoligotiplendirme sonucu hayvan kaynaklı izolatlarda görülen kümelenmeler.

Renk	Adet	Küme	Yüzde
Yeşil	17	C1	34,7
Kırmızı	15+BCG	C2	30,6
Mavi	2	C3	4,1
Sarı	14	C4	28,6
Yanık Sarı	1	C5	2

İnsan ve Hayvan Kaynaklı İzolatlar Bir Arada Spoligotiplendirme ile Dendogram Bulguları: Spoligotiplendirme çalışmaları sonucunda değerlendirme dışı bırakılan 4 izolat (H-11, H-31, H-8 ve B-21) harici dendogram oluşturuldu. 49'u sığır kaynaklı ile 55'i insan kaynaklı olmak üzere 104 izolat birlikte değerlendirilerek dendogram oluşturulduğunda 8 farklı kümelenme görüldüğü Şekil 3.5'de gösterildi. Spoligotiplendirme sonucu görülen kümeler ve görülme oranları Çizelge 3.7'de özetlendi. C2 kümesinde (%22,12) standart suş BCG ile birlikte bir adet hayvan kaynaklı (B-20) suş ile 22 adet insan kaynaklı suş bulunuyordu, bu izolatlardan *M. bovis* BCG standart suşu ile tamamen aynı binary koda sahip olan 16 izolat *M. bovis* BCG olarak değerlendirildi. İzolatların %25,96'sının yer aldığı C3 kümesinde hayvan kaynaklı 14 genotip ile insan kaynaklı 13 genotip bulunmaktaydı. C3 kümesindeki Sp3, Sp9, Sp11, Sp16, Sp23 ve Sp39-43'den yoksun olan genotipin insan kaynaklı 8, hayvan kaynaklı 12 genotipte tamamen aynı olması türler arası benzer genotip olarak yorumlandı. İzolatların %30,78'sinin bulunduğu C4 kümesi hayvan kaynaklı 15 genotip ile insan kaynaklı 17 genotipin bulunduğu en çok izolatanın yer aldığı küme idi. C4 kümesindeki Sp3, Sp8-12, Sp16 ve sp39-43'den yoksun olan genotipin insan kaynaklı 7, hayvan kaynaklı 6 genotipte tamamen aynı olması türler arası benzer genotip olarak yorumlandı. C7 kümesi, 14 genotipin (%13,46) görüldüğü en kalabalık dördüncü kümeydi. Bu kümede ise birbirinin aynı spoligotiplendirme sahip 13 hayvan kaynaklı suş ile diğerlerinden farklı olarak Sp23 ve Sp24'ü de olmayan bir hayvan kaynaklı izolat (B-27) bulunmaktaydı. C1 (H-18 ve H-26) ve C5 (B-26 ve B-28) kümelerinde ikişer izolat yer almaktaydı. C6 (H-27) kümesi ise tek izolatlardı. C8 kümesindeki üç izolatanın tamamen aynı binary koddaki iki üyesi (B-47 ve H-9) Mbovis.org ve SITVIT2 veritabanlarından elde edilen verilerle birlikte *Mycobacterium caprae* olarak değerlendirildi. Diğer izolat ise (H-48) *M. bovis* olarak değerlendirildi, alttür düzeyinde yorum yapılamadı.

Çizelge 3.7. Spoligotiplendirme sonucu insan ve hayvan kaynaklı suşlarda görülen kümelenmeler.

Renk	Adet	Küme	Yüzde
Yeşil	2	C1	1,92
Kırmızı	23+BCG	C2	22,12
Mavi	27	C3	25,96
Pembe	32	C4	30,78
Sarı	2	C5	1,92
Yanık Sarı	1	C6	0,96
Yeşilimsi Mavi	14	C7	13,46
Kahverengi	3	C8	2,88



Şekil 3.5. İnsan ve hayvan kaynaklı izolatların birlikte spoligotiplendirme ile dendrogram.

Spoligotiplendirme ile Genotipler: Hayvan (49) ve insan (55) kaynaklı 104 izolat birlikte değerlendirilerek dendogram oluşturulduğunda 8 farklı küme ve 30 farklı genotip gözlemlendi. Dört farklı (G3, G4, G5 ve G6) genotip içeren C2 kümesinde (%22,12) en sık görülen G4 genotipi (%16,35) standart suş BCG ile birlikte bir adet hayvan kaynaklı (B-20) suş ve 22 adet insan kaynaklı suşta tamamen aynı binary koda sahipti. G4 genotipindeki (SIT482/SB0120) tüm izolatlar *M. bovis* BCG (aşı suşu) olarak değerlendirildi. G3 (SIT3529/SB0920), G5 (SIT3710/SB1595) ve G6 (SB1231) C2 kümesinde yer alan diğer genotiplerdi. İzolatların %25,96'sının yer aldığı C3 kümesinde hayvan kaynaklı 14 genotip ile insan kaynaklı 13 genotip bulundu. C3 kümesinde insan kaynaklı 8, hayvan kaynaklı 12 izolatta en sık (%19,23) görülen G9 genotipi (SIT1118/SB0989) türler arası benzer genotip olarak yorumlandı. C3 kümesindeki bir insan ve bir hayvan kaynaklı izolatta görülen G10 genotipi de (SIT1185/SB0897) türler arası benzer genotiplere örnektir. C4 kümesi (%30,78) hayvan kaynaklı 15 genotip ile insan kaynaklı 17 genotipin bulunduğu en çok izolata ve genotipin yer aldığı küme idi. C4 kümesinde insan kaynaklı 7, hayvan kaynaklı 6 izolatta görülen G18 genotipi (SIT685/SB0288) türler arası benzer genotiplerin başka bir göstergesidir. 14 izolata (%13,46) bulunduğu C7 kümesindeki birbirinin aynı spoligotiplendirmeye sahip 13 hayvan kaynaklı izolat G27 genotipinde (SB1593) görüldü. C8 kümesindeki üç izolata tamamen aynı binary koddaki iki üyesi (B-47 ve H-9) Mbovis.org ve SITVIT2 databaselerinden elde edilen verilerle birlikte *Mycobacterium caprae* olarak değerlendirildi. Türler arası benzer genotiplere *Mycobacterium caprae* izolatları da örnek oldu. Spoligotiplendirme sonuçlarına göre tanımlanan genotipler, konak ve ülke orjinleri Çizelge 3.8'de gösterildi.

Çizelge 3.8. Spoligotiplendirme ile saptanan genotipler.

Suş sayısı	% oranı	Genotip	Cluster (Küme)	adet	SIT	Lineage	SB sayısı	Ülke
1H	0,96	G1	C1	2	Yeni	Not defined	New pattern	
1H	0,96	G2			Yeni	Not defined	New pattern	
4H	3,85	G3	C2	23+BCG	3529	BOV_1	SB0920	Fransa
BCG-1B-16H	16,35	G4			482	BOV_1	SB0120	
1H	0,96	G5			3710	BOV_1	SB1595	İtalya
1H	0,96	G6			Yeni	BOV_1	SB1231	İspanya
1B	0,96	G7			Yeni	Not defined	New pattern	
1H	0,96	G8	C3	27	688	BOV_1	SB0129	Birleşik Krallık
12B-8H	19,23	G9			1118	BOV_1	SB0989	Almanya
1B-1H	1,92	G10			1185	BOV_1	SB0897	Fransa
1H	0,96	G11			Yeni	Not defined	New pattern	
1H	0,96	G12			Yeni	Not defined	New pattern	
1H	0,96	G13			Yeni	Not defined	New pattern	
1B	0,96	G14			Yeni	Not defined	New pattern	
1B	0,96	G15			Yeni	Not defined	New pattern	
1H	0,96	G16			Yeni	Not defined	New pattern	
4H	3,85	G17			Yeni	Not defined	New pattern	
6B-7H	12,5	G18	C4	32	Yeni	Not defined	SB2466	Türkiye
8B	7,69	G19			685	BOV	SB0288	Birleşik Krallık
1B	0,96	G20			Yeni	Not defined	New pattern	
1H	0,96	G21			Yeni	Not defined	New pattern	
1H	0,96	G22			Yeni	Not defined	New pattern	
1H	0,96	G23			Yeni	Not defined	New pattern	
2B	1,92	G24			Yeni	Not defined	New pattern	
1H	0,96	G26			Yeni	Not defined	New pattern	
13B	12,5	G27			Yeni	Not defined	SB1593	İtalya
1B	0,96	G28			Yeni	Not defined	New pattern	
1B-1H	1,92	G29	C8	3	Yeni	BOV_4-CAPRAE	SB0419	İsveç
1H	0,96	G30			3687	BOV	SB1625	İspanya

H: Human (insan) olarak kodlanmıştır. B: Bovis (Sığır) olarak kodlanmıştır.

SIT: Spoligotype International Type Yeni: Orphan or New

C: Cluster (Küme) G: Genotip

3.2.2. MIRU-VNTR Genotiplendirme Bulguları

Bu çalışmada değerlendirilen 58 adet insan kaynaklı izolatın yedisi (H-1, H-3, H-8, H-11, H-31, H-36 ve H-56) ile 50 adet hayvan kaynaklı izolatın altısı (B-13, B-21, B-24, B-25, B-48 ve B-49) ile yapılan PCR çalışmalarında amplicon elde edilemediğinden 24 lokus MIRU-VNTR genotiplendirmesi yapılamadı. Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.10'da SITVIT2 database'den elde edilen SIT, Lineage ve MIRU verileri (12-MIT, 15-MIT, 24-MIT ve VIT) bulunmaktadır. 51 insan kaynaklı ve 44 sığır kaynaklı olmak üzere 95 izolat birlikte MIRU-VNTR ile değerlendirildi.

İnsan Kaynaklı İzolatların MIRU-VNTR Bulguları: SITVIT2 database'den elde edilen MIRU verilerini (12-MIT, 15-MIT, 24-MIT ve VIT) incelediğimizde tümünün yeni izolat olarak tanımlandığı görüldü. Bulgular incelendiğinde standart suş *M. bovis* BCG ile birlikte SIT482/SB0120 ve lineage BOV_1 olarak tanımlanan 8 izolatın ve SIT688/SB0129 ve lineage BOV_1 olarak tanımlanan bir izolatın 12-MIT kodu 281 bulundu. Hiçbir kodu database'de bulunamayan ve yeni izolat olarak tanımlanan iki izolatın 12-MIT kodu 49 bulundu. SIT482/SB0120 ve lineage BOV_1 olarak tanımlanan bir izolatın ise 12-MIT kodu 5 bulundu. Hiçbir izolatın 15-MIT, 24-MIT ve VIT kodları database'de bulunamadı ve tümü yeni izolat olarak yorumlandı.

Çizelge 3.9. İnsan kaynaklı izolatlarda SITVIT2'ye göre SIT, Lineage, 12-MIT, 15-MIT, 24-MIT ve VIT kodları.

Strain	Spoligotype43	SIT	Lineage	MIRU 12	12-MIT	MIRU 15	15-MIT	MIRU 24	24-MIT	VNTR	VIT
H-1	6767377777600	482	BOV_1								
H-2	6767377777600	482	BOV_1	312324253322	Yeni	123532373500122	Yeni	312324253322357350012232	Yeni	35713	Yeni
H-3	6766737777600	1185	BOV_1								
H-4	676673757377600	Yeni	Not defined	232324253323	Yeni	3235332104313340	Yeni	2323242533232510431333430	Yeni	251033	Yeni
H-5	6740737777600	685	BOV	232324253222	Yeni	323522292312342	Yeni	2323242533222259231233432	Yeni	25932	Yeni
H-6	6764737777600	688	BOV_1	212324253322	281	123532373500122	Yeni	212324253322357350012232	Yeni	35713	Yeni
H-7	6767377777600	482	BOV_1	212324253322	281	123532373540122	Yeni	212324253322357354012232	Yeni	35713	Yeni
H-8											
H-9	2000237777600	Yeni	BOV_4-CAPRAE	2310424253522	Yeni	3104552365333240	Yeni	2310424253522336533323422	Yeni	33635	Yeni
H-10	6767377777600	482	BOV_1	212324253322	281	123532373500122	Yeni	212324253322357350012232	Yeni	35713	Yeni
H-11	7777777777771	523	Manu_ancestor								
H-12	67667375777600	1118	BOV_1	232324253323	Yeni	3235332102312340	Yeni	2323242533232510231233432	Yeni	251033	Yeni
H-13	6767377777600	482	BOV_1	232324233022	Yeni	3233023132732340	Yeni	2323242330223313273233432	Yeni	331330	Yeni
H-14	67667375777600	1118	BOV_1	232324253323	Yeni	3235332102312340	Yeni	2323242533232510231233432	Yeni	251033	Yeni
H-15	6740737777600	Yeni	Not defined	232324253222	Yeni	323522292512342	Yeni	232324253222269251233432	Yeni	26932	Yeni
H-16	6740737777600	Yeni	Not defined	232324253222	Yeni	323522292512342	Yeni	232324253222269251233432	Yeni	26932	Yeni
H-17	6740737777600	685	BOV	232324253221	Yeni	323521272511342	Yeni	232324253221257251133432	Yeni	25732	Yeni
H-18	61667375777600	Yeni	Not defined	232324253323	Yeni	3235332104312340	Yeni	2323242533232510431233432	Yeni	251033	Yeni
H-19	67667375777600	1118	BOV_1	232324253323	Yeni	3235332102312340	Yeni	2323242533232510231233432	Yeni	251033	Yeni
H-20	67667375777600	1118	BOV_1	232324253323	Yeni	3235332104312340	Yeni	2323242533232510431233430	Yeni	251033	Yeni
H-21	6740737777600	685	BOV	232324253222	Yeni	323522292512372	Yeni	232324253222239251233732	Yeni	23932	Yeni
H-22	6766737577600	Yeni	Not defined	232324253323	Yeni	323533273312342	Yeni	232324253323257331233432	Yeni	25733	Yeni
H-23	6766737577600	1118	BOV_1	232324253323	Yeni	3235332104312340	Yeni	2323242533232510431233432	Yeni	251033	Yeni
H-24	6767375777600	3710	BOV_1	232324233322	Yeni	323332392712342	Yeni	232324233322359271233432	Yeni	35933	Yeni
H-25	6766737577600	1118	BOV_1	232324253323	Yeni	3235332104312340	Yeni	2323242533232510431233432	Yeni	251033	Yeni
H-26	6164377777600	Yeni	Not defined	232324253323	Yeni	323533292712342	Yeni	232324253323259271233432	Yeni	25933	Yeni
H-27	6740701777600	Yeni	Not defined	232324253223	Yeni	323523294312342	Yeni	232324253223259431233432	Yeni	25932	Yeni
H-28	6767377777600	482	BOV_1	232324233322	Yeni	323332391712342	Yeni	232324233322359171233432	Yeni	35933	Yeni
H-29	6766737577600	1118	BOV_1	242324253323	Yeni	423533294312342	Yeni	242324253323259431233422	Yeni	25943	Yeni
H-30	6767377777600	482	BOV_1	232324233322	Yeni	323332392712342	Yeni	232324233322359271233432	Yeni	35933	Yeni
H-31	7777777777771	523	Manu_ancestor								
H-32	6740737777600	685	BOV	232324253222	Yeni	323522292412342	Yeni	232324253222239241233432	Yeni	23932	Yeni
H-33	6740737777600	685	BOV	232324253222	Yeni	323522292512342	Yeni	232324253222259251233432	Yeni	25932	Yeni
H-34	6767377777600	482	BOV_1	212324253322	281	123532373500152	Yeni	212324253322357350012532	Yeni	35713	Yeni

Çizelge 3.9. Devami. İnsan kaynaklı izolatlarda S1TVIT2'ye göre SIT, Lineage, 12-MIT, 15-MIT, 24-MIT ve VIT kodları.

