

Düzce İlinde İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks Suşlarında *Mycobacterium bovis* subsp. *bovis* Varlığının Araştırılması*

Investigation of *Mycobacterium bovis* subsp. *bovis* Among the Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolated in Düzce Province, Turkey

Cihadiye Elif ÖZTÜRK¹, İdris ŞAHİN¹, Şükrü ÖKSÜZ¹, Nida KILIÇ¹, Özge KILINÇEL¹, Leyla AYDIN², Dursun ATİK³, Emine AFŞİN⁴

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

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

² Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Düzce.

² Düzce University Faculty of Medicine, Department of Chest Diseases, Düzce, Turkey.

³ Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Düzce.

³ Düzce University Institute of Health Sciences, Department of Microbiology, Düzce, Turkey.

⁴ Düzce Atatürk Devlet Hastanesi, Göğüs Hastalıkları Kliniği, Düzce.

⁴ Düzce Atatürk State Hospital, Chest Diseases Clinic, Düzce, Turkey.

* Bu araştırma, Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2014.04.01.252 nolu Hızlı Proje ile desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 19.11.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 19.07.2016

ÖZ

Tüberküloz (TB), insanlık tarihi boyunca ciddi hastalıklara neden olmuş ve halen olmaya devam etmektedir. Arkeobiyolojik çalışmalarda, insan TB olgularının M.Ö. 4000-8000 yıl öncesine kadar dayandığı ve olguların *Mycobacterium tuberculosis*'den ziyade *Mycobacterium bovis* subsp. *bovis* nedeniyle olduğu gösterilmiştir. Bunun da hayvanların evcilleştirilip, sütlerinin tüketilmesi ve aynı ortamda yaşanmasıyla başladığı düşünülmektedir. Zamanla sütlerin kaynatılarak tüketilmesi ve hayvan barınaklarının ayrılması ile *M.bovis* subsp. *bovis* enfeksiyonuna çok az rastlanmaya başlamıştır. Günümüzde *M.bovis* enfeksiyonları, çoğunlukla hayvandan insana, çok nadiren de insandan insana bulaşabilmektedir. En önemli bulaşma, enfekte hayvanların sütlerinin çiğ olarak tüketilmesiyle gastrointestinal yolla ve solunum yolu çıkartılarından damlacık enfeksiyonu ile olmaktadır. Bu çalışma, Düzce'de son birkaç yıldır büyükbaş hayvanlarda TB vakalarının görülmesi nedeniyle, insan TB olgularının içinde bovin tip TB varlığının araştırılması için

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Cihadiye Elif Öztürk, Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konuralp, Düzce, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 532 445 2078, **E-posta (E-mail):** celifozturk@gmail.com

