

Ege Bölgesi'nde İnsan *Mycobacterium bovis* Enfeksiyonlarının Moleküler Epidemiyolojisi

Molecular Epidemiology of Human *Mycobacterium bovis* Infection in Aegean Region, Turkey

Cengiz ÇAVUŞOĞLU¹, Fethiye Ferda YILMAZ²

¹ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

¹ Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Izmir, Turkey.

² Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

² Ege University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Izmir, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 26.12.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 04.01.2017

ÖZ

Genellikle insanlarda hastalık etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis*'ten farklı olarak daha geniş konak spektrumuna sahip olan *Mycobacterium bovis* başta sığırlar olmak üzere çok sayıda evcil ve vahşi memeli türünde temel olarak kronik ilerleyici akciğer hastalığına yol açmaktadır. İnsanlardaki *M.bovis* enfeksiyonunu tanımlamak için "zoonotik tüberküloz (TB)" terimi kullanılmaktadır. Zoonotik TB klinik, radyolojik veya patolojik olarak *M.tuberculosis*'in etken olduğu TB'den ayrılmamaktadır. Bu çalışmada, Ege Bölgesinde insan TB epidemiyolojisinde *M.bovis*'in rolünün değerlendirilmesi ve insan TB'den sorumlu *M.bovis* genotiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarına 2009-2014 yılları arasında rutin mikobakteriyolojik inceleme amacıyla yollanan klinik örneklerden üretilen 482 *M.tuberculosis* kompleks izolatından spoligotiplendirme ile tanımlanan 13 *M.bovis* izolatı alınmıştır. İzolatların ilaç duyarlılık testleri BACTEC MGIT 960 otomatize sistem ile yapılmıştır. Çalışmada spoligotiplendirmesi yapılan 13 *M.bovis* izolatından 9 (%63.6)'unun ST685 (SB0288), 1 (%7.7)'inin ST1118 (SB0989), 1 (%7.7)'inin ST820 (SB0856) olduğu belirlenmiş, iki izolat için SpolDB4 ve Mbovis.org veritabanında kayıtlı suş bulunamamıştır. İzolatların tümünün birinci seçenek antitüberküloz ilaçlara duyarlı olduğu saptanmıştır. Çalışmada incelenen 13 *M.bovis* izolatının aynı dönem içinde spoligotiplendirmesi yapılan 482 *M.tuberculosis* kompleks izolatının %2.7'sini oluşturduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada 13 hastadan 8 (%61.5)'inin erkek, 5 (%38.5)'inin kadın olduğu, hastaların 9 (%69.2)'unda akciğer, 4 (%30.8)'ünde akciğer dışı TB olduğu saptanmıştır. Akciğer TB saptanan dokuz hastadan yedisinin, akciğer dışı TB saptanan dört hastadan ikisinin kırsal bölgede yaşadığı ve akciğer TB olan iki hastada mesleki maruziyet olduğu olduğu belirlenmiştir. ST683 (SB0140), insan izolatları arasında dünyada yaygın olarak görülmesine rağmen, bu çalışmada ve Türkiye'de yapılan diğer çalışmalarda saptanmamıştır. Çalışmamızda farklı olarak dünyada çok az sayıda bildirim yapılmış olan ST685 (SB0288) ve ST1118 (SB0989) tipleri baskın olarak bulunmuştur. Bu bulgu söz konusu tiplerin

İletişim (Correspondence): Yrd. Doç. Dr. Fethiye Ferda Yılmaz, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir, Türkiye.
Tel (Phone): +90 232 311 3283, E-posta (E-mail): fetferday@gmail.com

Anadolu'da ortaya çıkan özgün spoligotipler olabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak ülkemizde zoonotik TB'nin insan TB'si içindeki yerinin tam olarak saptanması, zoonotik TB enfeksiyonlarının insanlara bulaşma yollarının ve risk faktörlerinin belirlenmesi, insan ve hayvanlar arasındaki baskın tiplerin saptanması ve ülkemizdeki suşların filocoğrafik ilişkisinin anlaşılabilmesi için tıp ve veterinerlik alanlarında çalışan araştırmacıların ortaklaşa yürütecekleri moleküler epidemiyoloji çalışmalarına gereksinim vardır.

Anahtar sözcükler: *Mycobacterium bovis*; spoligotiplendirme; moleküler epidemiyoloji; insan tüberkülozu.

