

Mersin İlinde Çiğ Sütlerden *Mycobacterium bovis* ve Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin İzolasyonu ve Tanımlanması

Isolation and Identification of *Mycobacterium bovis* and Non-tuberculous Mycobacteria in Raw Milk Samples in Mersin Province

Fatma Esin AYDIN¹, Mahmut ÜLGER¹, Gürol EMEKDAŞ¹, Gönül ASLAN¹, Selami GÜNAL²

¹ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

¹ Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Mersin, Turkey.

² İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.

² Inonu University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Malatya, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 10.08.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 21.01.2012

ÖZET

Çalışmamızda, sığır çiğ süt örneklerinde *Mycobacterium bovis* ve tüberküloz dışı mikobakteri (non-tuberculous mycobacteria; NTM) türlerinin izolasyonu, tanımlanması ve kullanılan yöntemlerin tanılabilirlik performanslarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, Nisan 2008-Haziran 2008 döneminde Mersin ilindeki beş köyden toplanan 145 sığır çiğ süt örneği incelenmiş; bu örneklerde mikobakteri varlığı Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama yöntemi, Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerinde kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. Toplam 145 çiğ süt örneğinden hazırlanan yaymaların EZN boyama sonucunda sadece 1 (%0.7) örnekte aside dirençli basil (ARB) görülmüş, 11 (%7.6) örneğin LJ besiyerinde kültürü pozitif olarak belirlenmiş ve 6 (%4.1) örnekte PCR ile mikobakteri DNA'sı tespit edilmiştir. Kültür pozitif bir örneğin, hem kaymak hem de pellet tabakasından mikobakteri izolasyonu yapılmıştır. İzolatların tanımlanması, geleneksel biyokimyasal testler, PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphisms) ve spoligotiplendirme (spacer oligonucleotide typing) yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Kültürde izole edilen toplam 12 izolattan biri *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTC), 11'i de NTM olarak tanımlanmıştır. PCR-RFLP sonuçlarına göre 11 NTM izolatının 6 (%54.5)'si *Mycobacterium genavense*, 2 (%18.2)'si *Mycobacterium simiae*, 2 (%18.2)'si *Mycobacterium szulgai* ve 1 (%9.1)'i *Mycobacterium fortuitum* olarak belirlenmiştir. MTC izolatı spoligotiplendirme yöntemiyle *M.bovis* olarak tanımlanmıştır. Çalışmamızın sonuçlarına göre, süt örneklerindeki izolasyon şansını artırmak için; hem pellet hem de kaymak tabakalarından selektif LJ besiyerine (gliserolsüz, %0.4 sodyum pirüvatlı) ekim yapılmalı ve kültürle-

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Gönül Aslan, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 324 337 4300/2182, **E-posta (E-mail):** drgaslan@gmail.com

rin mutlaka sekiz haftaya kadar inkübe edilmesi gerekmektedir. Sonuç olarak bölgemizde sığır çiğ süt örneklerinde NTM %6.9 ve *M.bovis* %0.7 oranında izole edilmiş; insanların bu mikroorganizmalara doğrudan temas yoluyla veya pastörize edilmemiş süt ürünlerinin tüketilmesiyle maruz kalabilecekleri bir kez daha vurgulanmıştır.

Anahtar sözcükler: *Mycobacterium bovis*; tüberküloz dışı mikobakteri; çiğ süt; izolasyon; tanımlama.