planlanmıştır. Bu amaçla, mikobakteriyoloji laboratuvarımızda 2004-2014 yılları arasında üretilmiş olan *M.tuberculosis* kompleks (MTBC) suşları incelenmiş ve bu izolatların alt tür tayini yapılarak, *M.bovis* subsp. *bovis* tespit edilen hastaların sosyodemografik ve klinik verileri değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen suşlar, 2004-2009 arasında BACTEC™ 12B radyometrik sıvı besiyeri ve/veya Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerleri; 2009-2014 arasında ise BACTEC™ MGIT™ (Mycobacteria Growth Indicator Tube) ve/veya LJ besiyerlerinde üretilen izolatlardır. Çalışmamızda, alt tür tespitinde GenoType MTBC (Hain-Lifescience GmbH, Almanya) kiti kullanılmıştır. MTBC izolatlarının, yağsız sütte -20°C'de saklanmış koleksiyonlarından, test prosedürüne göre DNA ekstraksiyonu, amplifikasyonu ve hibridizasyonları yapılarak alt tür tayini gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 220 hastadan (217 erişkin, 3 çocuk; 145 erkek, 75 kadın) izole edilen MTBC suşuna alt tür tayini yapılmış; 217 (%98.6)'sinin *M.tuberculosis/M.canettii*, üçünün (%1.4) ise *M.bovis* subsp. *bovis* olduğu saptanmıştır. Yıllara göre incelendiğinde, son üç yıla ait olan 106 olgunun üçünde (%2.8) *M.bovis* subsp. *bovis* saptanmışken, daha önceki yıllara ait 114 olguda hiç saptanmadığı görülmüştür. Bu bulgu, son yıllarda bildirilen büyükbaş hayvanlardaki TB vakalarıyla paralel bir süreç olduğunu vurgulamıştır. Bu hastaların risk faktörleri, klinik, sosyodemografik özellikleri, tedavi süreci ve sonuçları, mikobakteriyoloji laboratuvar bulguları tekrar gözden geçirilmiştir. Buna göre, *M.bovis* subsp. *bovis* saptanan birinci olgu 63 yaşında kadın olup hayvancılıkla uğraşmaktadır. Diabetes mellitus ve kronik böbrek yetmezliği olan bu olguya Temmuz 2012 tarihinde milier TB tanısı konulmuş ve hasta uygulanan tedaviyi tamamlamıştır. İkinci olgu da hayvancılıkla uğraşan, prostat kanseri tanılı 85 yaşında erkek hastadır. Bu olgu, Aralık 2013 tarihinde pulmoner TB tanısı almış, tedaviye başlamasına rağmen iki ay sonra tedaviyi terk etmiş ve bir ay sonra kaybedilmiştir. Üçüncü olgu 27 yaşında kadın hasta olup, mevsimlik işçi olarak çalıştığı sırada boynudaki kitle nedeniyle hastaneye başvurmuştur. Bu olguya Eylül 2014'de lenf bezi tüberkülozu tanısı konulmuş ve hasta tedaviyi tamamlamıştır. Birinci ve üçüncü olguya ait izolatlar streptomisin (STR), izoniazid (INH), rifampisin (RIF) ve etambutol (EMB)'e duyarlı; ikinci olguya ait izolat STR, INH ve RIF'e duyarlı, EMB'ye dirençli bulunmuş; her üç izolatin da pirazinamide dirençli olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, hayvanlardaki tüberküloz enfeksiyonlarının geniş çapta, dikkatli olarak izlenmesi ve özellikle risk grubunda olan tüberkülozlu hastalarda *M.bovis* subsp. *bovis* enfeksiyonunun araştırılmasının gerekli olduğu kanaatine varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Mycobacterium tuberculosis*; *Mycobacterium bovis*; bovin tüberkülozu; genotiplendirme.

ABSTRACT

Throughout the history of mankind, tuberculosis (TB) has caused serious illness and still continues to do so. Archaeobiological studies indicated that TB in humans dates back to 4000-8000 BC, and cases were shown to be due to *Mycobacterium bovis* subsp.*bovis* rather than *Mycobacterium tuberculosis*. Moreover, this situation was thought to begin with domestication of animals, consumption of their milk, and living together in the same environment with them. Over time, with the consumption of boiled milk and with the establishment of separate animal shelters, *M.bovis* subsp. *bovis* infection began to be seen rarely. Today, *M.bovis* infection is mostly transmitted from animals to humans and very rarely from humans to other humans. The most significant means of transmission of the infection are to the gastrointestinal tract via consumption of raw milk and to the respiratory system via droplet infection from the animals with disease. In this study, it was planned to investigate the cause of occurrence of TB in cattles in Düzce in the past few years along with the presence of bovine type TB in cases of human tuberculosis. We aimed to carry out subtype determination of the *M.tuberculosis* complex (MTBC) strains isolated in our mycobacteriology laboratory between the years 2004-2014, and evaluate the clinical and sociodemographic data of patients in whom *M.bovis* subsp. *bovis* was detected. The strains that were selected for the study have been isolated from radiometric BACTEC™ 12B broth and/or Löwenstein-Jensen (LJ) media between 2004-2009, and BACTEC™ MGIT™ (Mycobacteria Growth Indicator Tube) and/or LJ media between 2009-2014 periods. The GenoType MTBC Kit (Hain-Lifescience GmbH, Germany) was used in the study for determination of the subspecies. Extraction and amplification of