ABSTRACT

Mycobacterium bovis, which has a broader host spectrum as opposed to *Mycobacterium tuberculosis* that generally causes disease in humans, mainly leads to chronic progressive pulmonary disease in a large number of domestic and wild mammals, particularly cattle. The term "zoonotic tuberculosis (TB)" is used to describe *M.bovis* infection in humans. "Zoonotic TB" can not be differentiated clinically, radiologically or pathologically from TB caused by *M.tuberculosis*. The aim of this study was to evaluate the role of *M.bovis* in epidemiology of human TB in Aegean Region, Turkey and to determine *M.bovis* genotypes responsible for human TB. Thirteen *M.bovis* isolates identified by spoligotyping from 482 *M.tuberculosis* complex isolates obtained from clinical specimens sent for routine mycobacteriological examination to the Mycobacteriology Laboratory in Medical Microbiology Department of Ege University Faculty of Medicine Hospital between 2009 and 2014 were included in the study. Drug susceptibility tests of the isolates were performed by the BACTEC MGIT 960 automated system. It was determined that 9 (63.6%) of the 13 spoligotyped *M.bovis* isolates in this study were ST685 (SB0288), 1 (7.7%) was ST 1118 (SB0989) and 1 (7.7%) was ST820 (SB0856), for two isolates there were no registered data in SpolDB4 and Mbovis.org databases. All the isolates were susceptible to first-line antituberculosis drugs. It was determined that 13 *M.bovis* isolates examined in the study accounted for 2.7% of the 482 *M.tuberculosis* complex isolates spoligotyped in the same period. In this study, it was determined that 8 (%61.5) of 13 patients was male, 5 (38.5%) of them was female, 9 (69.2%) of the 13 patients had pulmonary TB and 4 (30.8%) had extra pulmonary TB. Seven of nine patients with pulmonary TB and two of the four patients with extrapulmonary TB were living in the rural area, and two patients with pulmonary TB had occupational exposure. Although ST683 (SB0140) is widely seen in the world among human isolates, it was not detected in this study and other studies conducted in Turkey. In contrast, ST685 (SB0288) and ST1118 (SB0989), which have been reported very few in the world, found to be predominant in this study. This result suggested that they may be unique spoligotypes emerging in Anatolia. In conclusion, collaborative molecular epidemiological studies are needed in conjunction with researchers working in medicine and veterinary fields to determine precisely the importance of zoonotic TB in human TB in our country, to determine the route of transmission to humans and risk factors for zoonotic TB infections, to identify the dominant types between humans and animals and to understand the phylogeographic relationships of the strains in our country.

Keywords: *Mycobacterium bovis*; spoligotyping; molecular epidemiology; human tuberculosis.

GİRİŞ

Genellikle insanlarda hastalık etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis*'ten farklı olarak daha geniş konak spektrumuna sahip olan *Mycobacterium bovis* başta sığırlar olmak üzere çok sayıda evcil ve vahşi memeli türünde temel olarak kronik ilerleyici akciğer hastalığına yol açmaktadır. Bakterinin gerçek doğal konağı olan evcil inekler, insanlar ve diğer hayvanlar için rezervuar görevi görmektedir. Buna karşın keçiler, domuzlar, kediler, köpekler ve devegiller de insanlar için enfeksiyon kaynağı olabilmektedir¹. İnsan enfeksiyon için önemli bir kaynak olmamasına karşın, çoğunlukla insan immünyetmezlik virusu

(HIV) pozitif hastalarda insandan insana çok ilaca dirençli *M.bovis* bulaşı tanımlanmıştır. İnsanlardaki *M.bovis* enfeksiyonunu tanımlamak için “zoonotik tüberküloz (TB)” terimi kullanılmaktadır. Zoonotik TB klinik, radyolojik ve patolojik olarak *M.tuberculosis*'in etken olduğu TB'den ayrılammaktadır²⁻⁵.

İnsan TB olguları içinde *M.bovis* enfeksiyonlarının ortalama oranı Avrupa'da %0.4, Afrika dışındaki ülkelerde < %1.4, Afrika'da ise %2.8 olarak bildirilmiştir. Afrika dışındaki tüm bölgelerde zoonotik TB insidans oranlarının 1/100.000 ya da altında olduğu, Afrika'da 7/100.000 dolayında olduğu düşünülmektedir⁶.