ABSTRACT

This study was aimed to isolate and identify *Mycobacterium bovis* and non-tuberculous mycobacteria (NTM) species in raw milk samples from cattles and to compare the diagnostic performance of the methods used for that purpose. A total of 145 raw milk samples from cattles were collected from five villages in Mersin province (located on Mediterranean region of Turkey) between April and June 2008. Presence of mycobacteria was investigated by Ehrlich Ziehl Neelsen (EZN) staining method, culture in Löwenstein-Jensen (LJ) medium and polymerase chain reaction (PCR). Only 1 (0.7%, 1/145) raw milk sample was found to be acid fast bacilli (AFB) positive with EZN staining. Eleven (7.6%) samples were positive by culture and mycobacterial DNA was detected in 6 (4.1%) samples by PCR. *Mycobacterium* was isolated from both creamy and pellet layer of a culture positive sample. Identification was carried out with conventional biochemical tests, PCR-Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLP) and spoligotyping (spacer oligonucleotide typing) methods. One isolate was identified as *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) and 11 isolates were identified as NTM out of 12 isolates those were isolated from culture. According to PCR-RFLP analysis of these 11 NTM isolates, 6 (54.5%) were *Mycobacterium genavense*, 2 (18.2%) were *Mycobacterium simiae*, 2 (18.2%) were *Mycobacterium szulgai* and 1 (9.1%) was *Mycobacterium fortuitum*. MTC isolate was identified as *M.bovis* by spoligotyping. According to the results of our study, both pellet and creamy layers from raw milk samples should be cultured to selective LJ medium (without glycerol, with 0.4% sodium pyruvate) to improve the chance of isolation and must be incubated for up to eight weeks. In our region, NTM were isolated in 6.9% and *M.bovis* in 0.7% of the raw milk samples from cattles and this emphasized the risk of transmission of mycobacteria to man via direct contact or ingestion of unpasteurized milk products.

Key words: *Mycobacterium bovis*; non-tuberculous mycobacteria; raw milk; isolation; identification.

GİRİŞ

Mycobacterium tuberculosis, insan tüberküloz hastalığının en sık nedeni olup, yetişkinler arasındaki ölümlerin başta gelen sebebidir. Ancak tüberküloz olgularının bilinmeyen bir oranının *Mycobacterium bovis*'ten kaynaklandığı belirtilmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde *M.bovis* kaynaklı insan tüberkülozu oranı, tüberkülozun bütün formlarının üçte birinden sorumlu olarak gösterilmektedir¹. Enfekte hayvanlardan mikobakterilerin insanlara geçişi, enfekte süt ve pastörize edilmemiş çiğ süt ürünlerinin tüketilmesiyle olmaktadır².

Yeryüzündeki 120 mikobakteriyel türün 50'si fırsatçı tüberküloz dışı mikobakteri (non-tuberculous mycobacteria; NTM) olarak kabul edilmektedir. NTM'ler, doğal kaynak sularının, içme sularının, hayvanların, kuşların ve toprağın normal florasında da bulunmaktadır. Bu mikobakteriler et, balık, süt ürünleri, meyve, sebze ve özellikle süttten izole edilmiştir³.

Diğer gelişmekte olan ülkelerdeki gibi Türkiye’de de, *M.bovis* ve NTM’lerin neden olduğu tüberküloz enfeksiyonlarının sayısı hakkında epidemiyolojik veriler oldukça azdır. Enfeksiyon hastalıkları bildirim sistemindeki sorunlar nedeniyle bildirilen sığır tüberkülozu enfeksiyonları, olguların tam sayısını yansıtmamaktadır. Ayrıca, *M.tuberculosis* kompleks (MTC) ve NTM üyelerinin tür düzeyinde tanımlanması Türkiye’de birçok mikobakteriyoloji laboratuvarlarında gerçekleştirilememektedir⁴.

Çalışmamızda, Mersin ilinde çeşitli bölgelerden toplanan sığır çiğ süt örneklerinde *M.bovis* ve NTM izolasyonu ve tanımlanması yapılarak epidemiyolojik veri elde edilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, izolasyon ve tanımlamada kullanılan yöntemlerin performanslarının irdelenmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örneklerin Hazırlanması, Kültür ve Tanımlama İşlemleri

Nisan 2008-Haziran 2008 döneminde Mersin ilinde beş köyden toplam 145 sığır çiğ süt örneği, aseptik koşullarda steril 50 ml’lik santrifüj tüpüne alındı. Bu örnekler daha sonra 15 dakika 4000xg’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kaymak ve pellet tabakaları ayrı ayrı sodyum dodesil sülfat (SDS)-sodyum hidroksit (NaOH) (%1 NaOH-%3 SDS) ile homojenize ve dekontamine edildi⁵. Nötralizasyon için steril 0.067 M fosfat tamponu (pH 6.8) ilave edildi ve santrifüj sonrası sediment, 2 ml steril distile su ile süspansiyon edildi. Hem pellet hem de kaymak örneklerinin sedimentinden yaymalar hazırlandı. İzolasyon için selektif Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeri (gliserolsüz, %0.4 sodyum pirüvatlı) ve ticari LJ besiyerine (BBL Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) ekim yapıldı ve en az 8-10 hafta boyunca 37°C’de inkübe edildi. Kalan örnekler DNA ekstraksiyonu için -20°C’de saklandı⁶.