DNA and hybridizations were performed according to test procedure in order to investigate the presence of subtypes of the MTBC species in skimmed milk from collections stored at -20°C. In the study, MTBC strains isolated from 220 patients (217 adults, 3 children; 145 male, 75 female) were evaluated and 217 (98.6%) of them were identified as *M.tuberculosis*/*M.canettii* and three (1.4%) as *M.bovis* subsp. *bovis*. When the distribution of the isolates were evaluated according to the years, it was noted that three (2.8%) cases out of 106 patients within the last three years, were found to be infected with *M.bovis* subsp. *bovis*, while none were detected in the 114 cases from the previous years. This data emphasized a parallel course with the reported cases of cattle tuberculosis in recent years. The risk factors, clinical and sociodemographic features, treatment process, outcomes, and mycobacteriological findings of those three patients were reviewed. Accordingly, the first case was a 63-year-old female with diabetes mellitus and chronic renal failure, who was dealing with animal husbandry. She was diagnosed as miliary TB on July 2012 and completed her treatment schedule. The second case, who was also dealing with animal husbandry was a 85-year-old male with prostate carcinoma. This case was diagnosed as pulmonary TB on December 2013, however he has quited the treatment and died two months later. The third case, a 27-year-old female was admitted to the hospital with a cervical mass that developed when she was working as a seasonal laborer. She was diagnosed to have lymph node TB in September 2014 and completed her treatment schedule. The strains isolated from the first and third cases were found to be susceptible to streptomycin (STR), isoniazid (INH), rifampicin (RIF) and ethambutol (EMB), while the strain isolated from the second case was susceptible to STR, INH and RIF, but resistant to EMB. All of the three isolates were resistant to pyrazinamide. As a result, it was concluded that large-scaled and attentive monitoring of TB infections in animals, as well as searching for *M.bovis* subsp. *bovis* in TB cases, especially in high-risk groups would be essential for an accurate diagnosis.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; *Mycobacterium bovis*; bovine tuberculosis; genotyping.

GİRİŞ

Tüberküloz (TB) insanlık tarihi boyunca salgınlar yapmış ve hala önemini koruyan bir hastalıktır. *M.tuberculosis* kompleks (MTBC); insan ve hayvanlarda benzer klinik tablolara yol açan, bakteriyolojik ve genetik benzerlikler gösteren, *M.tuberculosis*, *M.canetti*, *M.africanum*, *M.microti*, *M.pinnipedii*, *M.bovis* subsp. *bovis*, *M.bovis* subsp. *caprae*, ve *M.bovis* subsp BCG türlerinden oluşmaktadır¹. Bu grup bakteri insan, sığır, keçi, fare ve deniz memelilerinde TB hastalığına yol açabilmektedir. Neolitik çağ ve demir çağından kalma kemiklerde yapılan araştırmalarda *M.tuberculosis*'den ziyade *M.bovis*'in insanlarda hastalık yaptığını gösteren biyoarkeolojik çalışmalar vardır². Bu enfeksiyonların; hayvanların evcilleştirilip, sütlerinin tüketilmesi ve aynı ortamda yaşanılmasıyla başladığı düşünülmektedir. Daha sonra sütlerin pastörize edilmesi ve hayvan barınaklarının ayrılması ile bu enfeksiyonun oranları azalmıştır.