Strain	Spoligotype43	SIT	Lineage	MIRU 12	12-MIT	MIRU 15	15-MIT	MIRU 24	24-MIT	VNTR	VIT
H-35	676673757777600	1118	BOV_1	232324253323	Yeni	3235332104312340	Yeni	23232425332325104312333432	Yeni	251033	Yeni
H-36	676773777777600	482	BOV_1								
H-37	676773777777600	482	BOV_1	212324253322	281	123532373500122	Yeni	212324253322357350012232	Yeni	35713	Yeni
H-38	6740737777774600	Yeni	Not defined	232324253322	49	323532272412341	Yeni	232324253322247241234431	Yeni	24733	Yeni
H-39	676773777777600	482	BOV_1	212324253322	281	123532373500120	Yeni	212324253322357350012230	Yeni	35713	Yeni
H-40	674073777777600	685	BOV	242324253222	Yeni	423522293512142	Yeni	242324253322259351212412	Yeni	25942	Yeni
H-41	6767737777774600	Yeni	BOV_1	232324233322	Yeni	3233322392712342	Yeni	232324233322359271233432	Yeni	35933	Yeni
H-42	674073777777600	Yeni	Not defined	232324253322	Yeni	323522262512342	Yeni	232324253322256251233432	Yeni	25632	Yeni
H-43	676773777777600	482	BOV_1	212324253322	281	123532373500120	Yeni	212324253322357350012230	Yeni	35713	Yeni
H-44	676773777777600	482	BOV_1	212324253322	281	123532273500120	Yeni	212324253322257350012230	Yeni	25713	Yeni
H-45	674073777777200	Yeni	Not defined	332324243222	Yeni	323422292517340	Yeni	332324243222269251733430	Yeni	26932	Yeni
H-46	674073777777600	685	BOV	232324253222	Yeni	323522292512342	Yeni	232324253322259251233432	Yeni	25932	Yeni
H-47	676773777777600	482	BOV_1	222324253322	5	223532394512342	Yeni	222324253322359451233432	Yeni	35923	Yeni
H-48	7377777600	Yeni	Not defined	232324243222	Yeni	323422272512342	Yeni	232324243222257251233432	Yeni	25732	Yeni
H-49	676663757777600	Yeni	Not defined	232324253323	Yeni	3235332104212340	Yeni	2323242533232510421233430	Yeni	251033	Yeni
H-50	672773777777600	3529	BOV_1	239324233322	Yeni	3933323112512350	Yeni	2393242333223511251233530	Yeni	351133	Yeni
H-51	672773777777600	3529	BOV_1	239324233322	Yeni	3933323112512350	Yeni	2393242333223511251233530	Yeni	351133	Yeni
H-52	674073777777200	Yeni	Not defined	232324253222	Yeni	323522292512340	Yeni	232324253322259251233430	Yeni	25932	Yeni
H-53	634073777777600	Yeni	Not defined	232324253322	49	323532272412341	Yeni	232324253322257241233431	Yeni	25733	Yeni
H-54	672773777777600	3529	BOV_1	239324233322	Yeni	3933323112512350	Yeni	2393242333223511251233530	Yeni	351133	Yeni
H-55	672773777777600	3529	BOV_1	239324233322	Yeni	3933323112512350	Yeni	2393242333223511251233530	Yeni	351133	Yeni
H-56	676773777777600	482	BOV_1								
H-57	676773777777600	482	BOV_1	212324253322	281	123532373500122	Yeni	212324253322357350012232	Yeni	35713	Yeni
H-58	6740737777774600	Yeni	Not defined	232324253222	Yeni	323522292511442	Yeni	232324253322259251143432	Yeni	25932	Yeni
H37Rv	777774777760771	451	T-H37Rv	220026233021	Yeni	200301255522224	Yeni	220026233021235552224234	Yeni	23520	Yeni
BCG	676773777777600	482	BOV_1	212324253322	281	123532373500122	Yeni	212324253322357350012232	Yeni	35713	Yeni

H: Human (insan) olarak kodlanmıştır. MIT: MIRU International Type
SIT: Spoligotype International Type VIT: VNTR International Type
Yeni: Orphan or New

Hayvan kaynaklı izolatların MIRU-VNTR bulguları: SİTVIT2 database'den elde edilen MIRU verilerini (12-MIT, 15-MIT, 24-MIT ve VIT) incelediğimizde tümünün yeni izolat olarak tanımlandığı görüldü. 12-MIT, 15-MIT, 24-MIT ve VIT kodları da databas'de bulunamadı.

Çizelge 3.10. Hayvan kaynaklı izolatlarda SİTVIT2'ye göre SIT, Lineage, 12-MIT, 15-MIT, 24-MIT ve VIT kodları.

Strain	Spoligotype43	SIT	Lineage	MIRU 12	12-MIT	MIRU 15	15-MIT	MIRU 24	24-MIT	VNTR	VIT
B-1	676773777017600	Yeni	Not defined	23232423331022	Yeni	3233102476413340	Yeni	23232423331022437641233432	Yeni	437310	Yeni
B-2	676773777017600	Yeni	Not defined	2323242333322	Yeni	323332476412342	Yeni	232324233322437641233432	Yeni	43733	Yeni
B-3	676773777017600	Yeni	Not defined	2323242333122	Yeni	323312476412342	Yeni	2323242333122437641233432	Yeni	43731	Yeni
B-4	676773777017600	Yeni	Not defined	2323242333322	Yeni	323332476412342	Yeni	232324233322437641233432	Yeni	43733	Yeni
B-5	676773777017600	Yeni	Not defined	232324233322	Yeni	323332476412342	Yeni	232324233322437641233432	Yeni	43733	Yeni
B-6	676773777017600	Yeni	Not defined	232324233322	Yeni	32333247712342	Yeni	232324233322437271233432	Yeni	43733	Yeni
B-7	676773777017600	Yeni	Not defined	232324233322	Yeni	32333247712342	Yeni	232324233322437271233432	Yeni	43733	Yeni
B-8	676773777017600	Yeni	Not defined	232324233322	Yeni	323332412712342	Yeni	232324233322431271233432	Yeni	43133	Yeni
B-9	676773777017600	Yeni	Not defined	232324233322	Yeni	32333247712342	Yeni	232324233322437271233432	Yeni	43733	Yeni
B-10	676773777017600	Yeni	Not defined	232324233322	Yeni	32333247712342	Yeni	232324233322437271233432	Yeni	43733	Yeni
B-11	676773777017600	Yeni	Not defined	232324233322	Yeni	32333247712342	Yeni	232324233322437271233432	Yeni	43733	Yeni
B-12	676773777017600	Yeni	Not defined	232324233322	Yeni	32333247712342	Yeni	232324233322437271233432	Yeni	43733	Yeni
B-13	67667377777600	1185	BOV_1								
B-14	67667375777600	1118	BOV_1	232325253223	Yeni	3235232104312340	Yeni	2323252532232510431233433	Yeni	251032	Yeni
B-15	67667375777600	1118	BOV_1	232325253223	Yeni	3235232104312340	Yeni	2323252532232510431233433	Yeni	251032	Yeni
B-16	67667375777600	1118	BOV_1	232325253223	Yeni	3235232104312340	Yeni	2323252532232510431233433	Yeni	251032	Yeni
B-17	67667375777600	1118	BOV_1	232325253223	Yeni	3235232104312340	Yeni	2323252532232510431233433	Yeni	251032	Yeni
B-18	67667375777600	1118	BOV_1	232325253023	Yeni	3235032104332340	Yeni	2323252530232510433233433	Yeni	251030	Yeni
B-19	67407377777600	685	BOV	232324243222	Yeni	323422274412341	Yeni	232324243222257441233431	Yeni	25732	Yeni
B-20	67677377777600	482	BOV_1	232224233322	Yeni	322332392212342	Yeni	232224233322359221233432	Yeni	35933	Yeni
B-21											
B-22	67667375777600	1118	BOV_1	232325253223	Yeni	3235232104312340	Yeni	2323252532232510431233433	Yeni	251032	Yeni
B-23	27407377777600	Yeni	Not defined	232324253222	Yeni	323522292211342	Yeni	232324253222259221133432	Yeni	25932	Yeni
B-24	67407377777600	685	BOV								

Çizelge 3.10. Devamı. Hayvan kaynaklı izolatlarda SİTVİT2'ye göre SİT, Lineage, 12-MIT, 15-MIT, 24-MIT ve VİT kodları.

Strain	Spoligotipe43	SİT	Lineage	MIRU 12	12-MIT	MIRU 15	15-MIT	MIRU 24	24-MIT	VNTR	VİT
B-25	67407377777600	685	BOV								
B-26	676773747764600	Yeni	Not defined	232324233322	Yeni	323332392212342	Yeni	23232423332349221233432	Yeni	34933	Yeni
B-27	676773747017600	Yeni	Not defined	232324233322	Yeni	323332272712342	Yeni	23232423332237271233432	Yeni	23733	Yeni
B-28	676773747764600	Yeni	Not defined	232325253223	Yeni	3235232104312340	Yeni	23232525322232510431233433	Yeni	251032	Yeni
B-29	676673757777600	1118	BOV_1	232325253223	Yeni	3235232104312340	Yeni	23232525322232510431233433	Yeni	251032	Yeni
B-30	676673757777600	1118	BOV_1	232325253223	Yeni	3235232104312340	Yeni	23232525322232510431233433	Yeni	251032	Yeni
B-31	676673757777600	1118	BOV_1	232325253223	Yeni	3235232104312340	Yeni	23232525322232510431233433	Yeni	251032	Yeni
B-32	67407377377600	Yeni	Not defined	232324253222	Yeni	323522294211342	Yeni	232324253222259421133432	Yeni	25932	Yeni
B-33	67407377377600	Yeni	Not defined	232324263223	Yeni	323623294211342	Yeni	232324263222259421133432	Yeni	25932	Yeni
B-34	67407377377600	Yeni	Not defined	232324253222	Yeni	323522292211342	Yeni	232324253222259221133432	Yeni	25932	Yeni
B-35	67407377377600	Yeni	Not defined	232324253222	Yeni	323522292211342	Yeni	232324253222259221133432	Yeni	25932	Yeni
B-36	67407377377600	Yeni	Not defined	232324253222	Yeni	323522294211342	Yeni	232324253222259421133432	Yeni	25932	Yeni
B-37	67407377377600	Yeni	Not defined	232324253222	Yeni	323522294211342	Yeni	232324253222259421133432	Yeni	25932	Yeni
B-38	67407377377600	Yeni	Not defined	232324253222	Yeni	323522294211342	Yeni	232324253222259421133432	Yeni	25932	Yeni
B-39	67407377377600	Yeni	Not defined	232324253222	Yeni	323522292211342	Yeni	232324253222259221133432	Yeni	25932	Yeni
B-40	676673757777600	1118	BOV_1	232324253223	Yeni	3235232104312340	Yeni	23232425322232510431233432	Yeni	251032	Yeni
B-41	676673757777600	1118	BOV_1	232324253223	Yeni	3235232104312340	Yeni	23232425322232510431233433	Yeni	251032	Yeni
B-42	676773777017600	Yeni	Not defined	232324233322	Yeni	323332372712342	Yeni	23232423332337271233432	Yeni	33733	Yeni
B-43	67007377775600	Yeni	Not defined	232324253222	Yeni	323522254512342	Yeni	232324253222255451233432	Yeni	25532	Yeni
B-44	67667377777400	Yeni	Not defined	232325253223	Yeni	3235232104312340	Yeni	23232525322232510431233432	Yeni	251032	Yeni
B-45	67407377775600	Yeni	Not defined	232324253222	Yeni	323522294511342	Yeni	232324253222259451133432	Yeni	25932	Yeni
B-46	67407377777600	685	BOV	232324253222	Yeni	323522292511342	Yeni	232324253222259251133432	Yeni	25932	Yeni
B-47	200023777377600	Yeni	BOV_4-CAPRAE	232424253522	Yeni	324552464233241	Yeni	232424253522426423323421	Yeni	42635	Yeni
B-48	67407377777600	685	BOV								
B-49	67407377777600	685	BOV								
B-50	676673757777600	1118	BOV_1	232325253223	Yeni	3235232104312340	Yeni	23232525322232510431233433	Yeni	251032	Yeni
H37Rv	77777477760771	451	T-H37Rv	220026233021	Yeni	200301255522224	Yeni	22002623302123552224234	Yeni	23520	Yeni
BCG	67677377777600	482	BOV_1	212324253322	281	123532313500122	Yeni	21232425332232351350012232	Yeni	35113	Yeni

B: Bovis (Sığır) olarak kodlanmıştır.

SİT: Spoligotipe International Type

Yeni: Orphan or New

MIT: MIRU International Type

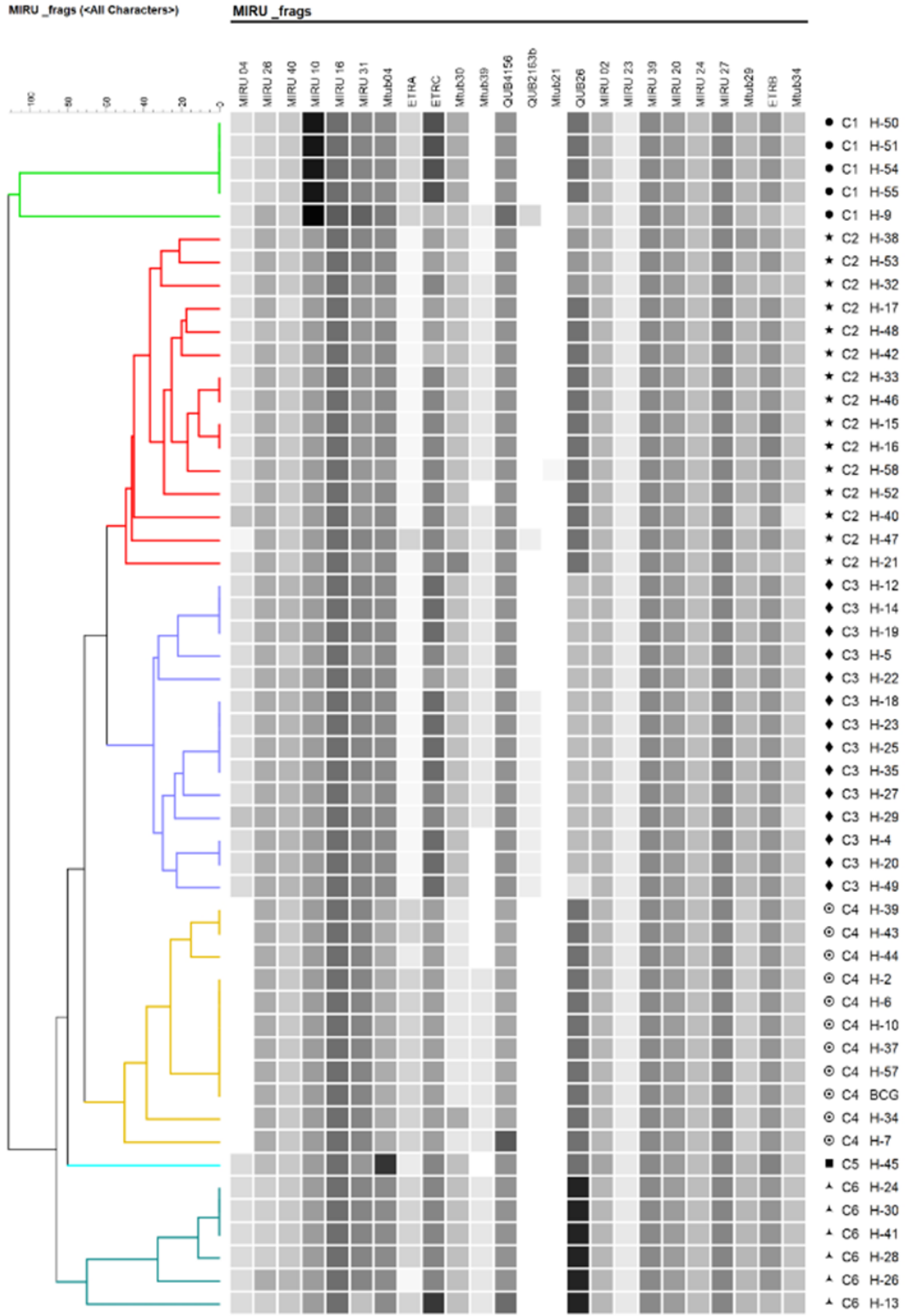
VİT: VNTR International Type

24 lokus MIRU-VNTR genotiplendirme sonucunda elde edilen kodlar BioNumerics software 7.5 (Applied Maths, East Flanders, BE) bilgisayar programı ile analiz edildi. Dendrogramlar, BioNumerics software 7.5'de (Applied Maths, East Flanders, BE) UPGMA (unweighted pair-grouping method analysis algorithm) kullanılarak oluşturuldu. İzolatlar arasındaki benzerlik katsayıları hesaplanarak köken ilişkisi belirlendi.

