

## Düzce İlinde Çiğ Süt Örneklerinde *Mycobacterium Bovis* Aranması

Özge KILINÇEL<sup>1</sup>, Onur Efe ÇELİK<sup>2</sup>, Aytulun AYTAN<sup>2</sup>, İlknur ALKAN<sup>3</sup>, İbrahim Bahadır AYVAZ<sup>2</sup>, Cihadıye Elif ÖZTÜRK<sup>3</sup>

### ÖZ

**Amaç:** *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) kaynaklı insan tüberkülozu özellikle gelişmekte olan ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorunudur. *M. bovis* enfeksiyonları çoğunlukla hayvandan insana, çok nadiren de insandan insana bulaşabilmektedir. Bulaşma kontamine sütlerin çiğ olarak tüketilmesi ve kontamine aerosollerin solunması ile gerçekleşmektedir. Bölgemizde daha önce yapılan bir araştırmada *M. bovis* enfeksiyonlu tüberküloz olguları saptanmıştır. Bu nedenle, çalışmamızda, çiğ sığır sütü örneklerinde *M. bovis* varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışmada, 12-19 Mayıs 2017 tarihleri arasında Düzce ilindeki beş köyde bulunan 100 ayrı sığırdan rastgele olarak toplanan çiğ süt örneği incelenmiştir. Bu örneklerde mikobakteri varlığı Ehrlich-Ziehl-Neelsen boyama yöntemi, Löwenstein-Jensen agar, Middlebrook 7H11 agar ve Mycobacteria Growth Indicator Tube besi yerinde kültür yapılarak araştırılmıştır. Aside dirençli basil görülmesi durumunda konvansiyonel ve moleküler yöntemler ile tiplendirme yapılması planlanmıştır. Ayrıca hayvanların bakım şartları da kaydedilmiştir.

**Bulgular:** İnkübasyonu tamamlanan besiyerlerinde, 22 ayrı süt örneğinde saptanan kolonilerden Ehrlich-Ziehl-Neelsen ve Gram boyama sonucu hiçbirinde aside dirençli basil saptanmamıştır. Kontaminant olarak değerlendirilen Gram pozitif basil, kok ve maya üremesi saptanmıştır. Hayvanların ahırlarda ortalama 2-5'li olarak genellikle de temiz bir şekilde bakıldığı gözlenmiştir.

**Sonuç:** Sonuç olarak ilimizde köylerde yetiştirilerek sütü kullanılan sığırların bakımlarının iyi olduğu ve sütlerin de *Mycobacterium* içermediği gözlenmiştir. Bölgede daha önce saptanan *M. bovis* olgularının olmasından dolayı çalışmanın besi hayvanlarında da yapılmasının gerektiği düşünülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** *Mycobacterium bovis*; süt; tüberküloz.

### The Investigation of *Mycobacterium Bovis* in Raw Milk Samples in Düzce Province

### ABSTRACT

**Aim:** Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) is an important public health problem, especially in developing countries. *M. bovis* infections are often transmit from animal to human, rarely human to human. Contamination is achieved by raw consumption of contaminating milk and by the inhalation of contaminant aerosols. Tuberculosis cases caused by *M. bovis* were detected in a previous study conducted in our region. Therefore, it was aimed to investigate the presence of *M. bovis* in raw cattle milk samples in our study.

**Materials and Methods:** In the study, raw milk sample collected randomly from 100 different cattle from five villages in Düzce province were examined, between 12-19 May 2017. Mycobacteria was investigated by Ehrlich-Ziehl-Neelsen staining method, culture on Löwenstein-Jensen agar, Middlebrook 7H11 agar and Mycobacteria Growth Indicator Tube medium, in these samples. In the case of presence of acid-resistant bacilli, it is planned to classify by conventional and molecular methods. Further, the maintenance conditions of cattle were observed.

**Results:** When the incubation was complete, no acid-resistant bacilli were found in any of the colonies detected in 22 different milk samples, by Ehrlich-Ziehl-Neelsen and Gram stain. Gram positive bacilli, cocci and yeast were detected as contaminants. It was observed that the cattle in the ranch were in proper conditions.

**Conclusion:** As a result, it was observed that the maintenance of the cattle was good in the villages in our province and cattle milks did not contain *Mycobacterium*. Because of the *M. bovis* cases previously identified in the region, it was thought that the study should be carried out in the fattening cattle as well.

**Keywords:** *Mycobacterium bovis*; milk; tuberculosis.

1 Düzce Atatürk Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı

2 Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi

3 Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Özge KILINÇEL, ozgekilincel@gmail.com

Geliş Tarihi / Received: 26.06.2018 Kabul Tarihi / Accepted: 29.08.2018

## GİRİŞ

*Mycobacterium* cinsinde yaklaşık 250 tür bulunmakta olup insanlar açısından en sık enfeksiyon etkeni olanlar *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBC) içinde yer alır. Bu grupta insanlarda en sık tüberküloz yapan tür *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *tuberculosis* ve ikinci sırada ise *Mycobacterium bovis* subsp. *bovis* olduğu bilinmektedir (1). *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) sığırlarda tüberküloza bağlı olarak pnömoni, mastitis, deri altı apseleri, merkezi sinir sistemi ve genital sistem enfeksiyonlarına neden olmaktadır (2). *M. bovis* enfeksiyonları çoğunlukla hayvandan insana, çok nadiren de insandan insana bulaşabilmektedir. Bulaşma kontamine sütlerin çiğ olarak tüketilmesi ve kontamine aerosollerin solunması ile gerçekleşmektedir (3).

