

Tüberkülozlu Hastalara Ait *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks İzolatlarının MIRU-VNTR ve Spoligotiplendirme Yöntemleri ile Genotiplendirilmesi[§]

Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates from Patients with Tuberculosis by MIRU-VNTR and Spoligotyping Methods

Nurcihan Biltekin^{*}, Mahmut Ülger^{*}, Mediha Begüm Kayar^{**}, Gülfer Yakıcı^{**}, Seda Tezcan Ülger^{***},
Gönül Aslan^{***}, Nuran Delialioğlu^{***}, Fatih Köksal^{****}

* Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye

** Gaziantep İslam Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep, Türkiye

*** Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye

**** Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

Atf/Cite as: Biltekin N, Ülger M, Kayar MB, et al. Tüberkülozlu hastalara ait *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatlarının MIRU-VNTR ve spoligotiplendirme yöntemleri ile genotiplendirilmesi. Turk Mikrobiyoloji Cemiyet Derg. 2023;53(2):84-92.

ÖZ

Amaç: Tüberküloz, tüm dünyada görülen önemli mortalite ve morbidite ile sonuçlanan, tek bir enfeksiyöz ajanının neden olduğu bakteriyel bir hastalıktır. Tüberküloz basili ile dünya nüfusunun neredeyse dörtte biri enfektedir ve bu hastalıktan dolayı her yıl yaklaşık iki milyon kişi ölmektedir. Bu çalışmada ilimizdeki *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTK) izolatlarının genotiplendirilmesi ve bu izolatlarla ait moleküler epidemiyolojik verilerinin elde edilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmada Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'ndaki 103 MTK izolatının MIRU-VNTR ve spoligotiplendirme yöntemleri ile genotiplendirilmesi yapıldı.

Bulgular: Moleküler genotiplendirme sonucunda 103 izolatın 10 spoligotiplendirme kümesi içerisinde dağıldığı görüldü. T ailesinin 48 (%46.6) izolat ile en büyük kümeyi oluşturduğu belirlendi. Bunu 16 (%15.5) izolat ile Haarlem ailesinin, 13 (%12.6) izolat ile TUR ailesinin, 10 (%9.7) izolat ile S ailesinin, dörder (%3.9) izolat ile Beijing ve LAM ailelerinin, üçer (%2.9) izolat ile Bovis ve NEW-1 ailelerinin, birer (%0.9) izolat ile Delhi/CAS ve H37Rv ailelerinin izlediği görüldü.

Sonuç: Çalışma sonucunda, en yaygın görülen ailenin %46.6 oranıyla T ailesi olduğu tespit edildi. Daha önce yapılan çalışmalarda özellikle çok ilaca dirençli tüberküloz ile ilişkili olduğu bildirilen Beijing ailesi de artık bölgemizde saptanmıştır. MIRU-VNTR ve spoligotiplendirme yöntemlerinin kombinasyonu ile *M. tuberculosis*'in, moleküler epidemiyolojik çalışmaların yapıldığı bölgedeki hareketliliğinin izlenmesi ile o bölgedeki popülasyonda tüberkülozun kontrolünde ve eliminasyonunda yararlı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Spoligotiplendirme, MIRU VNTR, *Mycobacterium tuberculosis*

ABSTRACT

Objective: Tuberculosis is a bacterial disease caused by a single infectious agent, resulting in significant mortality and morbidity worldwide. Almost a quarter of the world's population is infected with tuberculosis bacillus, and about two million people die each year from this disease. In this study, it was aimed to genotyping *Mycobacterium tuberculosis* complex (MT) isolates in our province and to obtain molecular epidemiological data of these isolates.

Methods: In the study, genotyping of 103 MTC isolates in the Mersin University Faculty of Medicine Department of Medical Microbiology Mycobacteriology Laboratory was performed using spoligotyping and MIRU-VNTR methods.

Results: As a result of molecular genotyping, it was observed that 103 isolates were distributed in 10 spoligotyping clusters. It was determined that the T family constituted the largest cluster with 48 (46.6%) isolates. This was followed by 16 (15.5%) isolates of the Haarlem family, 13 (12.6%) isolates of the TUR family, 10 (9.7%) isolates of the S family, four (3.9%) isolates of the Beijing and LAM families, three (2.9%) isolates of the Bovis and NEW-1 families were followed by Delhi/CAS and H37Rv families, with one (0.9%) isolate.