İnsan Kaynaklı İzolatlarda MIRU-VNTR ile Dendogram Bulguları: PCR çalışmalarında ampikon elde edilemediğinden MIRU-VNTR testi yapılamayan 7 insan kaynaklı izolat dendogram oluşturulurken değerlendirme dışı bırakıldı. 51 insan kaynaklı izolat MIRU-VNTR ile değerlendirildi. İnsan kaynaklı izolatlarda 6 farklı kümelenme görüldüğü Şekil 3.6'da gösterildi. MIRU-VNTR sonucu insan kaynaklı izolatlarda görülen kümeler ve görülme oranları Çizelge 3.11'de özetlendi. İzolatların %19,6'sı *M. bovis* BCG standart suşu ile birlikte C4 kümesinde bulunuyordu. *M. bovis* BCG standart suşu ile tamamen aynı MIRU koduna sahip olan beş izolat (H-2, H-6, H-10, H-37 ve H-57) ve C4 kümesinde yer alan diğer izolatlar *M. bovis* BCG olarak değerlendirildi. En çok izolatın yer aldığı kümeler olan C2 kümesinde izolatların %29,4'ü ve C5 kümesinde %27,5'i bulunuyordu. C6 ve C1 ise sırasıyla izolatların %11,7'si ve %9,8'ini içeriyordu. C5 tek üyeli (H-45) kümeydi. Spoligotiplendirme sonuçlarına göre *M. caprae* olarak değerlendirilen H-9, C1 kümesinde yer alan beş izolattan biriydi. MIRU-VNTR'nin spoligotiplendirmeye göre daha yüksek ayırım gücüne sahip olduğu gözlemlendi.

Çizelge 3.11. MIRU-VNTR sonucu insan kaynaklı izolatlarda görülen kümelenmeler.

Renk	Adet	Küme	Yüzde
Yeşil	5	C1	9,8
Kırmızı	15	C2	29,4
Mavi	14	C3	27,5
Sarı	10+BCG	C4	19,6
Yanık Mavi	1	C5	2
Yeşilimsi Mavi	6	C6	11,7

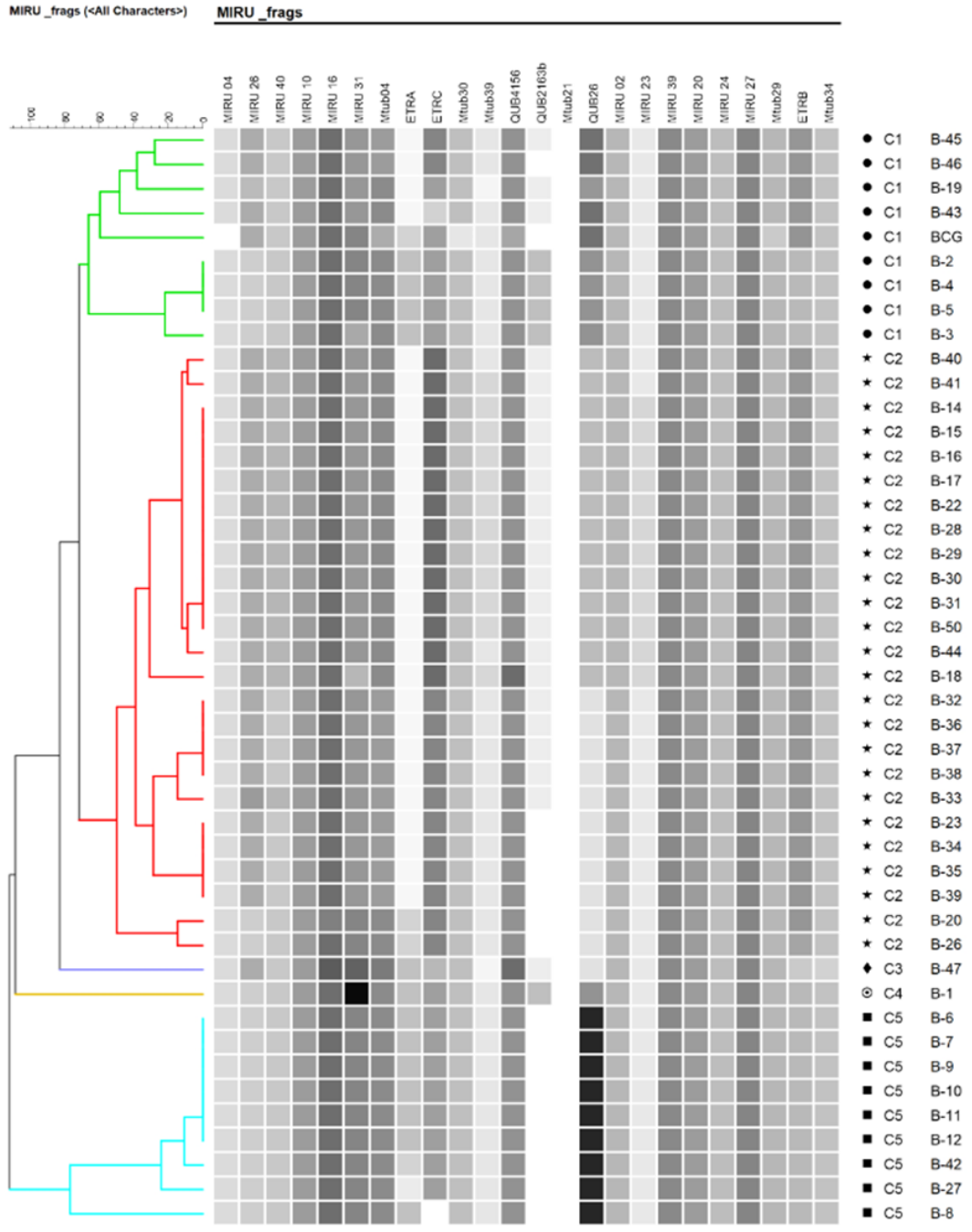


Şekil 3.6. İnsan kaynaklı izolatların birlikte 24 lokus MIRU-VNTR ile dendogramı.

Hayvan kaynaklı izolatlarda MIRU-VNTR ile dendogram bulguları: PCR çalışmalarında ampikon elde edilemediğinden MIRU-VNTR testi yapılamayan 6 hayvan kaynaklı izolat dendogram oluşturulurken değerlendirme dışı bırakıldı. 44 sığır kaynaklı izolat MIRU-VNTR ile değerlendirildi. Hayvan kaynaklı izolatlarda 5 farklı kümelenme görüldüğü Şekil 3.7’de gösterildi. MIRU-VNTR sonucu hayvan kaynaklı izolatlarda görülen kümeler ve görülme oranları Çizelge 3.12’de özetlendi. İzolatların %18,2’si *M. bovis* BCG standart suşu ile birlikte C1 kümesinde bulunuyordu. *M. bovis* BCG standart suşu ile tamamen aynı MIRU kodunda izolat gözlenmedi. En çok izolatin yer aldığı C2 kümesinde izolatların %56,8’i yer almaktaydı. İzolatların %20,4’ü C5 kümesini oluşturuyordu. C3 ve C4 tek üyeli kümelerdi. Spoligotiplendirme sonuçlarına göre *M. caprae* olarak değerlendirilen B-47, C3 kümesini oluşturuyordu. C4 kümesini oluşturan B-1 izolatinın genotipik farklılığı da MIRU-VNTR ile gözlemlendi.

Çizelge 3.12. MIRU-VNTR sonucu hayvan kaynaklı izolatlarda görülen kümelenmeler.

Renk	Adet	Küme	Yüzde
Yeşil	8+BCG	C1	18,2
Kırmızı	25	C2	56,8
Mavi	1	C3	2,3
Sarı	1	C4	2,3
Yanmavi	9	C5	20,4

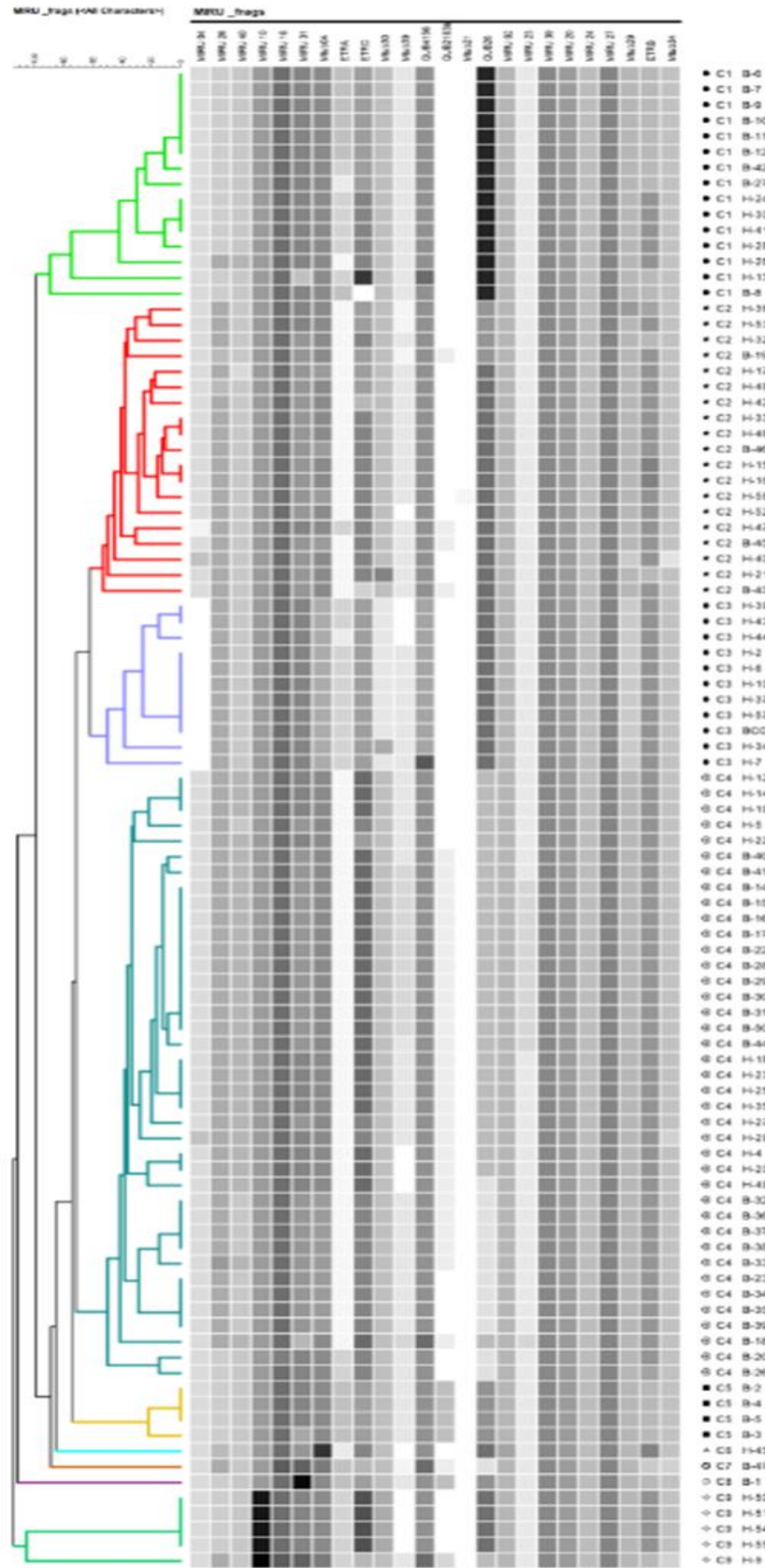


Şekil 3.7. Hayvan kaynaklı izolatların birlikte 24 lokus MIRU-VNTR ile dendogramı.

İnsan ve Hayvan Kaynaklı Suşlar Bir Arada MIRU-VNTR ile Dendogram Bulguları: PCR çalışmalarında ampikon elde edilemediğinden MIRU-VNTR testi yapılamadığından değerlendirme dışı bırakılan 6 hayvan kaynaklı, 7 insan kaynaklı izolatlar dendogram harici tutuldu. 51 insan kaynaklı ve 44 sığır kaynaklı olmak üzere 95 izolat birlikte MIRU-VNTR ile değerlendirilerek dendogram oluşturulduğunda 9 farklı kümelenme görüldüğü Şekil 3.8’de gösterildi. MIRU-VNTR sonucu görülen kümeler ve görülme oranları Çizelge 3.13’de özetlendi. İzolatların %10,53’ü *M. bovis* BCG standart suşu ile birlikte C3 kümesindeydi. C3 kümesinde insan kaynaklı 10 genotip bulunmaktadır. Hayvan kaynaklı genotip bulunmamaktadır. *M. bovis* BCG standart suşu ile tamamen aynı MIRU koduna sahip olduğu için *M. bovis* BCG olarak değerlendirilen insan kaynaklı izolatlar C3 kümesinde bulundu. Hayvan kaynaklı 9 genotip ile insan kaynaklı 6 genotip bulunan C1 kümesinde (%15,79) MIRU-VNTR kodları kendi aralarında tamamen aynı olan insan kaynaklı üç izolat (H-24, H-30, H-41) ve hayvan kaynaklı (B-6, B-7, B-9, B-10, B-11, B-12) altı izolatın aynı kümede olmaları ilgi çekicidir. C2 kümesinde (%20) hayvan kaynaklı 4 genotip ile insan kaynaklı 15 genotip görüldü. C2 kümesinde aynı MIRU-VNTR koduna sahip olan 2’şer insan kaynaklı izolat (H-33 ve H-46, H-15 ve H-16) olduğu görüldü. Hayvan kaynaklı 14 genotip ile insan kaynaklı 25 genotip bulunan C4 kümesi izolatların %41,05’ini oluşturuyordu. MIRU-VNTR kodları kendi aralarında tamamen aynı olan insan kaynaklı izolatlar ve MIRU-VNTR kodları kendi aralarında tamamen aynı olan hayvan kaynaklı izolatlar aynı küme içerisinde bulunurken, aynı genotip hem insan kaynaklı hem de hayvan kaynaklı izolatlarda gözlenmedi. C6, C7 ve C8 tek üyeli kümelerdi.

Çizelge 3.13. MIRU-VNTR sonucu insan ve hayvan kaynaklı izolatlarda görülen kümelenmeler.

Renk	Adet	Küme	Yüzde
Yeşil	15	C1	15,79
Kırmızı	19	C2	20
Mavi	10+BCG	C3	10,53
Yeşilimsi	39	C4	41,05
Sarı	4	C5	4,21
Yanık	1	C6	1,05
Kahverengi	1	C7	1,05
Purpür	1	C8	1,05
Yeşilimsi	5	C9	5,27



Şekil 3.8. İnsan ve hayvan kaynaklı izolatların birlikte MIRU-VNTR ile dendrogram.

24 lokus MIRU-VNTR ile Genotipler: Hayvan (44) ve insan (51) kaynaklı 95 izolat birlikte değerlendirilerek dendogram oluşturulduğunda 9 farklı küme ve 55 farklı genotip gözlemlendi. Beş farklı (G26-30) genotip ve 10 izolat içeren C3 kümesinde (%10,53) beş insan kaynaklı izolatta görülen G28 genotipi standart suş BCG ile birlikte tamamen aynı MIRU-VNTR koduna sahipti. G28 genotipindeki izolatlar *M. bovis* BCG (aşı suşu) olarak değerlendirildi. Aynı MIRU-VNTR kodlarına sahip olup türler arası benzer genotip olarak yorumlanan genotip yoktu. 14 adet hayvan kaynaklı izolat ile 25 adet insan kaynaklı izolattan oluşan C4 kümesi (%41,05), 18 farklı genotip ile en kalabalık küme idi. 17 farklı genotip görülen C2 kümesi (%20); 4 adet hayvan kaynaklı izolat ile 15 adet insan kaynaklı izolat ile ikinci büyük küme idi. C1 kümesinde (15,79) 6 insan kaynaklı izolat ve 9 hayvan kaynaklı izolat bulunurken, 8 farklı genotip görülmektedir. C6, C7 ve C8 sırasıyla G51, G52 ve G53 genotipleri bulunan tek üyeli kümelerdir. C5 kümesi (%4,21), 2 farklı genotipin görüldüğü dört adet hayvan kaynaklı izolat ile oluşmuştu. C9 kümesi ise (%5,27) 2 farklı genotipin gözlemlendiği beş insan kaynaklı izolat ile oluşan bir kümedir. MIRU-VNTR sonuçlarına göre tanımlanan genotipler, dahil oldukları kümeler ve konak orjinleri Çizelge 3.14'de gösterildi.

Çizelge 3.14. 24 lokus MIRU-VNTR ile saptanan genotipler.