M.bovis insana intestinal yolla, aerosollerin solunmasıyla, derideki kesiklerden ve mukozalardan doğrudan temas yoluyla bulaşmaktadır. Pastörize edilmemiş kontamine süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi, sığır TB'nin yaygın olduğu bölgelerde hastalığın insanlara temel bulaşma yoludur. Süt kaynaklı intestinal bulaşmaya bağlı *M.bovis* enfeksiyonu servikal lenfadenit, intestinal lezyonlar ve diğer ekstrapulmoner TB formlarının önemli nedenidir. Hayvancılıkla ilgili meslek gruplarında solunum yoluyla bulaş olabilmekte ve bu tip olgularda solunum yolu enfeksiyonu gelişmektedir. Ayrıca, bu meslek gruplarında deri ve mukozalardan da bulaş olabilmektedir^{1,7}.

Bu çalışmada, Ege Bölgesinde insan TB epidemiyolojisinde *M.bovis*'in rolünün değerlendirilmesi ve insan TB'den sorumlu *M.bovis* genotiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteri İzolatları

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarına 2009-2014 yılları arasında rutin mikobakteriyolojik inceleme amacıyla yollanan klinik örneklerden üretilen *M.tuberculosis* kompleks izolatlarından sporigotiplendirme ve GenoTypeMTBC ile tanımlanan 13 *M.bovis* izolatı çalışmaya alındı.

Hasta Bilgileri

Çalışmaya alınan hastalara ilişkin veriler Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı kayıtlarından ve hastane veri tabanında kayıtlı hasta bilgilerinden elde edildi.

Bakterilerin Tanımlanması

İzolatların tanımlanması GenoTypeMTBC (Hain Life Science) test kiti ile üreticinin önerileri doğrultusunda yapıldı. Kısaca; kültürde üretilen izolatlardan DNA izolasyonu yapıp, ardından biyotinle işaretlenmiş primerler kullanılarak hedef bölge amplifiye edildi. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ürünleri membrana bağlanmış problarla hibridize edildi, oluşan hibritler konjugat ve substrat eklenerek boyanmış bantlar olarak görünür hale getirildi. Oluşan bant paternleri kit için kullanılması gereken değerlendirme kartı yardımıyla değerlendirildi. 1, 2, 3, 4, 7, 9 ve 10 numaralı bantlarda hibridizasyon saptanması *M.bovis* olarak tanımlandı.

İzolatların Genotiplendirmesi

Bu amaçla spoligotiplendirme yöntemi kullanıldı. Uygulama spoligotiplendirme için hazırlanmış kit (Spoligotyping Kit; IsogenLifeScience, Hollanda) üreticisinin tanımladığı şekilde gerçekleştirildi. Kısaca; kültürde üretilen izolatlardan elde edilen DNA'nın 5 µl'si PCR işleminde kalıp DNA olarak kullanıldı. DR dizisini hedef alan biyotinle işaretli primerler kullanılarak DR bölgeleri arasındaki "spacer"lar amplifiye edildi. Amplifiye olmuş PCR ürünü mini blotter yardımıyla oligonükleotit bağlı bulunan nitroselüloz membran ile hibridize edildi. Membranda hibridize olmuş "spacer"lar HRP-konjugat ve substratla inkübe edildikten sonra membran X-ray filmiyle muamele edildi ve hibridize olan "spacer"lar karecikler olarak görünür hale getirildi. Hibridize olmuş "spacer"ın varlığı pozitif sinyal, "spacer" hibridizasyonunun olmaması ise negatif sinyal olarak değerlendirildi. Elde edilen spoligotipler <http://www.pasteur-guadeloupe.fr> adresindeki SpolDB4 ve <http://www.mbovis.org> adresindeki Mbovis.org spoligotiplendirme veri tabanında bulunan kayıtlı suşlarla karşılaştırıldı^{8,9}.

Duyarlılık Testleri

İzolatların duyarlılık testleri BACTEC MGIT 960 (BD Spark, ABD) otomatize sıvı sistemi kullanılarak yapıldı. Direnç sınır değerleri rifampisin için 1.0 µg/ml, izoniyazid için 0.1 µg/ml, streptomisin için 1.0 µg/ml ve etambutol için 5.0 µg/ml olarak kabul edildi¹⁰.