Kültüründe üreme tespit edilen örneklerden hazırlanan yayma preparatlarda, Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama yöntemiyle aside dirençli basil (ARB) varlığı arandı⁶. ARB pozitif kolonilere geleneksel biyokimyasal yöntemler [niasin birikimi, nitrat redüksiyon, katalaz aktivitesi, para-nitrobenzoik asit (PNB)’li besiyerinde üreme, mikroskobik ve makroskobik koloni morfolojisi ile pirüvat içeren LJ besiyerinde üreme] kullanılarak tanımlama işlemi yapıldı⁶. Polimeraz zincir reaksiyonu-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ve spoligotiplendirme yöntemleri, tür düzeyinde moleküler tanımlama için kullanıldı. Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığından temin edilen *M.tuberculosis* H37Rv, *M.bovis* 14.002.001 ve *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841 suşları geleneksel ve moleküler tanımlamada kalite kontrol suşları olarak kullanıldı.

Moleküler Analiz

Sığır çiğ süt örneklerinden ve LJ besiyerinde üreyen mikobakteri kolonilerinden mikobakteriyel DNA ekstraksiyonu yapıldı⁷. PCR-RFLP analizinde ise *hsp65* geninin 439 baz çift (bc)’lik bölgesi özgül primerler [Tb11 5’-ACCAACGATGGTGTGCCAT ve Tb12 5’-CTTGTCGAACCGCATACCCT (MOLBIOL, Almanya)] kullanılarak amplifiye edildi⁸. Amplifikasyon sonrası *BstEII* (Fermentas, #ER0391, Almanya) ve *HaellI* (Fermentas, #ER0151, Almanya) kesim enzimleri kullanılarak RFLP analizi gerçekleştirildi. Spoligotiplendirme

yöntemi için *M.tuberculosis* genomunun direkt tekrar (direct repeat, DR) bölgesi, 5' ucu biyotin ile işaretlenmiş DRa ve DRb primerleri kullanılarak amplifiye edildi. Pozitif kontrol olarak *M.tuberculosis* H37Rv ve *M.bovis* BCG suşları kullanıldı. Çalışma sonucu elde edilen veriler, "Institut Pasteur de Guadeloupe, Fransa SpolDB4" veri tabanında analiz edildi ve paylaşılan tip (shared-type, ST) kümesi ve tür (clade) belirlendi⁹.

İstatistiksel Analiz

Örnek sayısı, MedCalc®v10.3.0 istatistik paket programını kullanılarak hesaplandı. Bu çalışmada sığır çiğ sütlerinde mikobakteri varlığını tespit etmede kullanılan ARB ve PCR yöntemlerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif (PPD) ve negatif prediktif değerleri (NPD) MedCalc 11.5.1 programı ile, kaymak ve pellet örneklerinin kültüründe kullanılan selektif LJ besiyeri ile ticari LJ besiyerlerinde mikobakteri izolasyon oranlarının arasındaki fark ise ki-kare testi ile analiz edildi ve $p < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası hazırlanan yaymalardan EZN yöntemiyle boyama sonucunda sadece 1 (%0.7) kaymak örneğinde ARB varlığı tespit edilmiştir. Toplam 145 sığır çiğ süt örneğinden 11 (%7.6)'inin kültürü, 6 (%4.1)'inin ise PCR sonucu pozitif bulunmuştur (Tablo I). Kültür pozitif bir örneğin, hem kaymak hem de pellet tabakasından mikobakteri izole edilmiştir. İzole edilen 12 mikobakteriye ait örneğin 9 (%75)'u pellet örneklerinden, 3 (%25)'ü ise kaymak örneklerinden izole edilmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Kaymak örnekleri için ticari LJ besiyeri veya selektif LJ besiyeri kullanımı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p > 0.05$) saptanmazken, pellet örnekleri için bu fark ($p < 0.05$) anlamlı bulunmuştur. Kültür işlemlerinde selektif ve ticari LJ besiyeri kullanımı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır

Tablo I. Uygulanan Yöntemlerle Sığır Çiğ Süt Örneklerinden (n= 145) Alınan Sonuçlar ve Duyarlılık, Özgüllük, Pozitif ve Negatif Prediktif Değerleri