Suş sayısı	Genotip	Cluster (Küme)	adet	% oranı
6B	G1	C1	15	15,79
1B	G2			
1B	G3			
3H	G4			
1H	G5			
1H	G6			
1H	G7			
1B	G8			
1H	G9			
1H	G10			
1H	G11	C2	19	20
1B	G12			
1H	G13			
1H	G14			
1H	G15			
2H	G16			
1B	G17			
2H	G18			
1H	G19			
1H	G20			
1H	G21			
1B	G22			
1H	G23			
1H	G24			
1B	G25			
2H	G26			
1H	G27			
BCG-5H	G28			
1H	G29			
1H	G30	C4	39	41,05
3H	G31			
1H	G32			
1H	G33			
1B	G34			
1B	G35			
10B	G36			
1B	G37			
4H	G38			
1H	G39			
1H	G40			
2H	G41			
1H	G42			
4B	G43			
1B	G44			
4B	G45			
1B	G46			
1B	G47			
1B	G48			
3B	G49	C5	4	4,21
1B	G50	C6	1	1,05
1H	G51	C7	1	1,05
1B	G52	C8	1	1,05
1B	G53	C9	5	5,27
4H	G54			
1H	G55			

3.3. Moleküler Tiplendirme Bulgularının Karşılaştırılması

İnsan Kaynaklı İzolatlarda Moleküler Tiplendirme Bulgularının Karşılaştırılması: GenotypeMTBC kiti ile *M. bovis* BCG bulunarak çalışmaya alınan üç izolatta (H-8, H-11 ve H-31) spoligotiplendirme ile sonuç alınamadı. Yedi izolatta (H-1, H-3, H-8, H-11, H-31, H-36 ve H-56) MIRU-VNTR testi ile sonuç alınamadı. Beş izolatta (H-6, H-13, H-28, H-30 ve H-47) üç test arasında uyumsuzluk vardı. Geriye kalan 46 izolatta üç test arasında alttür tanımlamasında tam uyum vardı. Üç testle değerlendirilen izolatların %90,2'sinde (46/51) birbiri ile uyumlu sonuçlar gözlemlendi.

Spoligotiplendirme ile GenotypeMTBC kiti bulguları birlikte değerlendirildiğinde, üç izolatta (H-8, H-11 ve H-31) sonuç alınamadı, dört izolatta (H-6, H-13, H-30, H-47) uyumsuzluk vardı, geriye kalan 51 izolatın (%92,7) sonuçları uyumluydu.

MIRU-VNTR ile GenotypeMTBC kiti bulguları birlikte değerlendirildiğinde, yedi izolatta (H-1, H-3, H-8, H-11, H-31, H-36 ve H-56) sonuç alınmadı, bir izolatta (H-28) uyumsuzluk vardı, geriye kalan 50 izolatın (%98) sonuçları uyumluydu.

Spoligotiplendirme ile MIRU-VNTR bulguları birlikte değerlendirildiğinde, beş izolatta (H-6, H-13, H-28, H-30 ve H-47) uyumsuzluk vardı, geriye kalan iki testinde çalışıldığı 46 izolatın (%90,2) sonuçları uyumluydu (Çizelge 3.15).

Çizelge 3.15. İnsan kaynaklı izolatlarda moleküler tiplendirme bulgularının karşılaştırılması.

Suş Kodu	GenotypeMTBC	Spoligotiplendirme	MIRU-VNTR	Uyum
H-1	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. bovis</i> BCG	Yapılamadı	GenotypeMTBC ve Spoligo uyumlu
H-2	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. bovis</i> BCG	Üç testte uyumlu
H-3	BOVIS	BOVIS	Yapılamadı	GenotypeMTBC ve Spoligo uyumlu
H-4	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-5	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-6	<i>M.bovis</i> BCG	BOVIS	<i>M.bovis</i> BCG	Uyumsuz
H-7	<i>M.bovis</i> BCG	<i>M.bovis</i> BCG	<i>M.bovis</i> BCG	Üç testte uyumlu
H-8	<i>M.bovis</i> BCG	Yapılamadı	Yapılamadı	Yapılamadı
H-9	<i>M.bovis spp. caprae</i>	<i>M.bovis spp. caprae</i>	<i>M.bovis spp. caprae</i>	Üç testte uyumlu
H-10	<i>M.bovis</i> BCG	<i>M.bovis</i> BCG	<i>M.bovis</i> BCG	Üç testte uyumlu
H-11	<i>M.bovis</i> BCG	Yapılamadı	Yapılamadı	Yapılamadı
H-12	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-13	BOVIS	<i>M.bovis</i> BCG	BOVIS	Uyumsuz
H-14	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-15	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-16	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-17	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-18	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-19	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-20	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-21	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-22	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-23	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-24	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-25	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-26	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-27	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-28	<i>M.bovis</i> BCG	<i>M.bovis</i> BCG	BOVIS	Uyumsuz
H-29	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-30	BOVIS	<i>M.bovis</i> BCG	BOVIS	Uyumsuz
H-31	<i>M.bovis</i> BCG	Yapılamadı	Yapılamadı	Yapılamadı
H-32	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-33	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-34	<i>M.bovis</i> BCG	<i>M.bovis</i> BCG	<i>M.bovis</i> BCG	Üç testte uyumlu
H-35	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-36	<i>M.bovis</i> BCG	<i>M.bovis</i> BCG	Yapılamadı	GenotypeMTBC ve Spoligo uyumlu
H-37	<i>M.bovis</i> BCG	<i>M.bovis</i> BCG	<i>M.bovis</i> BCG	Üç testte uyumlu
H-38	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-39	<i>M.bovis</i> BCG	<i>M.bovis</i> BCG	<i>M.bovis</i> BCG	Üç testte uyumlu
H-40	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-41	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-42	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-43	<i>M.bovis</i> BCG	<i>M.bovis</i> BCG	<i>M.bovis</i> BCG	Üç testte uyumlu
H-44	<i>M.bovis</i> BCG	<i>M.bovis</i> BCG	<i>M.bovis</i> BCG	Üç testte uyumlu
H-45	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-46	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-47	BOVIS	<i>M.bovis</i> BCG	BOVIS	Uyumsuz
H-48	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-49	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-50	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-51	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-52	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-53	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-54	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-55	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
H-56	<i>M.bovis</i> BCG	<i>M.bovis</i> BCG	Yapılamadı	GenotypeMTBC ve Spoligo uyumlu
H-57	<i>M.bovis</i> BCG	<i>M.bovis</i> BCG	<i>M.bovis</i> BCG	Üç testte uyumlu
H-58	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu

H: Human (İnsan) olarak kodlanmıştır.

BOVIS: *M. bovis spp. bovis*

Hayvan Kaynaklı İzolatlarda Moleküler Tiplendirme Bulgularının Karşılaştırılması: GenotypeMTBC kiti ile *M. bovis. bovis* bulunarak çalışmaya alınan bir izolatta (B-21) spoligotiplendirme ile sonuç alınmadı. Altı izolatta (B-13, B-21, B-24, B-25, B-48 ve B-49) MIRU-VNTR testi sonuç alınmadı. Bir izolatta (B-20) üç test ile uyumsuz sonuç görüldü. Geriye kalan 43 izolatta üç test arasında alttür tanımlamasında tam uyum vardı. Üç testle değerlendirilen izolatların %97,7'sinde (43/44) uyumlu sonuçlar gözlemlendi.

Spoligotiplendirme ile GenotypeMTBC kiti bulguları birlikte değerlendirildiğinde, bir izolatta (B-21) sonuç alınmadı, bir izolatta (B-20) uyumsuzluk vardı, geriye kalan 48 izolatın (%98) sonuçları uyumluydu.

MIRU-VNTR ile GenotypeMTBC kiti bulguları birlikte değerlendirildiğinde, altı izolatta (B-13, B-21, B-24, B-25, B-48 ve B-49) sonuç alınmadı, uyumsuz sonuç yoktu, çalışılan 44 izolatın (%100) sonuçları uyumluydu.

Spoligotiplendirme ile MIRU-VNTR bulguları birlikte değerlendirildiğinde, bir izolatta (B-20) uyumsuzluk vardı, geriye kalan iki testinde çalışıldığı 43 izolatın (%97,7) sonuçları uyumluydu (Çizelge 3.16).

Çizelge 3.16. Hayvan kaynaklı izolatlarda moleküler tiplendirme bulgularının karşılaştırılması.

Suş Kodu	GenotypeMTBC	Spoligotiplendirme	MIRU-VNTR	Uyum
B-1	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-2	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-3	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-4	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-5	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-6	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-7	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-8	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-9	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-10	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-11	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-12	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-13	BOVIS	BOVIS	Yapılamadı	GenotypeMTBC ve Spoligo uyumlu
B-14	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-15	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-16	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-17	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-18	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-19	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-20	BOVIS	<i>M.bovis</i> BCG	BOVIS	Uyumsuz
B-21	BOVIS	Yapılamadı	Yapılamadı	Yapılamadı
B-22	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-23	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-24	BOVIS	BOVIS	Yapılamadı	GenotypeMTBC ve Spoligo uyumlu
B-25	BOVIS	BOVIS	Yapılamadı	GenotypeMTBC ve Spoligo uyumlu
B-26	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-27	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-28	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-29	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-30	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-31	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-32	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-33	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-34	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-35	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-36	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-37	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-38	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-39	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-40	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-41	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-42	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-43	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-44	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-45	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-46	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-47	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu
B-48	BOVIS	BOVIS	Yapılamadı	GenotypeMTBC ve Spoligo uyumlu
B-49	BOVIS	BOVIS	Yapılamadı	GenotypeMTBC ve Spoligo uyumlu
B-50	BOVIS	BOVIS	BOVIS	Üç testte uyumlu

B: Bovis (Sığır) olarak kodlanmıştır.

BOVIS: *M. bovis* spp. *bovis*

4. TARTIŞMA

Mycobacterium bovis ve daha az sıklıkla *M. caprae*'nin neden olduğu Sığır Tüberkülozu, Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü'ne (OIE) göre bildirim zorunlu, bulaşıcı bir zoonozdur. Sığır TB, sığır ve küçükbaş hayvanları etkilediği gibi özellikle hayvancılıkla uğraşan insanlara bulaşabilir, bu nedenle dünya çapında Veteriner Hekimlik ve Halk sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmaktadır.

M. bovis, ülkemizde sığır TB'nin başlıca nedenidir ve insan sağlığı için de bir risk oluşturmaktadır. Bu çalışmada insanlar ve hayvanlar arasında görülen sığır TB etkenlerinin genetik benzerliğini saptamak için sığırlardan ve insanlardan mikobakterilerin izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler karakterizasyonu yapıldı.

Bu çalışmada tüberkülin pozitif 108 sığırın granülomlu AC ve lenf dokularından etken izolasyonu için yapılan çalışmalarda; EZN boyama ile %46,3 (50/108) ARB pozitifliği saptandı. EZN boyamada ARB tespit edilen örneklerden MTBC'lerin izolasyonları yapıldı ve 50 (%100) izolat elde edildi. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 58 adet insan kaynaklı izolat (16 adet *M. bovis* BCG suşu 42 adet *M. bovis* spp. *bovis*) çalışmaya katıldı.

Cinoğlu 2021 yılında Adıyaman ilinde TB şüphesi olan sığırlarda *M. bovis* varlığını araştırdığı çalışmasında EZN boyama ile %45,45 (20/44) pozitiflik saptamıştır. 44 sığır örneğinin 40 (%90,90)'unda *M. bovis* izole etmiştir. Sayın ve Erganiş 2011 yılında yayımladıkları çalışmalarında PPD-bovine ve PPD-avian testlerine ek olarak IFN- γ testi ile taranan 5 farklı çiftlikten 772 dişi sığırdan 135'inin kesimi sonucu kültürü ve mikroskopisi yapılan nekropsi örneklerinde, kültür pozitif 117 doku örneğinin, 96'sında (%82,5) kültür öncesi EZN mikroskopi ile TB basili gördüklerini, kültür negatif doku örneklerinin bakteriyoskopisinde etken gözlenmediğini bildirmişlerdir. Tuzcu ve Köksal (2020) çalışmalarında kesim sonrası granülomatöz pnömoni olduğu düşünülen 95 hayvana ait akciğer ve lenf nodüllerinden alınan doku örneklerinden 32 (%33,68)'sinde *M. bovis* izole

etmişlerdir. EZN boyamayı LJ besiyerindeki kolonilerden yapmışlar ve ARB pozitifliği görmüşlerdir. Aynı çalışmada TB'lu hastaların balgam örneklerinden izole edilen 10 adet insan kaynaklı *M. bovis* ve *M. bovis* BCG izolatu da çalışmaya dahil edilmiştir. Parreiras ve ark. (2012), 185 büyükbaş doku örneğinden elde ettikleri 61 (%32,97) izolatu tümünü konvansiyonel tanımlama işlemleri ile *M. bovis* olarak tanımlamışlardır. Yapılan çalışmalarla bu çalışmanın izolasyon bulguları uyumludur.

Bu çalışmada 108 adet izolat, spoligotiplendirme ile genotiplendirildi. Spoligotiplendirme çalışmaları sonucunda, H-11 ve H-31 tüm spacer'ları pozitif olduğu için; H-8 ve B-21 ise hiç spacer gözlenmediğinden dendogram oluşturulurken değerlendirme dışı bırakıldı. Hiç spacer görülmeyen H-8 ve B-21 izolatları, veri tabanında SB2277 olarak bildirilmektedir. Bu çalışmada spoligotiplendirilemeyen suş yoktur. İnsan kaynaklı iki suşun (H-11 ve H-31) spoligo oktal kodları ile *M. bovis* olarak değerlendirilemeyeceği görüldü. 49 adet hayvan kaynaklı ile 55 adet insan kaynaklı olmak üzere 104 izolatu spoligotiplendirme sonuçları ile dendogram yapıldığında 8 farklı kümede ve 30 farklı genotip gözlemlendi.

Oral Zeytinli ve Köksal (2010) Çukurova Bölgesindeki TB'li hastalardan elde ettikleri 467 MTBC izolatu spoligotiplendirme uyguladıklarında 443 örneğin 21 grupta kümelenmiş olduğunu ve 2 (%0,4) izolatu *M. bovis* olarak genotiplendirildiğini rapor etmişler. Yardımcı ve ark. (2007) çalışmalarında 43 farklı oligonükleotidi mikropleytlere bağlamışlar ve mikropleytlerde yaptıkları hibridizasyon sonucu 3 değişik spoligotip profili saptadıklarını bildirmişler, elde ettikleri paternleri ise ANK 1, ANK 2 ve ANK 3 olarak adlandırmışlardır. Tuzcu ve Köksal (2020) spoligotiplendirme ile izolatların 6 kümede dağıldığını ve en büyük kümeyi SB0120/SIT482 (%42,85) genotipinin oluşturduğunu bildirdikleri çalışmalarında sığır ve insan kökenli *M. bovis* izolatlarını kullanmışlardır. Parreiras ve ark. (2012), spoligotiplendirme ile, 61 izolatu 9 kümede gruplamışlar ve kalan 8 izolatu birbirinden benzersiz tipte olduğunu belirterek çalışmalarının 17 spoligotip ile sonuçlandığını bildirmişlerdir. Sahraoui ve ark. (2009), çalışmalarında spoligotiplendirme ile 22 farklı küme belirlediklerini ifade etmişlerdir. Yapılan çalışmalarla bu çalışmanın spoligotiplendirme bulguları uyumludur. Kullanılan

genotiplendirme yöntemi, izolat sayısı, izolat orijini ve kullanılan dendogram programı dendogram ile elde edilen küme ve genotip sayısını etkilemektedir.

Bu çalışmada spoligotiplendirme sonucu 12 hayvan kaynaklı, 8 insan kaynaklı toplam 20 izolatta (%19,23) görülen SIT1118/SB0989 en çok görülen genotiptir. Bir hayvan kaynaklı ve 16 insan kaynaklı izolat (%16,35) SIT482/SB0120 genotipinde saptanmıştır. Bu aynı zamanda *M. bovis* BCG standart suşunun spoligotipidir. En çok görülen genotiplerden bir diğeri 6 hayvan kaynaklı, 7 insan kaynaklı izolatta (%12,5) saptanan SIT685/SB0288'dir. Diğeri ise 13 hayvan kaynaklı izolatta (%12,5) görülen SB1593'dir ve insan kaynaklı izolatlarda saptanmamıştır. Dörder insan kaynaklı izolatta (%3,85) görülen genotipler SIT3529/SB0920 ve (%3,85) SB2466 olarak saptanmıştır. Bir insan ve bir hayvan kaynaklı izolatta (%1,92) gözlenen aynı spoligotipe sahip SIT1185/SB0897 ve (%1,92) SB0419 genotipleri de bu çalışmada hem insan hem hayvan kaynaklı suşlarda saptanan genotiplerdi. İnsan örneklerinde birer suşta görülen (%0,96) SIT3710/SB1595, (%0,96) SB1231, (%0,96) SIT688/SB0129, (%0,96) SIT3687/SB1625 ve hayvan kaynaklı örneklerde tek bir suşta (%0,96) görülen SB2510 saptanan diğer genotiplerdi. Geriye kalan 24 izolat (%23,1) yeni genotip paterni olarak tanımlandı. 10 insan kaynaklı izolatin her birinde farklı yeni bir genotip paterni gözlemlendi. 14 sığır kaynaklı izolatin 8'inde ve 2'sinde kendi içinde aynı tip yeni genotip paterni görülürken, diğer 4 izolatin her birinde birbirinden farklı yeni bir genotip paterni saptandı.