M.bovis enfeksiyonları çoğunlukla hayvandan insana, çok nadiren de insandan insana bulaşabilmektedir. En önemli bulaş, enfekte hayvanların sütlerinin çiğ olarak tüketilmesiyle gastrointestinal sistemden ve solunum yolu ile çıkardıkları damlacık enfeksiyonu ile olmaktadır³. Bu çalışma, veteriner hekimlerden alınan bilgiye göre, Düzce'de son birkaç yıldır büyükbaş hayvanlarda TB vakalarının sık görülmesi nedeniyle, insan TB olgularının içinde *M.bovis* subsp. *bovis* enfeksiyon varlığının araştırılması için planlanmış ve bu amaçla 2009-2014 yılları arasında laboratuvarımızda izole edilen MTBC suşlarının alt tür tayini yapılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Düzce Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınan onay ile (27.06.2016 tarih ve 2016/65 no) gerçekleştirildi. Çalışmaya, 2004-2009 yılları arasında BACTEC 12B radyometrik sıvı besiyeri (BD, ABD) ve/veya Löwenstein-Jensen (LJ) (Salubris, Türkiye); 2009-2014 yılları arasında ise Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT; BD, ABD) ve/veya LJ (Salubris, Türkiye) besiyerleri kullanılarak üretilmiş olan suşlar arasından seçilen 220 izolat dahil edildi. Alt tür tayini için GenoType MTBC (Hain-Lifescience GmbH, Almanya) kiti kullanıldı. MTBC suşlarının, yağsız sütte -20°C'de saklanmış olan koleksiyonlarından, test prosedürüne göre önce DNA ekstraksiyonu, sonra amplifikasyon ve ardından hibridizasyonları yapılarak alt türler tespit edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, Ocak 2004 - Aralık 2014 tarihleri arasında, laboratuvarımızda 220 hastadan (217 erişkin, 3 çocuk; 145 erkek, 75 kadın) izole edilen MTBC suşuna alt tür tayini yapılmıştır. MTBC izolatlarının streptomisin (STR), izoniazid (INH), rifampisin (RIF) ve etambutol (EMB)'e karşı direnç oranları sırasıyla %4.5 (n= 10), %11.8 (n= 26), %2.7 (n= 6) ve %2.7 (n= 6) olarak tespit edilmiştir.

GenoType MTBC testlerinin sonucunda, sadece iki alt tür (*Mycobacterium tuberculosis/M. canetti* ve *Mycobacterium bovis* subsp. *bovis*) tanımlanmıştır. Tüm izolatların yıllara ve alt türlere göre dağılımları Tablo 1'de; GenoType MTBC testlerinin sonuçları ise Resim 1'de verilmiştir. Çalışmamızda, son üç yılda izole edilen 106 suştan 3 (%2.8)'ünün *M. bovis* subsp. *bovis* olduğu, daha önceki yıllara ait 114 izolat arasında *M. bovis* subsp. *bovis*'in olmadığı görülmüştür (Tablo 1).

Resim 1. *M. tuberculosis* kompleks suşlarında yapılan GenoType MTBC96 testinin sonuçları (1, 2, 3, 4, 7, 9 ve 10. bantlarda pozitiflik *M. bovis* subsp. *bovis*; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8. bantlarda pozitiflik ise *M. tuberculosis/M. canetti* olarak kabul edilmektedir.)

Tablo I. *M.tuberculosis* kompleks (MTBC) suşlarının ve alt türlerinin yıllara göre dağılımı

Yıl	Toplam MTBC izolat sayısı	<i>M.tuberculosis/M.canetti</i> izolat sayısı	<i>M.bovis</i> subsp. <i>bovis</i> izolat sayısı
2004- 2009	49	49	-
2010	22	22	-
2011	43	43	-
2012	36	35	1
2013	38	37	1
2014	32	31	1
Toplam	220 (100)	217 (%98.6)	3 (% 1.4)

Çalışmamızda, *M.bovis* subsp. *bovis*'in tanımlandığı üç hastanın risk faktörleri, sosyo-demografik ve klinik özellikleri, tedavi süreç ve sonuçları ile laboratuvar bulguları daha ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir (Tablo II). Bunlardan birinci olgu, 30 yıldır diabetes mellitusu olan ve yedi yıldır kronik böbrek yetmezliği nedeniyle diyaliz yapılan, 63 yaşında bir kadın hastadır. Hastanın öyküsünden; büyükbaş hayvanları olduğu, süt ve süt ürünlerini kaynatıktan sonra tükettiği ve yakın temasta bulunduğu kişilerde tüberküloz

Tablo II. *M.bovis* subsp. *bovis* saptanan hastaların demografik, klinik ve laboratuvar özellikleri