Sığır tüberkülozunun hayvanlar arasındaki yaygınlığının araştırılması için planlanan çalışmamızda, Düzce ilinin çeşitli köylerinden toplanan çiğ sığır sütü örneklerinde *M. bovis* varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma kapsamında, 12-19 Mayıs 2017 tarihleri arasında Düzce ilinde beş köyde bulunan 100 ayrı sığırdan rastgele olarak toplanan çiğ süt örneği aseptik koşullarda 50 ml'lik steril falcon tüplerine direkt olarak sağılma sırasında alınmıştır. Örnekler soğuk zincirde yaklaşık 2-3 saat içinde Düzce Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na getirilerek, 15 dakika 4000xg'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası kaymak ve pellet tabakaları ayrı ayrı %3'lük sodyum hidroksit tri-sodyum sitrat (Salubris, ABD) ile dekontamine edilmiş ve steril fosfat tampon ile nötralizasyon ve homojenizasyon yapılmıştır. Hem pellet hem de kaymak örneklerinden yayma hazırlanmış ve Ehrlich- Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemiyle boyanarak aside dirençli basil varlığı aranmıştır. Mikobakterilerin tanısında mikrobiyolojik kültür altın standart kabul edildiği için; izolasyon amacıyla pellet ve kaymak örneklerinin ayrı ayrı gliserinsiz Löwenstein-Jensen agar (Salubris, ABD), gliserinsiz Middlebrook 7H11 agar (HiMedia, Hindistan) ve *Mycobacteria Growth Indicator Tube* (Becton Dickinson, ABD) besiyerlerine ekimi yapılmış ve sekiz hafta boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir (4). Haftalık kontrollerle üreme varlığı araştırılmıştır.

Üreme saptanan besiyerlerinden şüpheli kolonilerden EZN ve Gram boyaları yapılmıştır. Aside dirençli basil görülmesi durumunda konvansiyonel ve moleküler yöntemler ile tiplendirme yapılması planlanmıştır. Çalışma sırasında daha önce laboratuvarımızda izole edilmiş olan *M. bovis* suşu da pozitif kontrol olarak aynı koşullarda boyanmış ve kültürü yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar sayı ve yüzde şeklinde belirtilmiştir.

## BULGULAR

Homojenizasyon-dekontaminasyon işlemi sonrası hazırlanan kaymak ve pellet yaymalardan EZN yöntemiyle boyama sonucunda hiçbir örnekte aside dirençli basil varlığı tespit edilmemiştir. Örneklerin 12'sinde (%12) Gram pozitif basil, kok ve mayalar görülmüştür. İnkübasyonu tamamlanan besiyerlerinde, 22 (%22) ayrı süt örneğinde saptanan kolonilerden EZN ve Gram boyama sonucu hiçbirinde aside dirençli basil

saptanmamıştır; kontaminant olarak değerlendirilen Gram pozitif basil, kok ve maya üremesi saptanmıştır.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

*M. bovis*, insan tüberkülozunun ana nedeni olmamasına rağmen, bu türün etken olduğu insan enfeksiyonları giderek artmaktadır. İnsanlar esas olarak enfekte sığırlardan elde edilen çiğ sütün tüketimi ile enfekte olmaktadır (5). Dünya çapında 2015 yılında 13.000 vakaya ulaşan global ölüm oranıyla 149.000 zoonotik tüberküloz vakası meydana gelmiştir (6). Türkiye'de ise zoonotik tüberküloz olgu prevalansını gösteren epidemiyolojik veriler yetersiz kalmaktadır.

Thakur ve ark. (7) sığırlarda *M. bovis* kaynaklı tüberküloz prevalansını araştırdıkları çalışmada topladıkları süt örneklerinin hiçbirinde *M. bovis* saptanmamışlardır. Başka bir çalışmada ise örneklerin %16'sında *M. bovis* izole edilmiştir (8). Raffo ve ark. (9) örneklerin %37,6'sında, Srivastava ve ark. (10) %5,2'sinde, Lamuka ve ark. (11) ise %3,6'sında *M. bovis* saptamışlardır. Toplam 805 çiğ süt örneğinin incelendiği bir çalışmada ise örneklerin %0,2'sinde *M. bovis* tespit etmişlerdir (12). Dünya çapında, çiğ sütlerde *M. bovis* varlığının araştırılması üzerine yapılan çalışmalarda oldukça değişken değerler saptandığı dikkat çekmiştir.