Sahraoui ve ark. (2009), çalışmalarında paternlerin %89'unun daha önce Avrupa'daki sığırlardan izole edilen paternler olduğunu bildirmiş, hayvan kaynaklı bir izolattan saptadıkları veri tabanında bulunmayan SB1451 genotipinin *M. caprae* suşuna ait spoligotip olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında en sık saptadıkları spoligotiplerin SB0120 (%40), SB0121 (%22), SB0134 (%7) ve SB0941 (%7) olduğunu yayınlamışlardır. Parreiras ve ark. (2012) 61 sığır izolatu ile yaptıkları çalışmalarında SB0295 (%29,5), SB0121 (%23), SB0274 (%9,8), SB0881 (%6,6), SB0120 (%4,9), 16 suşta 12 farklı spoligotip ve kalan sekiz suşta yeni bir genotip saptamışlardır. Belakehal ve ark. (2022) 60 sığır izolatu ile yaptıkları

spoligotiplendirme sonucuna göre, 20 suшта SB0120, 13 suшта SB0121 ve yedi suшта SB0134 tipleri ile 16 farklı spoligotip elde etmişlerdir. Melo ve ark. (2021) spoligotiplendirdikleri 17 sığır izolatını SB0121, SB0295, SB0852, SB0120 ve sınıflandırılmamış bir genotip olarak karakterize etmişlerdir. Bu çalışmalardaki spoligotipler bu çalışmada saptanan genotipler haricinde spoligotiplerdir. Coğrafik farklılıklar farklı genotiplerin görülmesinin nedeni olabilir. Çavuşoğlu ve Yılmaz (2017) Ege Bölgesinde insan TB epidemiyolojisinde *M. bovis*'i değerlendirdikleri çalışmalarında, klinik örneklerden üretilen 482 MBTC'den spoligotipleme ile tanımlanan 13 adet *M. bovis* izolatının dokuzunu (%63,6) SIT685/SB0288, bir izolatı (%7,7) SIT1118/SB0989, bir (%7,7) izolatı SIT820/SB0856 olarak tanımlamışlar ve iki tane de veri tabanlarında olmayan izolat bildirmişlerdir. Çavuşoğlu ve Yılmaz (2017)'ın çalışmasında en çok saptanan veri tabanına göre Almanya kökenli SB0989'un bu çalışmada da 12 hayvan kaynaklı, sekiz insan kaynaklı izolatta görülen en çok görülen genotip olması epidemiyolojik olarak insan ya da hayvan hareketi ve türler arası çapraz bulaş ile bu suşların Türkiye'ye taşınmış olabileceğini düşündürdü. Bu çalışmada, SIT685/SB0288) ve SIT1118/SB0989 genotipleri baskın olarak bulundu. Bu genotiplerin dünyada çok az sayıda bildirim yapılmıştır. Çavuşoğlu ve Yılmaz (2017) bu nedenle SB0288 ve SB0989 genotiplerinin Anadolu'da ortaya çıkan özgün ve baskın spoligotipler olabileceği fikrini ileri sürmüşlerdir. Prodinger ve ark. (2014) çalışmalarında 43 insan kaynaklı *M. bovis* izolatının 15 (%34,9)'inde, SIT685/SB0288 tipi en baskın spoligotip olarak bulmuşlardır. Avsever ve ark. (2017) spoligotiplendirme ile altı *M. bovis* izolatının genotiplendirmesini yapmışlar ve tüm izolatları SIT685/SB0288 olarak tanımlamışlardır. İzolatları Ege Bölgesindeki dört sığır ve iki keçiden elde etmişlerdir. Çavuşoğlu ve Yılmaz (2017)'ın çalışmasında ikinci sıklıkta görülen SIT685/SB0288 genotipi bu çalışmada altı hayvan kaynaklı, yedi insan kaynaklı izolatta (%12,5) saptanan bir genotiptir. Veri tabanında kökeni Birleşik Krallık olarak açıklanan SB0288 genotipinin de epidemiyolojik olarak insan ya da hayvan hareketi ve türler arası çapraz bulaş ile Türkiye'ye taşınmış olabileceği düşünöldü. Tuzcu ve Köksal (2020) spoligotiplendirme ile hem sığır hem de insan izolatlarının dört profil altında (SB0120, SB0140, SB0148 ve SB0288) gruplandırıldığını rapor etmişler. En yaygın spoligotipin 18 izolatta görülen (%42,85) SB0120/SIT482

olduğunu bildirmişlerdir. Onbir izolatta (%26,19) SB0140/SIT683, yedi izolatta (%16,66) SB0418/SIT647, dört izolatta (9,52) SIT685/SB0288 ve iki izolatta yeni spoligotip paterni bulduklarını bildirmişlerdir. Tuzcu ve Köksal (2020)'ın çalışmalarında 11 izolatta saptadıkları SB0140, bu çalışmada saptanmamıştır ancak dünyada insan izolatları arasında yaygın genotip olarak görülmektedir. Tuzcu ve Köksal (2020) çalışmalarında iki insan izolatını *M. bovis* BCG olarak tanımlarken sığır kaynaklı yedi izolatın ise *M. bovis ssp. caprae* olarak tanımlandığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da bir insan ve bir sığır kaynaklı izolat *M. bovis ssp. caprae* olarak tanımlandı, fakat spoligotip paterni Tuzcu ve Köksal (2020)'ın çalışmalarından farklı olarak SB0419 olan veri tabanına göre kökeni İsveç olan suşlardı. SB0418 ise aynı veri tabanına göre Belçika kökenlidir. Sayın ve Erganiş (2011) çalışmalarında MTBC PCR pozitif 106 doku örneği ve 117 kültür izolatına ait 1020 bp'lik PCR ürünlerine REA uygulayarak, RsaI enzimi ile 360 ve 480 bp büyüklüğünde, DNA bantları oluşturmuş ve izolatları öncelikle *M. bovis/M. bovis ssp. caprae* olarak tanımlamışlardır. Aynı çalışmada daha sonra SacII enzimi ile 280 ve 740 bp büyüklüğünde DNA bantları oluşturabilen 24 kültür izolatı ve 18 doku örneğinden elde edilen PCR ürünleri, *M. bovis ssp. caprae* olarak tanımlanmıştır. Sayın ve Erganiş'in çalışmaları REA ile 19 sığıra ait doku ve izolatın *M. bovis ssp. caprae* tanımlanan önemli bir çalışmadır.

M. bovis BCG aşı suşunun spoligotiplendirme profili, 3, 9, 16 ve 39 ile 43 aralayıcıların yokluğudur (Haddad ve ark., 2004). BCG kümesi ile ilişkili spoligotipler SB0120 ve SB0121 Avrupa, Afrika ve Amerika'da neredeyse dünya çapında dolaşmaktadır (Ghavidel ve ark., 2018). Bu çalışmada da SB0120 genotipinin 16'sı insan kaynaklı 17 izolatta (%16,35) saptanmış olması beklenen bir durumdur. Tuzcu ve Köksal (2020)'ın çalışmasında %42,85, Belakehal ve ark. (2022) çalışmasında %33,33, Sahraoui ve ark. (2009) çalışmasında %40 oranlarında en çok sıklıkta SB0120 genotipi bildirilmiştir.

Bu çalışmada, diğer çalışmalarda gözlenen spoligotiplerin saptanamama nedeni coğrafik dağılım olabilir. Türkiye'de yapılan çalışmalarla benzer ya da aynı spoligotipte izolatlar saptandığı görülürken farklı kıtalardaki ülkelerde tamamen

farklı profillerde spoligotiplerin bildirildiği farkedilmektedir. Bu durum epidemiyolojik olarak değerlendirme yapılırken üzerinde önemle durulması gereken bir konudur. Ülkemizde izole edilen *M. bovis* örneklerinin genotiplendirme çalışmalarının sonuçlarının uluslararası veri tabanları ile karşılaştırılarak yeni bulunan patternlerin bu veri tabanlarına bildirilmediği görülmektedir.

Bu çalışmada 95 adet izolat 24 lokus MIRU-VNTR ile genotiplendirildi. 24 lokus MIRU-VNTR çalışmaları sonucunda, insan kaynaklı örneklerde H-1, H-3, H-8, H-11, H-31, H-36 ve H-56'da; hayvan kaynaklı örneklerde B-13, B-21, B-24, B-25, B-48 ve B-49'da yapılan PCR çalışmalarında ampikon elde edilemediğinden MIRU-VNTR testi uygulanamadı ve dendrogram oluşturulurken bu izolatlar değerlendirme dışı bırakıldı. 51 insan kaynaklı ve 44 sığır kaynaklı olmak üzere 95 izolat birlikte MIRU-VNTR ile değerlendirildi. İnsan ve hayvan kaynaklı *M. bovis* izolatlarının 24 lokus MIRU-VNTR sonuçları epidemiyolojik veri elde edebilmek için beraber değerlendirilerek dendrogram oluşturulduğunda MIRU-VNTR ile, 95 izolatın 92 (%96)'sinin 6 küme oluşturduğu ve benzersiz VNTR profillerine sahip bireysel izolatların geri kalan 3 kümeyi oluşturduğu toplamda 9 küme ve 55 farklı genotip görüldü. 24 lokus MIRU-VNTR kodu tamamen aynı olan izolatlar aynı genotipte değerlendirildi. Bu çalışmada en çok görülen genotip 10 hayvan kaynaklı izolatta görülen 24 lokus MIRU-VNTR kodu (2323252532232510431233433) olan genotiptir. 24 lokus MIRU-VNTR ile gözlemlediğimiz 55 farklı genotip, MIRU-VNTR'nin spoligotiplendirmeye göre daha yüksek ayırım gücüne sahip olduğunu göstermektedir.

Parreiras ve ark. (2012) 12 lokus MIRU-VNTR tiplemesi ile 53 izolatın sekiz küme oluşturduğu ve benzersiz VNTR profillerine sahip bireysel izolatların da geri kalan sekiz kümeyi oluşturduğu çalışmalarında toplam 16 farklı genotip rapor etmişlerdir. Belakehal ve ark. (2022) 42 izolatta 19 lokus MIRU-VNTR tiplendirmesi ile, 32 farklı genotip, beş küme ve bir orphan pattern elde etmişler ve 19 lokus MIRU-VNTR'nin spoligotiplendirmeye göre daha yüksek ayırım gücü gösterdiğini rapor etmişlerdir. Melo ve ark. (2021) 24 lokus MIRU-VNTR ile her biri iki izolattan oluşan iki küme ve 13 benzersiz genotip saptadıklarını bildirmişlerdir.

Gülcü ve Hadimli (2020) TB şüpheli sığır doku ve organlarından izole ettikleri 70 adet *M. bovis* izolatının 12 lokus MIRU-VNTR ile genotiplendirilmesi sonucu; izolat sayısı değişen 29 küme gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Tuzcu ve Köksal (2020) 12 lokus MIRU-VNTR ile 10 farklı patern belirlemişlerdir. MIRU-VNTR'nin spoligotiplemeye göre daha yüksek ayırım gücü gösterdiğini bildirmişlerdir. Bolado-Martínez ve ark. (2015) Sığır Tüberkülozu lezyonlarından elde ettikleri 65 izolata yedi ve 24 lokus MIRU-VNTR yaptıkları çalışmalarında tüm izolatlar için farklı MIRU-VNTR paternleri bulmuşlardır. Yapılan çalışmalarla, bu çalışmanın MIRU-VNTR bulguları uyumludur. Kullanılan genotiplendirme yöntemi, izolat sayısı, izolat orijini ve kullanılan dendogram programı dendogram ile elde edilen küme ve genotip sayısını etkilemektedir.

24 lokus MIRU-VNTR uygulanan bu çalışmada, insan kaynaklı örneklerde ETR C, QUB2163b, QUB26, QUB4156 ve Mtub04 lokusları en çok allelik çeşitlilik gözlenen lokuslardır. ETR A, ETR B, ETR D=MIRU 04, ETR E=MIRU31, Mtub21, Mtub29, Mtub30, Mtub34, Mtub39, MIRU10, MIRU26, MIRU40 lokuslarının da kayda değer ayırım gücü gösterdiği saptandı. MIRU 2, 16, 20, 23, 24, 27 ve 39 lokuslarının ise allelik çeşitlilik göstermediği gözlemlendi.

Hayvan kaynaklı örneklerde ise ETR C, ETR E=MIRU31, QUB2163b ve QUB26 lokusları en çok allelik çeşitlilik gözlenen lokuslardı. ETR A, ETR B, QUB4156, Mtub04, Mtub21, Mtub39, MIRU 16, 23, 26 ve 40 lokuslarının da kayda değer ayırım gücü gösterdiği saptandı. MIRU 2, 10, 20, 24, 27 ve 39 lokusları ile ETR D=MIRU 04, Mtub29, Mtub30 ve Mtub34 lokuslarının ise allelik çeşitlilik göstermediği gözlemlendi.

Parreiras ve ark. (2012) 12 lokus MIRU-VNTR ile genotiplendirme yaptıkları çalışmalarında sadece MIRU 16 ve 26 lokuslarının kayda değer bir ayırım gücü gösterdiğini ve MIRU 10, 20, 23 ve 39 lokuslarının ise allelik çeşitlilik göstermediğini gözlemlemişlerdir. Belakehal ve ark. (2022) yedi lokusun; ETR A, ETR B, ETR C, QUB11b, QUB11a ve QUB 3232, MIRU 27 en çok ayırt edici lokuslar olduğunu iddia ettikleri çalışmalarında 19 lokus MIRU-VNTR ile suşların

moleküler farklılaşmasının spoligotiplendirmeye göre daha başarılı olduğunu rapor etmişlerdir. Melo ve ark. (2021) ETR-A lokusunun daha yüksek ayırım gücü gösterdiğini ve ETR-B, ETR-C, MIRU16, MIRU27 ve QUB26 lokuslarının orta derecede allelik çeşitlilik gösterdiğini bildirdikleri çalışmalarında bu çalışmada olduğu gibi 24 lokus MIRU-VNTR yöntemini kullanmışlardır. Bu çalışmada, allelik çeşitlilik göstermeyen MIRU16 ve MIRU27 lokuslarının Melo ve ark. çalışmasında allelik çeşitlilik göstermeleri coğrafik farklılıklardan kaynaklanabilir. ETR A, ETR-B, ETR-C ve QUB26 lokusları bu çalışmada da allelik çeşitliliği kayda değer lokuslar olarak değerlendirilmiştir. Gülcü ve Hadimli (2020) 12 lokus MIRU-VNTR ile MIRU 2, 4, 20, 23, 24, 27 ve 39 lokuslarındaki tekrar sayılarının suşlar arasında farklılık göstermediğini; MIRU 10, 16, 26, 31 ve 40 lokuslarındaki tekrar sayılarının ise suşlar arasında farklılık gösterdiğini ve özellikle MIRU31, MIRU26 ve MIRU10 lokuslarının yüksek ayırım gücüne sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Gülcü ve Hadimli, 12 lokus MIRU-VNTR panelinde buldukları yüksek allelik gösteren lokusların *M. bovis* izolatlarının genotiplendirmesi için belirteçler olarak kullanılmasında çalışmalara katkıda bulunabileceğini belirtmişlerdir. Tuzcu ve Köksal (2020) 12 lokus MIRU-VNTR yöntemi ile yaptıkları genotiplendirmede izolatların tamamında MIRU 2, 10, 16, 20, 23, 24, 27 ve 39 lokuslarında allelik çeşitlilik saptayamadıklarını ancak MIRU4, MIRU26, MIRU31 ve MIRU40 lokuslarının tekrar sayıları arasında farklılıklar gözlemlediklerini bildirmişlerdir. MIRU4'ün ayırt edici gücünün düşük, MIRU26, MIRU31 ve MIRU40'ın ise yüksek ayırt edici olduğunu rapor etmişlerdir. Bolado-Martínez ve ark. (2015) yedi ve 24 lokus MIRU-VNTR'nin verimliliğine baktıkları çalışmalarında QUB11a lokusunu en ayırt edici lokus olarak tanımlamışlardır. Çalışmada 24 lokusun tümü MIRU-VNTR iyi bir ayırım gücü gösterse de, en yüksek çeşitliliğe sahip lokuslar QUB3232, QUB11a, ETR A, MIRU 26, QUB 26, MIRU 16, MIRU 27, MIRU 39, MIRU 2, MIRU 31, ve QUB3336 olarak bildirilmiştir. Ara çeşitliliğe sahip lokuslar QUB23, ETR B, ETR C, QUB11b, MIRU 40, MIRU 23, QUB18, MIRU 10, MIRU 4, MIRU 24 ve QUB15 olarak tanımlanmıştır. QUB1895 ve MIRU 20 lokuslarının da düşük ayırım gücünde olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmanın bulguları Gülcü ve Hadimli'nin çalışma verileriyle büyük ölçüde uyumludur. Fakat 24 lokus MIRU-VNTR düzenindeki ETR ve QUB lokuslarının bu çalışmada bulunmaması tam bir karşılaştırma yapılmasını engellemektedir. Çalışmalarda, MIRU 02, MIRU 20, MIRU 23, MIRU 24 ve MIRU 39 lokuslarının ayırım gücünün olmaması, birçok çalışma ile uyumludur (Gülcü ve Hadimli, 2020; Parreiras ve ark., 2012; Roring ve ark., 2004 ve Tuzcu ve Köksal, 2020).