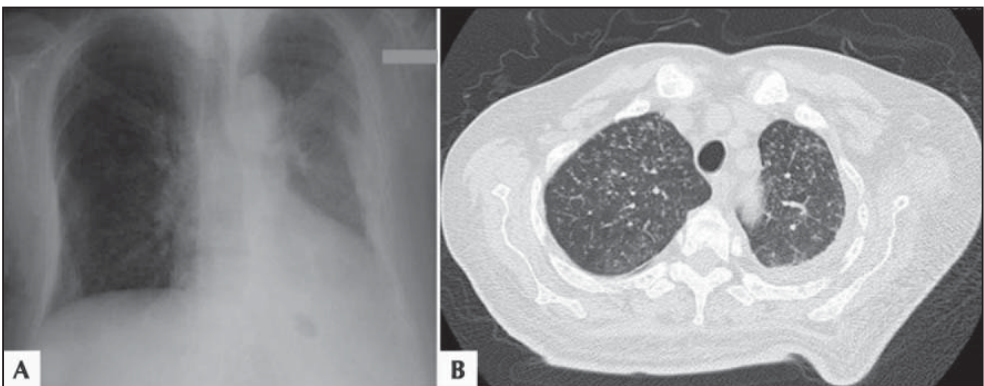
	Olgu 1	Olgu 2	Olgu 3
Cinsiyet/Yaş	K/63	E/85	K/27
Meslek	Ev hanımı, hayvancılık yapıyor	Çiftçi, hayvancılık yapıyor	Mevsimlik işçi, anamnez alınamadı
Hastalık tutulum yeri	Akciğer	Akciğer	Lenf bezi
Altta yatan hastalık	DM ve kronik böbrek yetmezliği	Prostat kanseri	Bilinmiyor
Aile içi temas	Yok	Yok	Bilinmiyor
Enfeksiyon tipi	Yeni	Yeni	Yeni
Bulgular	Balgam ARB: Negatif Balgam kültürü: MTBC üredi Akciğer grafisi: Mikronodüler görünüm	Balgam ARB: Negatif Balgam kültürü: MTBC üredi Akciğer grafisi: Sol alt zonda kalp kenarını silen homojen opasite gözlemlendi	Balgam örneği gelmedi Lenf bezi biyopsi örneği: MTBC üredi Akciğer grafisi: Yok
Tanı	Milier tüberküloz	Pulmoner tüberküloz	Lenf bezi tüberkülozu
Tedavi	INH, RIF, EMB, PZA (2 ay), INH ve RIF (4 ay)	INH, RIF, EMB, STR (2 ay) Başlangıç fazının sonunda hasta tedaviyi terk etti	INH, RIF, EMB, PZA (2 ay), INH ve RIF (4 ay)
Sonuç	Tedavi tamamlandı	Ölüm	Tedavi tamamlandı
Suşun, sırasıyla STR, INH, RIF, EMB, PZA* duyarlılığı	S, S, S, S, R	S, S, S, R, R	S, S, S, S, R

* Laboratuvarımızda PZA duyarlılık testi yapılması 2014 yılında başlamıştır. *M.bovis* subsp. *bovis* olarak tanımlanan suşlar geriye dönük olarak çalışılmış ve hepsi dirençli bulunmuştur. E: Erkek; K: Kadın; DM: Diabetes mellitus; MTBC: *M.tuberculosis* kompleksi; STR: Streptomisin; INH: Isoniazid, RIF: Rifampisin; EMB: Etambutol; PZA: Pirazinamid; S: Duyarlı; R: Dirençli.