Türkiye'deki çalışmalar incelendiğinde ise Ünver ve ark. (13) Kars'ta sığırlarda *M. bovis* prevalansını %6,7 olarak bildirmişlerdir. Konuk ve ark. (14) Afyon'da 35 çiğ süt örneğini inceledikleri çalışmada *M. bovis* saptamazken, 15 adet tüberküloz dışı mikobakteri saptamışlardır. Gümüüşsoy ve ark. (15) Kayseri'de 3216 sığırdan, sığır tüberkülozu prevalansını araştırmışlar, burun akıntısı ve süt örneklerinde PCR ile %1,4 oranında *M. bovis* tespit etmişlerdir. Aydın ve ark. (16) Mersin'de 145 çiğ sığır sütünü inceledikleri çalışmada örneklerin %0,6'sında *M. bovis* izole etmişlerdir. Çalışmamızda ise 100 sığıra ait çiğ süt örneğinin hiçbirinde EZN boyama ve kültürde aside dirençli basil tespit edilmemiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda sığırlar arasında *M. bovis* prevalansının düşük olduğu gözlenmektedir. Buna paralel olarak çalışmamızda da *M. bovis* saptanmamıştır.

Çalışmamızda *M. bovis* saptanmamış olsak da daha önce bölgemizde yapılan bir çalışmada izole edilmiş olan toplam 220 MTBC suşuna alt tür tayini yapılmış ve MTBC suşlarının 217 (%98,6)'sinin *M. tuberculosis/M. canettii*, üçünün (%1,4) ise *M. bovis* subsp. *bovis* olduğu saptanmış olup hepsinin son üç yıla ait örneklerden izole edildiği vurgulanmıştır (17). Bu da bölgemizdeki çiğ sığır sütlerinin, *M. bovis* kaynaklı tüberküloz için risk taşıdığını göstermektedir. Bu çalışmada köylerde hayvan yetiştiricilerinden elde edilen sütlerin sağlıklı koşullarda saklandığı taktirde güvenli olduğu görülmüştür. Çalışmanın Düzce'de çok sayıda hayvanın birlikte bakıldığı besi çiftliklerinde yapılması gerektiği düşünülmüştür.

## KAYNAKLAR

1. Rastogi N, Legrand E, Sola C. The mycobacteria: An introduction to nomenclature and pathogenesis. Rev Sci Tech. 2001; 20(1): 21-54.
2. Holloway KL, Henneberg RJ, de Barros Lopes M, Henneberg M. Evolution of human tuberculosis: A systematic review and meta-analysis of

- paleopathological evidence. *Homo*. 2011; 62(6): 402-58.
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. de la Rua-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci*. 2006; 81(2): 190-210.
  5. Botsaris G, Slana I, Liapi M, Dodd C, Economides C, Rees C, et al. Rapid detection methods for viable *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in milk and cheese. *Int J Food Microbiol*. 2010; 141(suppl 1): 87-90.
  6. World Health Organization. Global tuberculosis report. Geneva: WHO; 2016.
  7. Thakur A, Sharma M, Katoch VC, Dhar P, Katoch RC. A study on the prevalence of bovine tuberculosis in farmed dairy cattle in Himachal Pradesh. *Veterinary World*. 2010; 3(9): 409-14.
  8. Jha VC, Morita Y, Dhakal M, Besnet B, Sato T, Nakai A, et al. Isolation of *Mycobacterium* spp. from milking buffaloes and cattle in Nepal. *J Vet Med Sci*. 2007; 69(8): 819-25.
  9. Raffo E, Steuer P, Monti G, Salgado M. Effect of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) infection on the diagnostic accuracy for *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) infection under field conditions in cattle belonging to low *M. bovis* prevalence herds. *Trop Anim Health Prod*. 2017; 49(4): 771-5.
  10. Srivastava K, Chauhan DS, Gupta P, Singh HB, Sharma VD, Yadav VS, 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.
  11. Lamuka PO, Njeruh FM, Gitao GC, Matofari J, Bowen R, Abey KA. Prevalence of bovine and avian tuberculosis in camel herds and associated public health risk factors in Isiolo country, Kenya. *Trop Anim Health Prod*. 2018; 50(5): 937-45.
  12. Kazwala RR, Daborn JC, Kusiluka LJM, Jiwa SFH, 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.
  13. Ünver A, Atabay Hİ, Güneş V, Çitil M, Erdoğan HM. Kars yöresinde sığır tüberkülozunun yaygınlığının per ile belirlenmesi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*. 2007; 13(1): 27-31.
  14. 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.
  15. Gümüşsoy KS, Atasever A, Aydın F, Özcan M, Beyaz L, Hızlısoy H, et al. Prevalence of tuberculosis in cattle in Turkey. *Medycyna Wet*. 2007; 63(3): 305-8.
  16. Aydın FE, Ülger M, Emekdaş G, Aslan G, Günel S. Mersin ilinde çiğ sütlerden *Mycobacterium bovis* ve tüberküloz dışı mikobakterilerin izolasyonu ve tanımlanması. *Mikrobiyol Bul*. 2012; 46(2): 283-9.
  17. Öztürk CE, Şahin İ, Öksüz Ş, Kılıç N, Kılınçel Ö, Aydın L ve ark. Düzce ilinde izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks suşlarında *Mycobacterium bovis* subsp. *Bovis* varlığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul*. 2016; 50(3): 392-400.