Sonuç olarak ülkemizde görülen zoonotik TB'nin insan ve hayvanlarda bulaşma yollarının ve bulaş için risk faktörlerinin belirlenmesi için insan ve hayvanlar arasında enfeksiyona neden olduğu saptanan baskın türlerin tanımlanması ve ülkemizdeki suşların birbirleri ile coğrafik ilişkisinin anlaşılabilmesi için Moleküler Epidemiyoloji çalışmalarının sayısının artırılması gerekmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, mezbahalarda kesilen ve kesim sonrası 108 sığıra ait granülamatöz doku nekropsi örneğinden konvansiyonel yöntemlerle 50 adet *M. bovis* izolatu (50 adet *M. bovis spp. bovis*) izole edildi. Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarına rutin çalışma için TB şüpheli hastalardan gönderilen çeşitli örneklerden izole edilen insan kaynaklı 58 adet *M. bovis* izolatu (17 adet *M. bovis* BCG ve 41 adet *M. bovis spp. bovis*) çalışmaya dahil edildi. Tüm izolatların spoligotiplendirme ve 24 lokus MIRU-VNTR yöntemi ile genotipleri saptandıktan sonra Moleküler Epidemiyolojik özellikleri değerlendirmeye alındı.

Değerlendirme sonucunda;

- Bu çalışmada *M. bovis subsp. caprea*'nın bir sığırdaki ve bir insanda (%1,92) bulunmuş olması Sığır tüberkülozuna karşı korunma ve kontrol programları tasarlanırken *M. bovis subsp. caprea* epidemiyolojisinde değerlendirilmesi gerekliliğini gösterdi.
- Spoligotiplendirme ile izolatların %96,30'u dendrogram ile değerlendirildi. İki insan kaynaklı izolat tüm aralayıcıları pozitif olduğu için (%1,92) *M. bovis* olarak tiplendirilemedi. Spoligotiplendirmede hiç aralayıcı görülmeyen bir hayvan ve bir insan kaynaklı iki izolat da (%1,92) dendrogram oluşturulurken değerlendirmeye alınmadı. Ancak hiç spacer'ı olmayan bu iki izolat veri tabanında SB2277 olarak tanımlanmaktaydı.
- Spoligotiplendirme sonucu izolatların %19,23'ünde, hayvan ve insan kaynaklı görülen SIT1118/SB0989 genotipi en çok görülen baskın genotipti.
- Elde edilen genotipler içerisinde insan ve hayvan izolatlarında saptanan, SIT482/SB0120 paternini gösteren *M. bovis* aşısı suşu genotipi %16,35 oranında gözlemlendi.
- En çok görülen genotiplerden bir diğeri izolatların %12,5'inde hayvan ve insan kaynaklı izolatlarda saptanan SIT685/SB0288'di.
- Sadece hayvan kaynaklı izolatlarda (%12,5) görülen SB1593 ise insan kaynaklı izolatlarda saptanmadı.

- SIT3529/SB0920 ve SB2466 %3,85 oranlarında dörder insan kaynaklı izolatta saptanmıştır ve hayvan kaynaklı izolatlarda görülmedi.
- SIT1185/SB0897 de SB0419 gibi bir sığırdan ve bir insandan %1,92 oranında görülen izolatlardan biridir.
- İnsan örneklerinde birer suşta görülen SIT3710/SB1595, SB1231, SIT688/SB0129, SIT3687/SB1625 ve hayvan kaynaklı örneklerde tek bir suşta görülen SB2510, bu çalışmada saptanan diğer spoligotiplerdi. Geriye kalan 24 izolat (%23,1) yeni genotip paterni olarak tanımlandı. 10 insan kaynaklı izolatin her birinde farklı yeni bir genotip paterni gözlemlendi. 14 sığır kaynaklı izolatin 8'inde ve 2'sinde kendi içinde aynı tip yeni genotip paterni görülürken, diğer 4 izolatin her birinde birbirinden farklı yeni bir genotip paterni saptandı.
- 24 lokus MIRU-VNTR tiplendirmesinin spoligotiplendirme yöntemine göre daha yüksek ayırt etme kapasitesinde olduğu, bu nedenle daha fazla çeşitte genotipi daha fazla sayıda küme olarak gösterebildiği anlaşıldı.
- MIRU-VNTR tiplendirme ile spoligotiplendirme karşılaştırıldığında spoligotiplendirmenin, uygulaması daha zahmetsiz, yinelenebilir bir yöntem olduğu görüldü. MIRU-VNTR ile spoligotiplendirme yöntemleri beraber uygulanıp değerlendirildiklerinde ise epidemiyolojik olarak daha ayrıntılı değerlendirmelerinin yapılmasına imkân sağlayacağı düşünüldü.
- Sığır TB'a karşı korunma ve kontrol programları hazırlanırken uygulanan programların etkinliğini ölçmek için 24 lokus MIRU-VNTR ve spoligotiplendirme yöntemlerinin de yararlı olacağı düşünüldü. İleri Moleküler Tiplendirme için Tüm Genom Dizileme yöntemi de kullanılabilir.
- Ülkemizde hem insanlar hem de hayvanlar için hala ciddi bir yük oluşturan sığır TB; bir zoonoz olması, prevalansının bilinenden yüksek olması sebebi ile insan TB'u ile birlikte mücadele edilmesi gereken bir hastalıktır.
- Sığır TB; ulusal hayvancılıkta büyük ekonomik kayıplara neden olarak ülke çapında hayvan üretim oranlarını da negatif yönde etkilemektedir.

- Tek sağlık uygulamalarına sığır TB'ununda dahil edilerek eradikasyon çalışmalarının Tıp ve Veteriner Hekimlik alanlarında beraber işbirliği ile planlanması gereklidir.
- İnsan ve Sığır TB vakalarında *M. bovis* izolasyonunun birlikte değerlendirilmesi gerekliliği dūřunıldı.



ÖZET

İnsan ve Hayvan Kaynaklı *Mycobacterium bovis* Suşlarının Spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR Yöntemleri ile Epidemiyolojik Analizinin Yapılması

Zoonotik tüberküloz, çoğunlukla *M. bovis*'in neden olduğu bir TB şeklidir. Sığır tüberkülozu etkeni *M. bovis*'in başta sığırlar olmak üzere diğer evcil hayvanlarda ve vahşi yaşamdaki varlığı; insanlara bulaşması ile insanlarda da hastalık oluşturması olasılığını artırmaktadır. Pastörize edilmemiş süt tüketimi, *M. bovis*'in en önemli bulaş kaynağıdır. Hasta hayvanlardan çıkan enfeksiyöz aerosollerin inhalasyonu veya hasta hayvanlar ile direk temas ile bulaş gözlenmektedir. Hasta olan sığırlar tüm vücut sıvıları ile etkeni bulaştırabilirler. Az pişmiş et ürünlerini tüketen bireylerin yanı sıra enfekte sığırlarla yakın etkileşime giren kişilerde de zoonotik TB'ye yakalanma riski daha yüksektir. İnsandan insana bulaş, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış kişiler arasında bildirilmiştir ve çok nadirdir. Sığırlara TB enfeksiyonunun bulaşmasında insanlar da *M. bovis* kaynağı olarak davranabilir. Ülkemizde insan ve hayvanlardan *M. bovis*'in moleküler genotiplendirilmesine ilişkin çok az bilgi edinilmektedir. Bu çalışmada; toplam 108 *M. bovis* izolatu (50 hayvan, 58 insan) spoligotiplendirme ve 24 lokus MIRU-VNTR yöntemi ile analiz edildi. Spoligotiplendirme çalışmaları sonucunda, iki insan kaynaklı izolat tüm spacer'ları pozitif olduğu için; birer insan ve hayvan kaynaklı izolatta hiç spacer gözlenmediğinden dendogram oluşturulurken değerlendirme dışı bırakıldı. Sığır kaynaklı 49 izolat ile insan kaynaklı 55 izolat olmak üzere 104 izolat birlikte değerlendirildiğinde 8 farklı küme ve 30 farklı genotip gözlemlendi. Spoligotiplendirme ile hayvan ve insan kaynaklı izolatlarda görülen SIT1118/SB0989 (%19,23) en çok görülen genotipti. Elde edilen genotipler içerisinde insan ve hayvan izolatlarda, SIT482/SB0120 paternini gösteren *M. bovis* aşısı suşu genotipi %16,35 oranında gözlemlendi. SIT685/SB0288 (%12,5) genotipi, hayvan ve insan kaynaklı izolatlarda saptanan bir diğer genotipti. Sadece hayvan kaynaklı izolatlarda (%12,5) görülen SB1593 ise insan kaynaklı izolatlarda saptanmadı. SIT3529/SB0920, SB2466, SIT1185/SB0897, SB0419, SIT3710/SB1595, SB1231, SIT688/SB0129, SIT3687/SB1625 ve SB2510 bu çalışmada gözlenen diğer genotiplerdi. 24 lokus MIRU-VNTR çalışmaları için yedi insan kaynaklı ve altı hayvan kaynaklı izolatta PCR çalışmalarında amplikon elde edilemedi ve MIRU-VNTR testi yapılamadı. Amplikon elde edilmeyen izolatlarda dendogram oluşturulurken değerlendirme dışı bırakıldı. İnsan kaynaklı 51 izolat ve sığır kaynaklı 44 izolat olmak üzere 95 izolat birlikte 24 lokus MIRU-VNTR ile genotiplendirildi ve 9 farklı küme ve 55 farklı genotip gözlemlendi. 24 lokus MIRU-VNTR'nin spoligotiplendirmeye göre ayırım gücünün daha yüksek olduğu görüldü. Bu çalışmada izolatlarda genotipik dağılımları incelendiğinde ülkemizde insan ve hayvan izolatlarda benzer genotipler olduğu tespit edildi.

Anahtar Sözcükler: Epidemiyoloji, Genotiplendirme, MIRU-VNTR, *Mycobacterium bovis*, Spoligotiplendirme.

SUMMARY

Epidemiological Analysis of Human and Animal Originated *Mycobacterium bovis* Strains by Spoligotyping and MIRU-VNTR Methods

Zoonotic tuberculosis is a form of TB mostly caused by *M. bovis*. The presence of *M. bovis*, the causative agent of bovine tuberculosis, in cattle, other domestic animals and wildlife; transmission to humans increases the likelihood of disease in humans. Consumption of unpasteurized milk is the most important source of transmission of *M. bovis*. Transmission is observed by inhalation of infectious aerosols from sick animals or by direct contact with sick animals. Sick cattle can transmit the agent with all body fluids. Individuals who consume undercooked meat products, as well as those who have close contact with infected cattle, are also at higher risk of contracting zoonotic TB. Human-to-human transmission has been reported, particularly among immunocompromised individuals, and is very rare. Humans may also act as a source of *M. bovis* in the transmission of TB infection to cattle. In our country, very little information is available on the molecular genotyping of *M. bovis* from humans and animals. In this study; A total of 108 *M. bovis* isolates (50 animals, 58 humans) were analyzed by spoligotyping and 24 loci by MIRU-VNTR method. As a result of spoligotyping studies, since all spacers of two human isolates were positive; Since no spacers were observed in each isolate of human and animal origin, it was excluded from the evaluation when creating the dendrogram. When 104 isolates, 49 isolates of bovine origin and 55 isolates of human origin, were evaluated together, 8 different clusters and 30 different genotypes were observed. SIT1118/SB0989 (19.23%) seen in isolates of animal and human origin by spoligotyping was the most common genotype. Among the obtained genotypes, the *M. bovis* vaccine strain genotype showing the SIT482/SB0120 pattern was observed at a rate of 16.35% in human and animal isolates. SIT685/SB0288 (12.5%) genotype was another genotype detected in isolates of animal and human origin. SB1593, which was seen only in isolates of animal origin (12.5%), was not detected in isolates of human origin. SIT3529/SB0920, SB2466, SIT1185/SB0897, SB0419, SIT3710/SB1595, SB1231, SIT688/SB0129, SIT3687/SB1625 and SB2510 were other genotypes observed in this study. For the 24 locus MIRU-VNTR studies, seven human and six animal origin isolates could not obtain amplicons from PCR studies and the MIRU-VNTR test could not be performed. Isolates from which amplicon was not obtained were excluded when constructing the dendrogram. 95 isolates, 51 isolates from human and 44 from cattle, were genotyped together with 24 loci MIRU-VNTR, and 9 different clusters and 55 different genotypes were observed. It was observed that 24 loci MIRU-VNTR had higher discriminatory power than cypoligotyping. In this study, when the genotypic distribution of the isolates was examined, it was determined that there was similar genotypes between human and animal isolates in our country.

Keywords: Epidemiology, Genotyping, MIRU-VNTR, *Mycobacterium bovis*, Spoligotyping.

KAYNAKLAR

- AKAY Ö (1984). Bir minkte saptanan tüberkulozis olgusal üzerinde araştırma. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **31**(03): 463-470. DOI: 10.1501/Vetfak_0000000207.
- AKDEŞİR E, ÖZYİĞİT MÖ, KAHRAMAN MM (2018). Sığırlarda *Mycobacterium bovis*'in moleküler ve sito-histopatolojik tanı yöntemleri ile gösterilmesi ve sonuçlarının karşılaştırılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **66**(1): 27-35.
- ALEXANDER KA, LAVER PN, MICHEL AL, WILLIAMS M, VAN HELDEN PD, WARREN RM, VAN PITTIUS NCG (2010). Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerging infectious diseases*, **16**(8): 1296.
- ARANAZ A, LIÉBANA E, GÓMEZ-MAMPASO E, GALÁN JC, COUSINS D, ORTEGA A, BLÁZQUEZ J, BAQUERO F, MATEOS A, SÚAREZ G, DOMINGUEZ L (1999). *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **49**(3): 1263-1273. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-3-1263>.
- ASLAN G, KUYUCU N, ÇALIKOĞLU M, ERSÖZ G, ÜLGER M, GÜNAL S, EMEKDAŞ G (2009). *Mycobacterium bovis*'in etken olduğu tüberküloz olguları. *ANKEM Dergisi*, **23**(4): 182-187.
- ASTARIE-DEQUEKER C, NIGOU J, PASSEMAR C, GUILHOT C (2010). The role of mycobacterial lipids in host pathogenesis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, **7**(1): e33-e41.
- AVSEVER ML, ÇAVUŞOĞLU C, YAZICIOĞLU Ö, ESKİİZMİRLİLER S, ERDAL G, GÜNEN MZ, TUNALIGİL S, ALPARSLAN B, AKSOY A (2017). New spoligotyping pattern of *Mycobacterium bovis* isolates from farm animals in Turkey. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **64**(1): 37-43. DOI: 10.1501/Vetfak_0000002771.
- AYELE WL, NEILL SD, ZINSSTAG J, WEISS MG, PAVLIK I (2004). Bovine tuberculosis: An old disease but a new threat to Africa. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, **8**(8): 924-937.
- AYTEKİN İ, KALKAN Y, MAMAK N, ÖZKAN A (2010). *Mycobacterium bovis* ile enfekte bir inekte saptanan granulomatöz lezyonlar. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, **4**(2): 117-122. Retrieved from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/ataunivbd/issue/2907/40209>.
- BABADY NE, WENGENACK NL (2012). Clinical Laboratory Diagnostics for *Mycobacterium tuberculosis*. In (Ed.), *Understanding Tuberculosis-Global Experiences and Innovative Approaches to the Diagnosis*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/30972>.