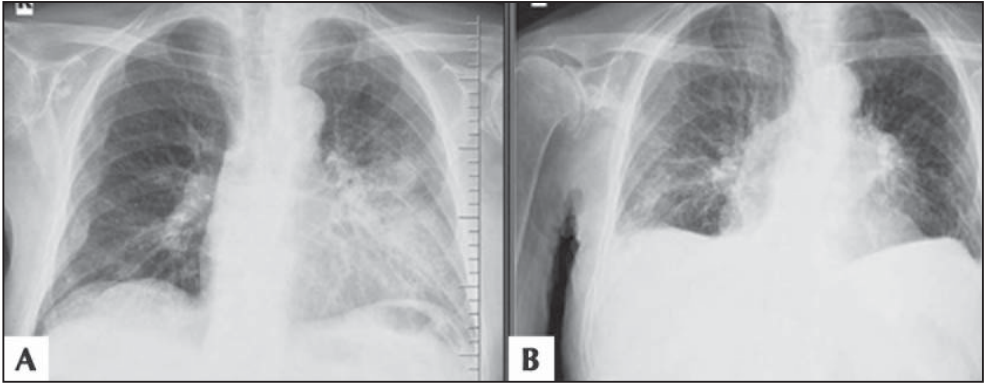
öyküsü olmadığı öğrenilmiştir. Hasta, 2012 yılında Düzce’de çeşitli acil servislere defalarca yüksek ateş nedeniyle başvurmuş ve özgül olmayan tedaviler almıştır. Temmuz 2012 tarihinde, mikobakteriyoloji laboratuvarımıza gelen tek bir balgam örneğinin mikroskopik incelemesinde aside dirençli basil (ARB) görülmemiş, ancak kültürde 15. günde üreme saptanmıştır. Kültürden yapılan Ziehl-Neelsen (ZN) boyamada kordonlu ARB görülmüş ve yapılan rutin testler ile MTBC üremesi kesinleşmiştir. Antibiyogram sonucunda izolat, STR, INH, RIF ve EMB’ye duyarlı olarak bulunmuştur. Hastaya milier tüberküloz tanısı ile Temmuz 2012’de INH, RIF, pirazinamid (PZA) ve EMB tedavisi başlanmış ve idame tedavisine INH+RIF ile devam edilerek tedavi 9 aya tamamlanmıştır. Hastanın kontrollerinde herhangi bir sorun saptanmamıştır. Bu olgunun tedavi öncesi posteroanterior akciğer grafisi ve toraks tomografisi Resim 2’de görülmektedir.

İkinci olgu, prostat kanseri tanısı alan 85 yaşında bir erkek hastadır. Bir yıl boyunca rezolüsyonu gecikmiş pnömoni tanısıyla takip edilen hasta, muhtemelen gecikmiş bir olgu olarak Aralık 2013 tarihinde hastanemize başvurmuş; hastadan üç ardışık gün alınan balgam örneği laboratuvarımıza gönderilmiştir. Balgamın ZN boyası ile yapılan direkt incelemesinde ARB görülmemiş; ancak kültürde 6. gün üreme saptanmış ve boyamasında kordonlu ARB tespit edilmiştir. Yapılan testlerle MTBC tanısı kesinleşmiş; antibiyotik duyarlılık testinde izolat, INH, RIF, STR’ye duyarlı, EMB’ye dirençli bulunmuştur. Mikrobiyolojik sonuçlar göğüs hastalıkları kliniğine bildirilmiş ve Sağlık Bakanlığı Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi 2011’e göre INH, RIF, EMB ve STR ile 2 aylık tedavi başlanmıştır. Tedavi takiplerinde klinik ve radyolojik iyileşmeye rağmen hasta 2 ay sonunda tedavisini almayı reddetmiş ve bir ay sonra hayatını kaybetmiştir. Hastanın tedavi öncesi ve sonrası posteroanterior akciğer grafileri Resim 3’de görülmektedir.

Üçüncü olgu, Eylül 2014’de Düzce’de mevsimlik işçi olarak bulunduğu sırada boyun-daki kitle nedeniyle hastaneye başvuran 27 yaşında bir kadın hastadır. Lenf bezi biyopsi örneğinden yapılan direkt incelemede ARB saptanmamış; ancak kültürde 11. günde üreme olmuş ve yapılan ZN boyamada kordonsuz ARB görülmüştür. Testler sonuçlandı-



Resim 2. (A) Olgu 1’e ait tedavi öncesi posteroanterior akciğer grafisinde, solda geçirilmiş travmaya sekonder kemik yapılarında değişiklikler ve akciğer hacminde küçülme, sağda alt zonda daha belirgin retikülonodüler infiltrasyon izlenmektedir. (B) Olgu 1’e ait toraks tomografisi kesitlerinde rastgele dağılımlı mikronodüler görünüm mevcuttur.



Resim 3. (A) Olgu 2' nin tedavi başlangıcındaki posteroanterior akciğer grafisinde solda kalp kontürlerini silerek periferie uzanan homojen opasite artışı izlenmektedir. (B) Tedavinin başlangıç fazı bittiğinde çekilen kontrol posteroanterior akciğer grafisinde opasitenin tama yakın gerilediği sol hiler alanda kalsifikasyonların oluştuğu görülmektedir.