BULGULAR

Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, incelenen 13 *M.bovis* izolatının birinci seçeneğe antitüberküloz ilaçlara duyarlı olduğu görülmüştür. Bu izolatların spoligotiplendirilmesi sonucu ise 9 (%63.6)'unun ST685 (SB0288), 1 (%7.7)'inin ST1118 (SB0989), 1 (%7.7)'inin ST820 (SB0856) olduğu saptanmış, iki izolat için SpolDB4 ve Mbovis.org veri tabanında kayıtlı suş bulunamamıştır. Çalışmaya alınan 13 *M.bovis* izolatının, aynı dönem içinde Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde klinik örneklerden soyutlanan 482 *M.tuberculosis* kompleks izolatının %2.7'sini oluşturduğu belirlenmiştir. Hasta profiline bakıldığında, klinik örneklerinden *M.bovis* izole edilen toplam 13 hastadan 8 (%61.5)'inin erkek, 5 (%38.5)'inin kadın olduğu, bu hastaların 9 (%69.2)'unda akciğer, 4 (%30.8)'ünde akciğer dışı TB olduğu ve akciğer TB saptanan dokuz hastadan yedisinin, akciğer dışı TB saptanan dört hastadan ikisinin kırsal bölgede yaşadığı, akciğer TB saptanan iki hastada ise mesleki maruziyet olduğu belirlenmiştir. Çalışmada değerlendirilen *M.bovis* izolatlarının spoligotip dağılımları ve izole edildikleri hastaların özellikleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

TARTIŞMA

Çalışmada spoligotiplendirmesi yapılan 13 *M.bovis* izolatının 9 (%63.6)'unda saptanan ST685 (SB0288)'in en baskın spoligotip olduğu belirlenmiştir. İstanbul'da yapılan başka bir çalışmada 43 insan kaynaklı *M.bovis* izolatının 15 (%34.9)'ünde, Ankara'da yapılan başka bir çalışmada ise dokuz izolatın 5 (%55.6)'ünde saptanmış olan ST685 (SB0288) tipi İstanbul ve Ankara'da da en baskın spoligotip olarak bulunmuştur^{11,12}.

SpolDB4 veri tabanına yapılmış 1899 adet bildirimle ST683 (SB0140) dünya üzerinde en yaygın görülen spoligotip olmasına karşın, aynı veri tabanında ST685 (SB0288) için 12 adet, ST1118 (SB0989) için üç adet bildirim yapılmıştır⁸. Bizim çalışmamızda insan izolatlarında dünyada yaygın olarak görülen ST683 (SB0140) saptanmazken, dünyada çok az sayıda bildirim yapılmış olan ST685 (SB0288) ve ST1118 (SB0989)'in baskın olarak bulunması bu tiplerin Anadolu'da ortaya çıkan ülkemize özgü spoligotipler olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan çalışmalarda belli bir coğrafi bölgede, insan ve hayvanlarda en sık rastlanan *M.bovis* ve *M.caprae* spoligotiplerinin büyük oranda benzer olduğu gösterilmiştir^{2,3}. Ege Bölgesindeki çiftlik hayvanlarından izole edilen altı *M.bovis* izolatının tümünün, Ege Bölgesindeki insan kaynaklı *M.bovis* izolatlarında en çok karşılaşılan ST685 (SB0288) spoligotipi olduğu belirlenmiştir¹³. Bu bulgu Ege Bölgesindeki insanlardan ve hayvanlardan soyutlanan *M.bovis* izolatlarının genotiplerinin benzer dağılım gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Kırsal bölgede yaşama, mesleki maruziyet ve pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi zoonotik TB için risk faktörleridir^{1,7}. Bizim çalışmamızda 13 hastanın 9 (%69.2)'unda akciğer TB saptanmış, bu olguların ikisinde mesleki maruziyet olduğu ve yedi hastanın kırsal bölgede yaşadığı belirlenmiştir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde dünyada yapılan çalışmalarda *M.bovis*'e bağlı akciğer TB'nin oranı Arjantin'de %74, Fransa'da %53-71.6, İngiltere'de %40, Almanya'da %73.7, Yeni Zelanda'da %56.7, İspanya'da %50, ABD'de %52 olarak saptanmıştır^{2,5,7,14}. Buna karşın İstanbul'da yapılan bir çalışmada yedi *M.bovis* enfeksiyonunun tümünün akciğer dışı TB olduğu belirlenmiştir¹². Tüm TB olguları içinde zoonotik TB oranı İspanya'da %2.2, Fransa'da

Tablo 1. *M.bovis* İzolatlarının Spoligotip Dağılımları ve Hastaların Özellikleri