- BARIŞ İY (2003). Çağlar Boyu Tüberküloz. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım, Samsun; 1-7.
- BARNES PF (2006). Weighing gold or counting spots: which is more sensitive to diagnose latent tuberculosis infection? *American journal of respiratory and critical care medicine*, **174**(7): 731–732. <https://doi.org/10.1164/rccm.200607-907ED>.
- BARRY CE, 3rd (2001). Interpreting cell wall 'virulence factors' of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in microbiology*, **9**(5): 237–241. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(01\)02018-2](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(01)02018-2).
- BELAKEHAL F, BARTH SA, MENGE C, MOSSADAK HT, MALEK N, MOSER I (2022). Evaluation of the discriminatory power of spoligotyping and 19-locus mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number of tandem repeat analysis (MIRU-VNTR) of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle in Algeria. *PLoS one*, **17**(1): e0262390. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262390>.
- BELISLE JT, BRENNAN PJ (1989). Chemical basis of rough and smooth variation in mycobacteria. *Journal of bacteriology*, **171**(6): 3465–3470. <https://doi.org/10.1128/jb.171.6.3465-3470.1989>.
- BİLGEHAN H (1999). Aşırı duyarlılık tepkimeleri. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. 9. Baskı, İzmir: Barış Yayınları; s.:492-531.
- BOLADO-MARTINEZ E, BENAVIDES-DÁVILA I, CANDIA-PLATA M, NAVARRO-NAVARRO M, AVILÉS-ACOSTA M, ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ G (2015). Proposal of a screening MIRU-VNTR panel for the preliminary genotyping of *Mycobacterium bovis* in Mexico. *BioMed research international*, 2015, 416479. <https://doi.org/10.1155/2015/416479>.
- BONARD D, MSELLATI P, RIGOUTS L, COMBE P, COULIBALY D, COULIBALY IM, PORTAELS F (2000). What is the meaning of repeated isolation of *Mycobacterium africanum*? *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, **4**(12): 1176-1180.
- BONIOTTI MB, GORIA M, LODA D, GARRONE A, BENEDETTO A, MONDO A, TISATO E, ZANONI M, ZOPPI S, DONDO A, TAGLIABUE S, BONORA S, ZANARDI G, PACCIARINI ML (2009). 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*, **47**(3): 636-644. <https://doi.org/10.1128/JCM.01192-08>.
- BORRELL S, GAGNEUX S (2009). Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, **13**(12): 1456–1466.
- BROSCH R, GORDON SV, MARMIESSE M, BRODIN P, BUCHRIESER C, EIGLMEIER K, GARNIER T, GUTIERREZ C, HEWINSON G, KREMER K, PARSONS L M, PYM AS, SAMPER S, VAN SOOLINGEN D, COLE ST (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the national academy of Sciences*, **99**(6): 3684-3689. <https://doi.org/10.1073/pnas.052548299>.

- BRUDEY K, DRISCOLL JR, RIGOUTS L, PRODINGER WM, GORI A, AL-HAJAJ SA, ALLIX C, ARISTIMUÑO L, ARORA J, BAUMANIS V, BINDER L, CAFRONE P, CATALDI A, CHEONG S, DIEL R, ELLERMEIER C, EVANS JT, FAUVILLE-DUFAUX M, FERDINAND S, GARCIA DE VIEDMA D, GARZELLI C, GAZZOLA L, GOMES HM, GUTTIEREZ MC, HAWKEY PM, VAN HELDEN PD, KADIVAL GV, KREISWIRTH BN, KREMER K, KUBIN M, KULKARNI SP, LIENS B, LILLEBAEK T, HO ML, MARTÍN C, MARTÍN C, MOKROUSOV I, NARVSKAĀ O, NGEOW YF, NAUMANN L, NIEMANN S, PARWATĪ I, RAHĪM Z, RASOLOFO-RAZANAMPARANY V, RASOLONAVALONA T, ROSSETTĪ ML, RÜSCH-GERDES S, SAJDUDA A, SAMPER S, SHEMYAKĪN IG, SĪNGH UB, SOMOSKOVĪ A, SKUCE RA, VAN SOOLĪNGEN D, STREĪCHER EM, SUFFYS PN, TORTOLĪ E, TRACEVSKA T, VĪNCENT V, VĪCTOR TC, WARREN RM, YAP SF, ZAMAN K, PORTAELS F, RASTOGĪ N, SOLA C (2006). *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC microbiology*, **6**(1): 23. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-23>.
- BURGOS MV, PYM AS (2002). Molecular epidemiology of tuberculosis. *The European respiratory journal*. (Supplement **36**): 54–65. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00400702>.
- CADMUS S, AKINSEYE VO, VAN SOOLINGEN D (2019). *Mycobacterium bovis* in humans and *M. tuberculosis* in animals in Nigeria: an overview from 1975-2014. *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, **23**(11): 1162–1170. <https://doi.org/10.5588/ijtld.18.0641>.
- CEYHAN İ (2003). Değişik kaynaklardan izole edilen *Mycobacterium bovis* suşlarının moleküler tiplendirmesi. Doktora Tezi.
- CHAMBERS M, GORDON S, OLEA-PEPELKA F, BARROW P (2018). Bovine tuberculosis. Wallingford Oxfordshire UK, Boston MA USA: CABI.
- CİNOĞLU H (2021). Adıyaman ilinde tüberküloz şüphesi olan sığırlarda *Mycobacterium bovis* varlığının araştırılması ve epidemiyolojik tiplendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi.
- CLARK VL, KRUSE JA (1990). Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. *JAMA*, **264**: 2808-2809.
- CLARKE C, VAN HELDEN P, MILLER M, PARSONS S (2016). Animal-adapted members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex endemic to the southern African subregion. *Journal of the South African Veterinary Association*, **87**(1): 1-7.
- COLL F, MALLARD K, PRESTON MD, BENTLEY S, PARKHILL J, MCNERNEY R, MARTIN N, CLARK TG (2012). SpolPred: rapid and accurate prediction of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes from short genomic sequences. *Bioinformatics* (Oxford, England), **28**(22): 2991–2993. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts544>.
- COLLINS DM (2011). Advances in molecular diagnostics for *Mycobacterium bovis*. *Veterinary microbiology*, **151**(1-2): 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.019>.

- COROS A, DECONNO E, DERBYSHIRE KM (2008). IS6110, a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific insertion sequence, is also present in the genome of *Mycobacterium smegmatis*, suggestive of lateral gene transfer among mycobacterial species. *Journal of bacteriology*, **190**(9): 3408-3410.
- COSIVI O, GRANGE JM, DABORN C J, RAVIGLIONE MC, FUJIKURA T, COUSINS D, ROBINSON RA, HUCHZERMAYER HF, DE KANTOR I, MESLIN FX (1998). Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging infectious diseases*, **4**(1): 59–70. <https://doi.org/10.3201/eid0401.980108>.
- COSTA P, BOTELHO A, COUTO I, VIVEIROS M, INÁCIO J (2014). Standing of nucleic acid testing strategies in veterinary diagnosis laboratories to uncover *Mycobacterium tuberculosis* complex members. *Frontiers in molecular biosciences*, **1**: 16. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00016>.
- COUSINS DV, WILLIAMS SN, REUTER R, FORSHAW D, CHADWICK B, COUGHRAN D, GALES N (1993). Tuberculosis in wild seals and characterisation of the seal bacillus. *Australian Veterinary Journal*, **70**(3): 92-97. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1993.tb03284.x>.
- COUSINS DV, BASTIDA R, CATALDI A, QUSE V, REDROBE S, DOW S, DUIGNAN P, MURRAY A, DUPONT C, AHMED N, COLLINS DM, BUTLER WR, DAWSON D, RODRIGUEZ D, LOUREIRO J, ROMANO MI, ALITO A, ZUMARRAGA M, BERNARDELLI A (2003). Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **53**(Pt5): 1305–1314. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02401-0>.
- COUVIN D, DAVID A, ZOZIO T, RASTOGI N (2019). Macro-geographical specificities of the prevailing tuberculosis epidemic as seen through SITVIT2, an updated version of the *Mycobacterium tuberculosis* genotyping database. *Infect Genet Evol.*, **72**: 31-43. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.12.030>.
- ÇAVUŞOĞLU C, YILMAZ FF (2017). Ege Bölgesi'nde insan *Mycobacterium bovis* enfeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, **51**(2): 165-170. doi: 10.5578/ mb.53963
- DEDIEU L, SERVEAU-AVESQUE C, KREMER L, CANAAN S (2013). Mycobacterial lipolytic enzymes: a gold mine for tuberculosis research. *Biochimie*, **95**(1): 66-73.
- DE JONGE MI, PEHAU-ARNAUDET G, FRETZ MM, ROMAIN F, BOTTAI D, BRODIN P, HONORÉ N, MARCHAL G, JISKOOT W, ENGLAND P, COLE ST, BROSCHE R (2007). ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. *Journal of bacteriology*, **189**(16): 6028-6034. <https://doi.org/10.1128/JB.00469-07>.
- DERRICK SC, MORRIS SL (2007). The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cellular microbiology*, **9**(6): 1547-1555.
- DIBABA AB, KRIEK NPJ, THOEN CO (2019). Tuberculosis in Animals: An African Perspective. Cham: Springer.

- DİKER S (1998). Aşırı duyarlılık reaksiyonları. İmmunoloji. 1. Baskı. Ankara, Medisan Yayınevi; s.:237-253.
- DIPPENAAR A, PARSONS SDC, SAMPSON SL, VAN DER MERWE RG, DREWE JA, ABDALLAH AM, SİAME KK, GEY VAN PITTIUS NC, VAN HELDEN PD, PAIN A, WARREN RM (2015). Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium suricattae*. *Tuberculosis*, **95**(6): 682-688.
- DRISCOLL JR, MCGARRY MA, TABER HW (1999). DNA typing of a nonviable culture of *Mycobacterium tuberculosis* in a homeless shelter outbreak. *Journal of clinical microbiology*, **37**(1): 274–275. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.1.274-275.1999>.
- DUARTE TA, BARBOSA JR AA, ARRUDA S (2005). 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.*, **23**(4): 317-322.
- DUBANIEWICZ A (2010). *Mycobacterium tuberculosis* heat shock proteins and autoimmunity in sarcoidosis. *Autoimmunity reviews*, **9**(6): 419-424.
- DURUPINAR B (1996) Mikobakteriler ve Çevre Koşullarına Dayanıklılıkları, *O.M.Ü. Tıp Dergisi*, **13**(4): 297-304.
- EI PW, AUNG WW, LEE JS, CHOI GE, CHANG CL (2016). Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis*: A review of frequently used methods. *Journal of Korean medical science*, **31**(11): 1673-1683. <https://doi.org/10.3346/jkms.2016.31.11.1673>.
- ERKAN L (1996). Tüberkülozun Tarihiçesi, Ülkemiz ve Dünyadaki Durumu. *O.M.Ü. Tıp Dergisi*, **13**(4): 291-294.
- ERLER W, MARTIN G, SACHSE K, NAUMANN L, KAHLAU D, BEER J, BARTOS M, NAGY G, CVETNIC Z, ZOLNIR-DOVC M, PAVLIK I (2004). Molecular fingerprinting of *Mycobacterium bovis subsp. caprae* isolates from Central Europe. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**(5): 2234-2238. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2234-2238.2004>.
- ESEN N (2005). Tüberkülozda Mikobakteriyel Persistans Mekanizmaları. 4.Tüberküloz Sempozyumu Kitabı, Malatya, s.:58-64.
- FIEWEGER RA, WILBURN KM, VANDERVEN BC (2019). Comparing the metabolic capabilities of bacteria in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microorganisms*, **7**(6): 177.
- FLORES L, JARLSBERG LG, KIM E., OSMOND D, GRINSDALE J, KAWAMURA M, DESMOND E, HOPEWELL PC, KATO-MAEDA M (2010). Comparison of restriction fragment length polymorphism with the polymorphic guanine-cytosine-rich sequence and spoligotyping for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with five or fewer copies of IS6110. *Journal of clinical microbiology*, **48**(2): 575–578. <https://doi.org/10.1128/JCM.01604-09>.
- GAGNEUX S (2012). Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, *Biological sciences*, **367**(1590): 850-859. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0316>.

- 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 (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**(13): 7877–7882. <https://doi.org/10.1073/pnas.1130426100>.
- GHAVIDEL M, MANSURY D, NOURIAN K, GHAZVINI K (2018). The most common spoligotype of *Mycobacterium bovis* isolated in the world and the recommended loci for VNTR typing; A systematic review. *Microb Pathog.*, **118**: 310-315. Epub 2018/03/27. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.036> PMID: 29578066.
- GENÇ KUZUCA İ (2016). Tüberküloz hastasında doğrudan gözetimli tedavi (DGT) uygulamasında karşılaşılan etik ikilemler. *Türkiye Biyoetik Dergisi*, **3**(3): 165-172.
- GEDIKOĞLU S (1997). *Mycobacterium tuberculosis*'in hücre yapısı. Tümbay E (Ed), 1, 13-18.
- GONZALO-ASENSIO J, MARINOVA D, MARTIN C, AGUILO N (2017). MTBVAC: Attenuating the Human Pathogen of Tuberculosis (TB) Toward a Promising Vaccine against the TB Epidemic. *Frontiers in immunology*, **8**, 1803. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01803>.
- GORDON SV, EIGLMEIER K, GARNIER T, BROSCHE R, PARKHILL J, BARRELL B, COLE ST, HEWINSON RG (2001). Genomics of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis* (Edinburgh, Scotland), **81**(1-2): 157–163. <https://doi.org/10.1054/tube.2000.0269>.
- GÖKALP G ve GÖKALP AB (2020). Kedilerin Tüberkülozisine Güncel Yaklaşım. *Bozok Veterinary Sciences*, **1**(1-2): 66-73.
- GROENEN PM, BUNSCHOTEN AE, VAN SOOLINGEN D, VAN EMBDEN JD (1993). Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Molecular microbiology*, **10**(5): 1057–1065. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00976.x>.
- GROENHEIT R (2011). Molecular epidemiology of tuberculosis. Karolinska Institutet (Sweden).
- GUTIERREZ M, SAMPER S, GAVIGAN JA, MARIN JFG, MARTIN C (1995). Differentiation by molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains causing tuberculosis in cattle and goats. *J Clin Microbiol*, **33**: 2953-2956.
- GÜLCÜ Y, HADIMLI HH (2020). Typing of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle using MIRU-VNTR analysis. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, **31**(2): 133-139.
- HADDAD N, MASSELOT M, DURAND B (2004). Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. *Res Vet Sci.*; **76**(1): 1-18. Epub 2003/12/09. [https://doi.org/10.1016/s0034-5288\(03\)00078-x](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(03)00078-x).
- HALL GS, HOWARD BJ (1994). *Mycobacteria. Clinical and Pathogenic Microbiology*. St. Louis, MO: Mosby-Year Book Inc, s.:503-528.

- HARBOE M, OETTINGER T, WIKER HG, ROSENKRANDS I, ANDERSEN P (1996). Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection and immunity*, **64**(1): 16–22. <https://doi.org/10.1128/iai.64.1.16-22.1996>.
- HAYVAN SAĞLIĞI ve ZABITASI KANUNU (1986). Tarım Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Kanun Numarası: 3285 Yayınlandığı R. Gazete: 16.05.1986-19109.
- HEALTH, WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL (Hg.) (2012): Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2012: OIE Terrestrial manual 2012. Paris: OIE.
- HEWINSON RG, MICHELL SL, RUSSELL WP, MCADAM RA, JACOBS JR WR (1996). Molecular characterization of MPT83: a seroreactive antigen of *Mycobacterium tuberculosis* with homology to MPT70. *Scandinavian journal of immunology*, **43**(5): 490–499. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1996.d01-78.x>.
- HINGLEY-WILSON SM, SAMBANDAMURTHY VK, JACOBS JR WR (2003). Survival perspectives from the world's most successful pathogen, *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature immunology*, **4**(10): 949.
- HUANG ZHENG YX, DE BOER WF, VAN LANGEVELDE F, XU C, BEN JEBARA K, BERLINGIERI F, PRINS HHT (2013). Dilution effect in bovine tuberculosis: risk factors for regional disease occurrence in Africa. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **280**: 20130624. <http://doi.org/10.1098/rspb.2013.0624>.
- JANG J, BECQ J, GICQUEL B, DESCHAVANNE P, NEYROLLES O (2008). Horizontally acquired genomic islands in the tubercle bacilli. *Trends in microbiology*, **16**(7): 303-308.
- KAMBASHI B, MBULO G, MCNERNEY R, TEMBWE R, KAMBASHI A, TIHON V, GODFREY-FAUSSETT P (2001). Utility of nucleic acid amplification techniques for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in sub-Saharan Africa. *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, **5**(4): 364–369.
- KAMERBEEK J, SCHOULS L, KOLK A, VAN AGTERVELD M, VAN SOOLINGEN D, KUIJPER S, BUNSCHOTEN A, MOLHUIZEN H, SHAW R, GOYAL M, VAN EMBDEN J (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of clinical microbiology*, **35**(4): 907–914. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.4.907-914.1997>.
- KARBOUL A, GEY VAN PITTIUS NC, NAMOUCHI A, VINCENT V, SOLA C, RASTOGI N, SUFFYS P, FABRE M, CATALDI A, HUARD RC, KUREPINA N, KREISWIRTH B, HO JL, GUTIERREZ MC, MARDASSI H (2006). Insights into the evolutionary history of tubercle bacilli as disclosed by genetic rearrangements within a PE_PGRS duplicated gene pair. *BMC evolutionary biology*, **6**: 107. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-107>.
- KAUFMANN SH, BAUMANN S, NASSER EDDINE A (2006). Exploiting immunology and molecular genetics for rational vaccine design against tuberculosis. *Tuberculosis and Lung Disease*, **10**(10): 1068-1079.