ğında hastaya ulaşılamadığından özgeçmiş ve soygeçmiş sorgulanamamıştır. Hastanın aile hekimine ulaşılmış ve bilgi verilerek tedavi alması sağlanmıştır. Bir yıl sonra kendisini takip eden verem savaş dispanserinden alınan bilgiye göre ek hastalığı olmayan olgu, 2 ay INH+RIF+PZA+EMB ve 4 ay INH+RIF tedavisi almış; bu nedenle tedavisini tamamlamış olarak değerlendirilmiştir.

TARTIŞMA

Tüberküloz hastalarında *M.bovis* subsp. *bovis* enfeksiyon oranları ortalama olarak, gelişmiş ülkelerde %0.5, Afrika dışındaki bölgelerde %1.4, Afrika'da ise %2.8 olarak bildirilmektedir⁴⁻⁶. Bovin tip tüberküloz, enfekte süt ve ürünlerinin pastörize edilmeden tüketilmesi, hasta hayvan ve insanla (insandan insana bulaşma çok nadir olmakla birlikte) havalandırması yetersiz kapalı alanlarda uzun süreli yakın temas ile bulaşabilmektedir⁷⁻¹¹. Tüberküloz laboratuvarlarının rutin işlemleri sırasında *M.bovis* subsp. *bovis* genellikle gözden kaçmakta ve tanımlanamamaktadır. *M.bovis* subsp. *bovis* enfeksiyon riskini artıran çeşitli faktörler mevcuttur ve özellikle immün sistemi baskılanmış, akciğer dışı enfeksiyonu olan, esmer ırktan olan ve TB tanısı almış 15 yaşından küçük olan kişilerde *M.bovis* mutlaka araştırılmalıdır^{3,12-14}. Ayrıca, yapılan antibiyotik duyarlılık testinde sadece pirazinamide dirençli MTBC saptanması durumunda *M.bovis*'in düşünülmesi ve doğrulanması gerekmektedir¹⁵.

M.bovis subsp. *bovis* enfeksiyonlarının bağımsızlığı baskılanmış kişilerde daha sık görüldüğü bilinmektedir¹². Bizim çalışmamızda da, birinci ve ikinci olguda bağımsızlığı baskılayan hastalıkların olduğu görülmüş, ancak üçüncü olgu ile ilgili yeterince bilgi alınamamıştır (Tablo II). Çalışmamızda, *M.bovis* subsp. *bovis* ile enfekte hasta örneklerinin yayma preparatlarında ARB saptanmamış olmasına rağmen, MGIT kültürlerinde erken dönemde (ortalama 10.6 gün) üreme olmuştur. Oysa MTBC üremelerinde, laboratuvarımızda saptanan bu süre ortalama 14 ± 5.9 gündür. Yapılan çalışmalarda da, ARB negatif örneklerde bu sürenin 14 ± 2.8 gün arasında olduğu bildirilmektedir¹⁶. Bu üç olgunun hiçbirinde 45 gün içinde LJ besiyerinde üreme olmamıştır. Sıvı besiyerlerinden yapılan boyamada

iki örnekte (1. ve 2. olgu) kordonlu ARB görülmüşken, bir örnekte (3. olgu) kordonsuz ARB görülmesi dikkat çekicidir. Ülkemizden Aslan ve arkadaşlarının¹⁷ çalışmasında da, benzer olarak olguların immünoşüpresif olduğu ve MGIT besiyerindeki üremenin erken dönemde saptandığı rapor edilmiştir.