Örnekler	Kültür (n= 11)			Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD	
	Pozitif (%)	Negatif (%)	Toplam (%)					
ARB Kaymak (n= 1)	Pozitif	1 (0.7)	0	1 (0.7)	%9.1	%100	%100	%93.1
	Negatif	10 (6.9)	134 (92.4)	144 (99.3)				
	Toplam	11 (7.6)	134 (92.4)	145 (100)				
Pellet	Pozitif	0	0	0	0	%100	-	%92.4
	Negatif	11 (7.6)	134 (92.4)	145 (100)				
	Toplam	11 (7.6)	134 (92.4)	145 (100)				
PCR Kaymak (n= 6)	Pozitif	1 (0.7)	0	1 (0.7)	%9.1	%100	%100	%93.1
	Negatif	10 (6.9)	134 (92.4)	144 (99.3)				
	Toplam	11 (7.6)	134 (92.4)	145 (100)				
Pellet	Pozitif	5 (3.4)	0	5 (3.4)	%45.5	%100	%100	%95.7
	Negatif	6 (4.1)	134 (92.4)	140 (96.6)				
	Toplam	11 (7.6)	134 (92.4)	145 (100)				

ARB: Aside dirençli basıl; PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu; PPD: Pozitif prediktif değer; NPD: Negatif prediktif değer.

($p < 0.05$) (Tablo II). *M.bovis* izolatu sadece selektif LJ besiyerinde ve kaymak örneğinden izole edilmiştir.

Kültürde izole edilen toplam 12 mikobakteri izolatinın geleneksel biyokimyasal testler ve PCR-RFLP ile tanımlanması sonucu biri MTC, 11'i ise NTM olarak belirlenmiştir. PCR-RFLP sonuçlarına göre 11 NTM izolatinın 6 (%54.5)'si *Mycobacterium genavense*, 2 (%18.2)'si *Mycobacterium simiae*, 2 (%18.2)'si *Mycobacterium szulgai* ve 1 (%9.1)'i *Mycobacterium fortuitum* olarak belirlenmiştir. Kaymak ve pellet tabakasında mikobakteri izole edilen örnekteki her iki izolat da *M.genavense* olarak tanımlanmıştır. NTM olarak belirlenen izolatlara LJ besiyerinde bir haftada ürerken, MTC izolatu selektif LJ besiyerinde 55. günde üremiştir. Uzun inkübasyon döneminden dolayı bu izolata spoligotiplendirme yöntemi uygulanmış ve sonuçta *M.bovis* için karakteristik DR lokusları tespit edilmiştir. Toplam 145 sığır çiğ sütünün kültürü sonrası, pozitif 11 örneğin tanımlanması sonucunda bir örnek *M.bovis*, 10 (%6.9) örnek ise NTM olarak belirlenmiştir. NTM izolatlara ise spoligotiplendirme yöntemiyle tanımlanamamaktadır.

TARTIŞMA

Türkiye'de zoonotik tüberküloz olgu prevalansını gösteren epidemiyolojik veriler yetersizdir. Birçok çalışmada mikobakteriler, tür seviyesinde tanımlanamamıştır. Ünver ve arkadaşları¹⁰ Kars'ta sığırlarda *M.bovis* DNA'sını tespit eden PCR yöntemiyle *M.bovis* prevalansını %6.7 (8/120) olarak bildirmişlerdir. Elazığ'da Ağaçayak ve arkadaşları¹¹, tüberküloz hastalarının balgam örneklerinde kültür ve PCR-RFLP yöntemleriyle %86.3 (44/51) oranında MTC ve %13.7 (7/51) oranında NTM izole etmişlerdir. MTC izolatlarının 34 (%77.3)'ü *M.tuberculosis*, 8 (%18.2)'i *M.bovis*, 1 (%2.3)'i *Mycobacterium microti* ve 1 (%2.3)'i *Mycobacterium africanum* olarak tanımlanmıştır. Konuk ve arkadaşları⁵, 35 çiğ süt örneğinde PCR-RFLP yöntemiyle 15 (%42.9) NTM (altı *Mycobacterium terrae*, üç *Mycobacterium kansasii*, üç *Mycobacterium haemophilum*, bir *Mycobacterium agri*, iki tanımlanamayan) suşu saptamışlardır. Kayseri bölgesinde Gümüşsoy ve arkadaşları¹², mezbahalarda kesilen 3216 sığırdan akciğer, bronşiyal ve mediastinal lenf nodları toplayarak sığır tüberkülozu prevalansını araştırmışlar; kültürde üreyen *M.bovis* oranlarını sırasıyla %19, %19 ve %17 olarak bildirmişler ve BACTEC 460TB sisteminde *Mycobacterium* spp. izolasyon oranlarını sırasıyla %21, %21 ve %17 olarak tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, sığır tüberkülozu prevalansı %1.5 olarak saptanmıştır. Van bölgesinde yapılan bir çalış-