- KIYAN M (1999). Mycobacteriaceae. USTAÇELEBİ S, CENGİZ AT (Ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara: Güneş Kitabevi; s.:419-455.
- KIERS A, KLARENBEEK A, MENDELTS B, VAN SOOLINGEN D, KOËTER G (2008). Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammals. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, **12**(12): 1469-1473.
- KIM EY, LIM JE, JUNG JY, SON JY, LEE KJ, YOON YW, PARK BH, MOON JW, PARK MS, KIM YS, KIM SK, CHANG J, KANG YA (2009). Performance of the tuberculin skin test and interferon- γ release assay for detection of tuberculosis infection in immunocompromised patients in a BCG-vaccinated population. *BMC infectious diseases*, **9**: 207.
- KREMER K, GLYNN JR, LILLEBAEK T, NIEMANN S, KUREPINA NE, KREISWIRTH BN, BIFANI PJ, VAN SOOLINGEN D (2004). Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers. *Journal of clinical microbiology*, **42**(9): 4040–4049. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.9.4040-4049.2004>.
- MAAS M, MICHEL AL, RUTTEN VP (2013). Facts and dilemmas in diagnosis of tuberculosis in wildlife. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, **36**(3): 269–285. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2012.10.010>.
- MARAIS BJ, BRITTLE W, PAINCZYK K, HESSELING AC, BEYERS N, WASSERMAN E, VAN SOOLINGEN D, WARREN RM (2008). Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **47**(2): 203–207. <https://doi.org/10.1086/589248>.
- MARCOS LA, SPITZER ED, MAHAPATRA R, MA Y, HALSE TA, SHEA J, ISABELLE M, LAPIERRE P, ESCUYER VE (2017). *Mycobacterium orygis* Lymphadenitis in New York, USA. *Emerging infectious diseases*, **23**(10): 1749–1751. <https://doi.org/10.3201/eid2310.170490>.
- MELO EH, GOMES HM, SUFFYS PN, LOPES MQP, FIGUEIREDO TEIXEIRA RL, SANTOS IR, FRANCO MMJ, LANGONI H, PAES AC, AFONSO JAB, MENDONÇA CL (2021). Genotypic characterization of *Mycobacterium bovis* Isolates from dairy cattle diagnosed with clinical tuberculosis. *Front. Vet. Sci.*, **8**:747226. doi: 10.3389/fvets.2021.747226.
- MILLER M, OLEA-POPELKA F (2013). One Health in the shrinking world: experiences with tuberculosis at the human-livestock-wildlife interface. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, **36**(3): 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2012.07.005>.
- MIZUNO K, CHIKAMATSU K, AONO A, AZUMA Y, YAMADA H, MITARAI S (2009). Clinical evaluation of acid-fast smear examination with light emitting diode fluorescent microscopy. *Kekkaku: Tuberculosis*, **84**: 627-629.
- MUKAMOLOVA GV, TURAPOV OA, YOUNG DI, KAPRELYANTS AS, KELL DB, YOUNG MA (2002). Family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*, *Mol. Microbiol*; **46**: 623-635.

- MUNYEME M, RIGOUTS L, SHAMPUTA IC, MUMA JB, TRYLAND M, SKJERVE E, DJØNNE B (2009). Isolation and characterization of *Mycobacterium bovis* strains from indigenous Zambian cattle using Spacer oligonucleotide typing technique. *BMC Microbiology*; **9**: 144-152.
- MUSTAFA AS, SKEIKY YA, AL-ATTIYAH R, ALDERSON MR, HEWINSON RG, VORDERMEIER HM (2006). Immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in *Mycobacterium bovis* BCG vaccinated and *M. bovis*-infected cattle. *Infection and Immunity*; **74**: 4566-4572.
- NAMOUCHE A, DIDELOT X, SCHOCK U, GICQUEL B, ROCHA EP (2012). After the bottleneck: Genome-wide diversification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by mutation, recombination, and natural selection. *Genome research*, **22**(4): 721-734.
- OIE (Office International des Epizooties). Bovine tuberculosis. Erişim Adresi: <https://www.oie.int/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/animal-diseases/old-classification-of-diseases-notifiable-to-the-oie-list-b/> Erişim tarihi: 05/09/2022.
- OKAFOR CN, Rewane A, MOMODU II (2019). Bacillus Calmette Guerin (BCG). In StatPearls (Internet). StatPearls Publishing.
- ORAL ZEYİNLİ U, KÖKSAL F (2012). Çukurova bölgesinde akciğer tüberkülozlu hastalardan izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR yöntemiyle tiplendirilmesi [Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from pulmonary tuberculosis patients in Cukurova Region, Turkey by spoligotyping and MIRU-VNTR methods]. *Mikrobiyoloji bulteni*, **46**(2): 202–210.
- ORTATATLI M, ÇİFTÇİ MK, TUZCU M. (1998) Sığırlarda tüberküloz ve diğer granülatöz pnömoniler üzerine patolojik incelemeler. *Vet. Bil. Derg.*, **14**(2): 139-150.
- ORUENE IS, NDUKWE SC (2020). 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*, **3**(3): 205-210.
- ÖZBAL Y (2006). Tüberküloz immunolojisi. *Erciyes Tıp Dergisi*, **28**(1): 25-34.
- ÖZBEY G, KALENDER H, MUZ A (2008). Sığır tüberkülozu'nun epidemiyolojisi ve teşhisi. *Sağ. Bil. Derg.*, **22**(5): 307-314.
- PARRISH N, DIONNE K, SWEENEY A, HEDGEPEETH A, CARROLL K (2009). Differences in time to detection and recovery of *Mycobacterium spp.* between the MGIT 960 and the BacT/ALERT MB automated culture systems. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, **63**(3): 342–345. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.11.008>.
- PAVLIK I, DVORSKA L, BARTOS M, PARMOVA I, MELICHAREK I, JESENSKA A, HAVELKOVA M, SLOSAREK M, PUTOVA I, MARTIN G, ERLER W, KREMER K, VAN SOOLINGEN D (2002). Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in the Czech Republic and Slovakia in the period 1965–2001 studied by spoligotyping. *Veterinarni Medicina*, **47**: 181-194.

- PEREIRA SM, DANTAS OMS, XIMEDNES R, BARRETO ML (2007). BCG vaccine against tuberculosis: its protective effect and vaccination policies. *Rev Saude Publica*, **41**: 59-66.
- PFYFER GE, BROWN-ELLIOT BA, WALLACE RJ. Mycobacterium: MURRAY PR, BARON EJ, PFALLER MA, TENOVER FC, YOLKEN RH (eds) (2003). In Manual of Clinical Microbiology. 8th ed Washington DC, 532- 559, 1156-1164.
- PFYFFER GE (2015). Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. In Manual of Clinical Microbiology, 11th ed, 536-569.
- PRODINGER WM, INDRA A, KOKSALAN OK, KILICASLAN Z, RICHTER E (2014). *Mycobacterium caprae* infection in humans. *Expert Rev Anti Infect Ther* **12**(12): 1501-1513.
- RACHMAN H, STRONG M, ULRICHS T, GRODE L, SCHUCHHARDT J, MOLLENKOPF H, KOSMIADI GA, EISENBERG D, KAUFMANN SH (2006). Unique transcriptome signature of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary tuberculosis. *Infection and immunity*, **74**(2): 1233–1242. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.1233-1242.2006>.
- RORING S, SCOTT AN, GLYN HEWINSON R, NEILL SD, SKUCE RA (2004). Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. *Veterinary microbiology*, **101**(1): 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.02.013>.
- RUNYON EH (1967). *Mycobacterium intracellulare*, relationship of atypical acid fast bacilli to human disease. *American Review of Respiratory Disease*, **95**: 861-867.
- SABAR İR (1956). Tüberküloz tarihçesi. Kemal Matbaası, İstanbul.
- SAHRAOUI N, MULLER B, GUETARNI D, BOULAHBAL F, YALA D, OUZROUT R, BERG S, SMITH NH, ZINSSTAG J (2009). Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. *BMC veterinary research*, **5**: 4. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-4>.
- SAYIN Z, ERGANIS O (2011). Identification of Mycobacterium strains by PCR and PCR-REA. *Bull Vet Inst Pulawy*, **55**: 641-644.
- SECHI LA, LEORI G, LOLLAI SA, DUPRE I, MOLICOTTI P, FADDA G, DELOGU G, ZANETTI S (1999). Different strategies for molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Sardinia, Italy. *Applied and environmental microbiology*, **65**(4): 1781–1785.
- SEIBERT FB, DUFOUR E (1948). A study of certain problems in the use of standard tuberculin. Fractionation of PPD, standardization of tuberculins, and the question of sensitization. *American review of tuberculosis*, **58**: 363-374.
- SİĞİR BOVİNE TÜBERKÜLOZU YÖNETMELİĞİ (2009). Tarım Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Yönetmelik. Resmî Gazete Sayı: 27188.
- SINTCHENKO V, JELFS P, DALLY M, CRIGHTON T, GILBERT GL (2006). A case of urinary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis subspecies caprae*. *Pathology*, **38**(4): 376-378.

- SMITH I (2003). *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, **16** (3): 463-496.
- SMITH NH, GORDON SV, DE LA RUA-DOMENECH R, CLIFTON-HADLEY RS, HEWINSON RG (2006). Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nature reviews. Microbiology*, **4**(9): 670–681. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1472>.
- SMITH NH, UPTON P (2012). Naming spoligotype patterns for the RD9-deleted lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex; www.mbovis.org. *Infection, Genetics and Evolution*, **12**: 873-876.
- SOTGIU G, CENTIS R, D'AMBROSIO L, MIGLIORI GB (2015). Tuberculosis treatment and drug regimens. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **5**: a017822.
- SUPPLY P, MAZARS E, LESJEAN S, VINCENT V, GICQUEL B, LOCHT C (2000). Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular microbiology*, **36**(3): 762–771. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01905.x>
- SUPPLY P, LESJEAN S, SAVINE E, KREMER K, VAN SOOLINGEN D, LOCHT C (2001). Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *Journal of clinical microbiology*, **39**(10): 3563–3571. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3563-3571.2001>.
- SUPPLY P, ALLIX C, LESJEAN S, CARDOSO-OELEMANN M, RUSCH-GERDES S, WILLERY E, SAVINE E, DE HAAS P, VAN 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, VAN SOOLINGEN D (2006). Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*, **44**(12): 4498–4510. <https://doi.org/10.1128/JCM.01392-06>.
- THOEN CO, STEELE JH, GILSDORF MJ (2006). *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Ames, Iowa: Blackwell; London: Eurospan, 2006.
- THOEN CO, LOBUE PA, ENARSON DA, KANEENE JB, DE KANTOR IN (2009). Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. *Veterinaria italiana*, **45**(1): 135–181.
- THOEN CO, STEELE JH, KANEENE JB (eds) (2014). Zoonotic tuberculosis: *Mycobacterium bovis* and other pathogenic mycobacteria. 3rd Edition. Ames, Iowa: Wiley Blackwell.
- TOBIAN AA, POTTER NS, RAMACHANDRA L, PAI RK, CONVERY M, BOOM WH, HARDING CV (2003). Alternate class I MHC antigen processing is inhibited by Toll-like receptor signaling pathogen-associated molecular patterns: *Mycobacterium tuberculosis* 19-kDa lipoprotein, CpG DNA, and lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, **171**(3): 1413-1422.

- TUZCU N, KÖKSAL F (2020). Genetic evaluation of *Mycobacterium bovis* isolates with MIRU-VNTR and spoligotyping. *Turkish Journal of Medical Sciences*, **50**(8): 2017-2023.
- ULUSAL TÜBERKÜLOZ TANI REHBERİ, 2014. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 935, Ankara.
- VAN EMBDEN JD, CAVE MD, CRAWFORD JT, DALE JW, EISENACH KD, GICQUEL B, HERMANS P, MARTIN C, MCADAM R, SHINNICK TM (1993). Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of clinical microbiology*, **31**(2): 406–409. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.2.406-409.1993>.
- VAN INGEN J, RAHIM Z, MULDER A, BOEREE MJ, SIMEONE R, BROSCHE R, VAN SOOLINGEN D (2012). Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis complex subspecies*. *Emerging infectious diseases*, **18**(4): 653.
- VAN SOOLINGEN D, HOOGENBOEZEM T, DE HAAS PE, HERMANS PW, KOEDAM MA, TEPPEMA KS, BRENNAN PJ, BESRA GS, PORTAELS F, TOP J, SCHOOLS LM, VAN EMBDEN JD (1997). A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **47**(4): 1236-1245. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-1236>.
- VAN SOOLINGEN D, HERMANS PW, DE HAAS PE, SOLL DR, VAN EMBDEN JD (1991). Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, **29**(11): 2578–2586. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.11.2578-2586.1991>.
- VELAYATI AA, MASJEDI MR, FARNIA P, TABARSI P, GHANAVI J, ZIAZARIFI AH, HOFFNER SE (2009). Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in Iran. *Chest*, **136**(2): 420–425. <https://doi.org/10.1378/chest.08-2427>.
- VELMURUGAN K, CHEN B, MILLER JL, AZOGUE S, GURSES S, HSU T, GLICKMAN M, JACOBS WR, JR PORCELLI SA, BRIKEN V (2007). *Mycobacterium tuberculosis* nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells. *PLoS pathogens*, **3**(7): e110. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030110>.
- VEYRIER FJ, DUFORT A, BEHR MA (2011). The rise and fall of the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Trends in microbiology*, **19**(4): 156-161.
- WAGNER JC, BUCHANAN G, BOKKENHEUSER V, LEVISEUR S (1958). An acid-fast bacillus isolated from the lungs of the Cape hyrax, *Procavia capensis* (Pallas). *Nature*, **181**(4604): 284-285.
- WEBER I, FRITZ C, RUTTKOWSKI S, KREFT A, BANGE FC (2000) Anaerobic nitrate reductase (narGHJI) activity of *Mycobacterium bovis* BCG in vitro and its contribution to virulence in immunodeficient mice. *Mol Microbiol*; **35**: 1017–1025.

- WEI CY, HSU YH, CHOU WJ, LEE CP, TSAO WL (2004). Molecular and histopathologic evidence for systemic infection by *Mycobacterium bovis* in a patient with tuberculous enteritis, peritonitis, and meningitis: a case report, *The Kaohsiung journal of medical sciences*, **20**(6): 302–307. [https://doi.org/10.1016/S1607-551X\(09\)70122-6](https://doi.org/10.1016/S1607-551X(09)70122-6).
- WHO GLOBAL TB REPORT (2020). Geneva, Switzerland. Erişim Adresi: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131> Erişim tarihi: 05/10/2022.
- WOODS GL, WASHINGTON JA (1987). Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: review of microbiologic and clinical aspects. *Rev Infect Dis.*, **79**: 275-9.
- WOOD PR, CORNER LA, ROTHEL JS, BALDOCK C, JONES SL, COUSİNS DB, MCCORMICK BS, FRANCIS BR, CREEPER J, TWEDDLE NE (1991). Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Australian veterinary journal*, **68**(9): 286–290. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1991.tb03254.x>.
- YARDIMCI H (2006). Mycobacterium enfeksiyonları. In: AYDIN N, PARACIKOĞLU J (Ed) Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). 1. Baskı. Ankara. İlke-Emek Matbacılık ve Yayıncılık.
- YARDIMCI H, ÜNAL CB, ATASEVEN LK, SAREYYÜPOĞLU B (2007). Sığır tüberkülozunun PCR ile tanısı ve *Mycobacterium bovis*'in spoligotiplendirme yöntemi ile genotiplendirilmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **54**(3): 183-189. DOI: 10.1501/Vetfak_0000000278.
- ZHAI W, WU F, ZHANG Y, FU Y, LIU Z (2019). The immune escape mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis*. *International journal of molecular sciences*, **20**(2): 340.
- ZHANG Y, POST-MARTENS K, DENKIN S (2006). New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. *Drug discovery today*, **11**(1-2): 21-27.
- ZOZIO T, ALLIX C, GUNAL S, SARIBAS Z, ALP A, DURMAZ R, FAUVILLE-DUFAUX M, RASTOGI N, SOLA C (2005). Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in two cities of Turkey: description of a new family of genotypes that is phylogeographically specific for Asia Minor. *BMC microbiology*, **5**: 44. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-44>.
- ZUNIGA ES, EARLY J, PARISH T (2015). The future for early-stage tuberculosis drug discovery. *Future microbiology*, **10**(2): 217–229. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.125>.