Çalışmamızda dikkat çeken diğer bir husus da, 10 yıllık bir süreçte üremiş olan MTBC suşlarının içinde sadece son üç yıla ait örneklerde *M.bovis* subsp. *bovis* saptanmış olmasıdır; bu durumun son yıllarda artan hayvan ithalatı ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Kaliforniya’da yapılan bir araştırmada, *M.bovis* enfeksiyon oranları 2003’de %3.4 iken 2011’de %5.4’e çıkmıştır¹⁸. Bu olguların da büyük oranda immünoşüpresif ek hastalıkları olduğu, esmer ırktan oldukları, 1/4’ünün çocuk olduğu ve akciğer dışı yerleşimli olgular oldukları belirtilmiştir¹⁸. Araştırmacılar, son yıllarda bovin tip tüberküloz sayısındaki artışın, Meksika’daki enfeksiyonlar ve göçmenlikle ilişkili olduğunu vurgulamışlardır¹⁸. Bizim olgularımızın da bu çalışma ile benzer yönleri vardır; ancak Kaliforniya’daki olguların arasında çocuk hastaların bulunması dikkat çekmişken, bizim hastalarımız arasında çocuk hasta bulunmamaktadır. Bunun nedeninin, çalışmamızdaki tüberkülozlu çocuk sayısının çok az olması (n= 3) ya da bölgemizde çocuk tüberkülozunun gözden kaçırılması ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Sonuç olarak, risk faktörleri olan tüberkülozlu hastalar, sıvı besiyerinde erken üreme saptanması ve sadece pirazinamide dirençli MTBC üremesi durumunda *M.bovis* subsp. *bovis* enfeksiyonu yönünden mutlaka araştırılmalı, bovin tip tüberkülozun artış nedenleri de tekrar gözden geçirilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Grange JM, Yates MD, de Kantor. Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. 1996, 2nd ed. WHO/EMC/ZOO/96. 4. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/65508/1/WHO_EMZ_ZOO_96.4.pdf
2. Taylor GM, Murphy E, Hopkins R, Rutland P, Chistov Y. First report of *Mycobacterium bovis* DNA in human remains from the Iron Age. *Microbiology* 2007; 153(Pt 4): 1243-9.
3. Portillo-Gómez L, Sosa-Iglesias EG. Molecular identification of *Mycobacterium bovis* and the importance of zoonotic tuberculosis in Mexican patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15(10): 1409-14.
4. Müller B, Dürr S, Alonso S, et al. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis* 2013; 19(6): 899-908.
5. Health Protection Agency. Tuberculosis in the UK: Annual report on tuberculosis surveillance in the UK 2012. Available at: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/332560/TB_Annual_Report_2012.pdf
6. Hlavsa MC, Moonan PK, Cowan LS, et al. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. *Clin Infect Dis* 2008; 47(2):168-75.
7. Cordova E, Gonzalo X, Boschi A, et al. Human *Mycobacterium bovis* infection in Buenos Aires: epidemiology, microbiology and clinical presentation. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012; 16(3): 415-7.
8. Torres-Gonzalez P, Soberanis-Ramos O, Martinez-Gamboa A, et al. Prevalence of latent and active tuberculosis among dairy farm workers exposed to cattle infected by *Mycobacterium bovis*. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7(4): e2177.
9. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*--New York City, 2001-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2005; 54(24): 605-8.
10. Evans JT, Smith EG, Banerjee A, et al. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet* 2007; 369(9569): 1270-6.

11. Talbot EA. *Mycobacterium bovis*. UpToDate, 2015. Available at: <http://www.uptodate.com/contents/mycobacterium-bovis>
12. Park D, Qin H, Jain S, et al. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in patients coinfecting with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 2010; 51(11): 1343-6.
13. Majoor CJ, Magis-Escurra C, van Ingen J, Boeree MJ, van Soolingen D. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in humans, The Netherlands, 1993-2007. Emerg Infect Dis 2011; 17(3): 457-63.
14. Rodwell TC, Moore M, Moser KS, Brodine SK, Strathdee SA. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. Emerg Infect Dis 2008; 14(6):909-16.
15. Kurbatova EV, Cavanaugh JS, Dalton T, Click ES, Cegielski JP. Epidemiology of pyrazinamide-resistant tuberculosis in the United States, 1999-2009. Clin Infect Dis 2013; 57(8):1081-93.
16. Saygun M, Göçmen S, Çakmak A, et al. Isolation frequency of *Mycobacterium tuberculosis* in tertiary reference hospital and their susceptibility patterns against four major anti-tuberculosis drugs. J Clin Exp Invest 2012; 3(2): 240-4.
17. Aslan G, Kuyucu N, Çalikoğlu M ve ark. *Mycobacterium bovis*'in etken olduğu tüberküloz olguları, Ankem Derg 2009; 23(4): 182-7.
18. Gallivan M, Shah N, Flood J. Epidemiology of human *Mycobacterium bovis* disease, California, USA, 2003-2011. Emerg Infect Dis 2015; 21(3): 435-43.