Tablo II. Kaymak ve Pellet Örneklerinin Löwenstein-Jensen (LJ) ve Selektif LJ Besiyerinde Üreyen İzolatlarının Sayısı

Örnekler	İzolat sayısı (n= 12)			p
	LJ besiyeri (%)	Selektif LJ besiyeri* (%)	Toplam (%)	
Kaymak	2 (16.7)	1 (8.3)	3 (25)	0.99
Pellet	1 (8.3)	8 (66.7)	9 (75)	0.01
Toplam	3 (25)	9 (75)	12 (100)	0.04
p	0.99	0.01	0.04	

* Selektif LJ besiyeri (gliserolsüz, %0.4 sodyum pirüvatlı).

mada, sığırların burun akıntısı ve süt örneklerinde PCR ile %1.4 oranında *M.bovis* belirlenmiştir¹⁰. Bizim çalışmamızda, bölgemizde sığır çiğ süt örneklerinde %6.9 oranında NTM ve bir *M.bovis* suşu izole edilmiştir. Sığırlardan alınacak olan çeşitli biyopsi materyallerinin histopatolojik incelemesi ve kültürü, bu hayvanlardaki *M.bovis* enfeksiyonu prevalansını belirlemede daha etkili ve duyarlı olacaktır.

Bu çalışma sonucunda, sadece bir süt örneğinde EZN boyama yöntemi ile ARB varlığı tespit edilirken, 11 süt örneğinin kültürü pozitif olarak bulunduğu için homojenizasyon-dekontaminasyon sonrası süt örneklerinden hazırlanan yayma sonuçlarının düşük duyarlılığından (%9.1) dolayı ARB tespitinde etkili olmadığı gösterilmiştir. Yine kültür sonuçlarıyla karşılaştırıldığında PCR'nin duyarlılığının %54.5, özgüllüğünün ise %100 olduğu bulunmuştur (Tablo I).

Tüberküloz dışı mikobakteriler doğada bulunmalarına rağmen, bağıışıklık sistemi basılanmış hastalarda çeşitli klinik sendromlarda enfeksiyona sebep olabilmektedirler³. Bu çalışmada sığır çiğ süt örneklerinden *M.simiae*, *M.fortuitum*, *M.genavense* ve *M.szulgai* türleri izole edilmiştir. Bu mikobakteriler servikal lenfadenit ve akciğer hastalıkları gibi enfeksiyon hastalıklarının etkeni olarak gösterilmektedir³. Bu bölgede daha önce yapılan bir çalışmada, çiğ sütlerde NTM izole edilememiştir¹³. Bu çalışmada daha az (n= 40) çiğ süt örneği incelenmiş, inkübasyon için altı hafta bekletilmiş ve ekimler süt örneklerinin pellet kısmından yapılmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada ise, daha fazla (n= 145) çiğ süt örneğinin pellet ve kaymak tabakalarından ayrı ayrı ekim yapılarak inkübasyon süresi sekiz haftaya çıkarılmıştır. Yapılan yöntem değişikliği sonucunda 11 çiğ süt örneğinin kültürü pozitif olarak bulunmuş ve bunların 10'u NTM, biri ise *M.bovis* olarak tanımlanmıştır. Diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda, sığır sütlerinde *M.bovis* izolasyon oranı %0.2-11.8; NTM izolasyon oranı ise %3.7-58 arasında değişmektedir^{2,3,14-17}. Süt dışı diğer örneklerde *M.bovis* izolasyon oranının %5.5-45.5, NTM izolasyonunun ise %20.6-22.7 arasında değiştiği belirtilmektedir^{2,14,16,17}.