Hasta no	Oktal kod	SpolDb4	Mbovis.org	Yaş	Cinsiyet	ARB*	Enfeksiyon bölgesi
1	674073777777600	ST 685	SB0288	49	E	+	Akciğer TB
2	674073777777600	ST 685	SB0288	34	K	+	Akciğer TB
3	674073777777600	ST 685	SB0288	26	E	+	Akciğer TB
4	674073777777600	ST 685	SB0288	75	E	-	Akciğer TB
5	674073777777600	ST 685	SB0288	66	E	+	Akciğer TB
6	674073777777600	ST 685	SB0288	46	E	-	Akciğer TB
7	674073777777600	ST 685	SB0288	10	E	+	Servikal lenfadenit
8	674073777777600	ST685	SB0288	30	K	-	Vertebral osteomyelit
9	674073777777600	ST 685	SB0288	11	K	-	Üriner TB
10	676673757777600	ST 1118	SB0989	25	E	+	Akciğer TB
11	676763777777600	ST 820	SB0856	86	K	+	Akciğer TB
12	674073737777600	-	-	36	E	+	Akciğer TB
13	674073677777600	-	-	71	K	-	Servikal lenfadenit

* ARB: Asidorezistan boyanan basil; TB: Tüberküloz.

%2.9, Avusturya'da %0.85-0.94, Almanya'da %1.08, Türkiye'de %1.31-5.85 olarak bildirilmiştir¹¹. Bizim çalışmamızda saptanan %2.7'lik oranın İspanya ve Fransa ile benzer Orta Avrupa'dan daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak ülkemizde zoonotik TB'nin insan TB'si içindeki yerinin saptanması zoonotik TB enfeksiyonlarının insanlara bulaşma yollarının ve bulaşma için risk faktörlerinin belirlenmesi, insan ve hayvanlar arasındaki baskın tiplerin tanımlanması ve ülkemizdeki suşların filocoğrafik ilişkisinin anlaşılabilmesi için tıp ve veterinerlik alanlarında çalışan araştırmacıların ortaklaşa yürütecekleri moleküler epidemiyoloji çalışmalarına gereksinim vardır.

TEŞEKKÜR

Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğüne maddi desteklerinden dolayı teşekkür ederiz (BAP Proje No.: 2010-TIP-022). Ayrıca Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı çalışanı Sağlık Teknikeri Şenay YILDIRIM'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. de la Rua-Domenech R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 2006; 86(2): 77-109.
2. 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.
3. Etchechoury I, Valencia GE, Morcillo N, et al. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates in Argentina: first description of a person-to-person transmission case. *Zoonoses Public Health* 2010; 57(6): 375-81.
4. Wei CY, Hsu YH, Chou WJ, Lee CP, Tsao WL. Molecular and histopathologic evidence for systemic infection by *Mycobacterium bovis* in a patient with tuberculous enteritis, peritonitis, and meningitis: a case report. *Kaohsiung J Med Sci* 2004; 20(6): 302-7.
5. Baker MG, Lopez LD, Cannon MC, De Lisle GW, Collins DM. Continuing *Mycobacterium bovis* transmission from animals to humans in New Zealand. *Epidemiol Infect* 2006; 134(5): 1068-73.
6. Müller B, Dürr S, Alonso S, et al. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis* 2013; 19(6): 899-908.
7. 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.
8. Pang Y, Zhou Y, Zhao B, et al. Spoligotyping and drug resistance analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from national survey in China. *PLoS ONE* 2012; 7(3): e32976.
9. Parreiras PM, Andrade GI, Nascimento TF, et al. Spoligotyping and variable number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107(1): 64-73.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic Actinomycetes. Approved Standard M24-A2, Second Edition, 2011. *CLSI*, Wayne, PA.
11. Prodingler WM, Indra A, Koksalan OK, Kilicaslan Z, Richter E. *Mycobacterium caprae* infection in humans. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014; 12(12): 1501-13.
12. Bayraktar B, Bulut E, Bariş AB, et al. Species distribution of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates from 2007 to 2010 in Turkey: a prospective study. *J Clin Microbiol* 2011; 49(11): 3837-41.
13. Avsever ML, Çavuşoğlu C, Yazıcıoğlu Ö, et al. New spoligotyping pattern of *Mycobacterium bovis* isolates from farm animals in Turkey. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2017; 64(1): 37-43.
14. Robert J, Boulahbal F, Trystram D, et al. A national survey of human *Mycobacterium bovis* infection in France. Network of Microbiology Laboratories in France. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3(8): 711-4.