Çalışmamızın sonuçları, *M.bovis* ve NTM'lerin hala sütlerde bulunduğunu ve bu mikroorganizmaların Mersin ilinde zoonotik tüberküloz enfeksiyonu için olası risk taşıdığını göstermiştir. Bu örneklerdeki izolasyon şansını artırmak için; süt örneklerinin hem pellet hem de kaymak tabakalarından kültür yapılmalı, selektif LJ besiyerine ekim yapılmalı (Tablo II) ve ayrıca kültürler mutlaka sekiz haftaya kadar inkübe edilmelidir. Sonuç olarak çalışmamızda, sığır çiğ süt örneklerinde %6.9 oranında NTM ve %0.7 oranında *M.bovis* izole edilerek bölgemize ait ilk epidemiyolojik veriler elde edilmiştir. Çalışmamızın sonuçları, çiğ sütlerin tüketilmeden ve süt ürünleri için hammadde olarak kullanılmadan önce pastörize edilmesi gerektiği gerçeğini bir kez daha vurgulamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, et al. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerg Infect Dis 1998; 4(1): 59-70.
2. Leite CQ, Anno IS, Leite SR, Roxo E, Morlock GP, Cooksey RC. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98(3): 319-23.

3. Jordão Junior CM, Lopes FC, David S, Farache Filho A, Leite CQ. Detection of non-tuberculous mycobacteria from water buffalo raw milk in Brazil. *Food Microbiol* 2009; 26(6): 658-61.
4. Aslan G. İnsanlarda hayvan kaynaklı tüberküloz. I. Ulusal Zoonoz Kongresi, 3-6 Aralık 2007, Erzurum. Konuşma Metinleri ve Bildiri Özetleri Kitabı, s: 37-40.
5. Konuk M, Korcan E, Dülgerbaki S, Altındış M. Isolation and identification of mycobacteria from raw milk samples in Afyonkarahisar district of Turkey. *Int J Food Microbiol* 2007; 115(3): 343-7.
6. Isenberg HD (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2004, Volume 2. ASM Press, Washington, DC.
7. Durmaz R, Günel S. Tüberkülozun tanısında polimeraz zincir reaksiyonunun kullanılması, s: 173-9. Durmaz R (ed), *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. 2001, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
8. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31(2): 175-8.
9. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35(4): 907-14.
10. Ünver A, Atabay Hİ, Güneş V, Çitil M, Erdoğan HM. Kars yöresinde sığır tüberkülozunun yaygınlığının PCR ile belirlenmesi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* 2007; 13(1): 27-31.
11. Ağaayak A, Bulut Y, Seyrek A. Elazığ yöresinde tüberkülozlu hastaların balgam örneklerinde mikobakteri tür dağılımının PCR-RFLP yöntemi ile belirlenmesi. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41(2): 203-9.
12. Gümüşsoy KS, Atasever A, Aydın F, et al. Prevalence of tuberculosis in cattle in Turkey. *Medycyna Wet* 2007; 63(3): 305-8.
13. Cafri U, Aslan G, Direkel S, Tarhan G, Ceyhan I, Emekdaş G. Identification and isolation of non-tuberculous mycobacteria from environmental samples. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44(3): 395-403.
14. Srivastava K, Chauhan DS, Gupta P, et al. Isolation of *Mycobacterium bovis* & *M. tuberculosis* from cattle of some farms in north India-possible relevance in human health. *Indian J Med Res* 2008; 128(1): 26-31.
15. Kazwala RR, Daborn CJ, Kusiluka LJ, Jiwa SF, Sharp JM, Kambarage DM. Isolation of *Mycobacterium* species from raw milk of pastoral cattle of the Southern Highlands of Tanzania. *Trop Anim Health Prod* 1998; 30(4): 233-9.
16. Jha VC, Morita Y, Dhakal M, et al. Isolation of *Mycobacterium* spp. from milking buffaloes and cattle in Nepal. *J Vet Med Sci* 2007; 69(8): 819-25.
17. Shankar H, Singh SV, Singh PK, Singh AV, Sohal JS, Greenstein RJ. Presence, characterization, and genotype profiles of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from unpasteurized individual and pooled milk, commercial pasteurized milk, and milk products in India by culture, PCR, and PCR-REA methods. *Int J Infect Dis* 2010; 14(2): 121-6.