Conclusion: As a result of the study, it was determined that the most common family was the T family with a rate of 46.6%. The Beijing family, which was reported to be associated with multi-drug resistant tuberculosis in previous studies, has now been identified in our region. It is thought that the combination of MIRU-VNTR and spoligotyping methods will be useful in the control and elimination of tuberculosis in the population in that region by monitoring the motility of *M. tuberculosis* in the region where molecular epidemiological studies are carried out.

Keywords: Spoligotyping, MIRU VNTR, *Mycobacterium tuberculosis*

Alındığı tarih / Received:

26.07.2022 / 26.July.2022

Kabul tarihi / Accepted:

06.01.2023 / 06.January.2023

Yayın tarihi / Publication date:

01.06.2023 / 01.June.2023

ORCID Kayıtları

N. Biltekin 0000-0002-7165-9385

M. Ülger 0000-0001-6649-4195

M. B. Kayar 0000-0002-9657-5970

G. Yakıcı 0000-0001-6486-3209

S. Tezcan Ülger 0000-0002-0823-3680

G. Aslan 0000-0002-1221-7907

N. Delialioğlu 0000-0001-8535-3291

F. Köksal 0000-0003-0790-1525

[§]Bu çalışma, Uluslararası Mikobakteri Sempozyumu'nda (Mersin, 28-30 Kasım 2019) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

✉ nur.biltekin@hotmail.com

GİRİŞ

Tüberküloz (TB), tüm dünyada görülen önemli mortalite ve morbidite ile sonuçlanan, tek bir enfeksiyöz ajanının neden olduğu bakteriyel bir hastalıktır⁽¹⁾. TB basili ile dünya nüfusunun neredeyse dörtte biri enfektedir ve bu hastalıktan dolayı her yıl yaklaşık iki milyon kişi ölmektedir⁽²⁾.

Mycobacterium tuberculosis kompleks (MTK) üyeleri yavaş üredikleri için moleküler yöntemler ile tanı ve tiplendirilmeleri hızlı bir şekilde yapılabilmekte ve basilin popülasyonlar arasındaki yayılımı, ilaca karşı direnç gelişimi ve spesifik genotipler arasındaki ilişki saptanabilmektedir^(3,4). Bir bölgedeki baskın izolatın bulunması ve farklı bölgelerde salgınlara sebep olan MTK izolatlarının kökenini araştırmak için son yıllarda "Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number of Tandem Repeat" (MIRU-VNTR) tiplemesi, "Polymerase Chain Reaction (PCR)-Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP) ve "Spacer oligonucleotide typing" (spoligotyping-spoligotiplendirme) gibi çeşitli moleküler yöntemler kullanılmaktadır⁽⁵⁾. *Mycobacterium tuberculosis*'in genotiplendirilmesinde MIRU-VNTR ve spoligotiplendirme yöntemleri birlikte kullanıldığında hızlı ve güvenilir sonuçların elde edildiği kabul edilmektedir⁽⁴⁾.

MTK izolatlarının genotiplerini belirlemek için sıklıkla kullanılan ve PCR-bazlı reverse dot blot temeline dayanan spoligotiplendirme yöntemi, izolatlardaki kromozomal Direct Repeat (DR) lokusunda bulunan polimorfizmlerin gösterilmesine dayanmaktadır⁽⁶⁾. MIRU-VNTR yönteminde MTK izolatlarının genotiplerinin belirlenmesinde 41 farklı değişken sıralı tekrar (VNTR) bölgesi tespit edilmiş ve bunlara MIRU denilmiştir⁽⁷⁾.

Bu çalışmada, MTK izolatlarının MIRU-VNTR ve spoligotiplendirme yöntemleri ile genotiplendirilmesinin yapılması ve ilimizde bu izolatların moleküler epidemiyolojik verilerinin elde edilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu araştırma, Mersin Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurul tarafından (04.09.2019 tarih ve 2019/355 karar numarası) onaylanmıştır.

Mycobacterium tuberculosis izolatları: Çalışmaya, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nda 01.01.2016-31.12.2017 tarihleri arasında, klinik materyalinin kültüründe (Löwenstein-Jensen [LJ] katı besiyeri ve/veya BACTEC MGIT 960 sıvı besiyeri) MTK üremesi tespit edilen 103 klinik izolat dâhil edildi. Çalışmada her bir hastaya ait bir izolat kullanıldı. BACTEC MGIT 960 sistemi ile izolatların birinci seçenek anti-TB ilaçlara karşı duyarlılıkları belirlendi.

DNA Ekstraksiyonu: Çalışmaya dâhil edilen 103 MTK izolatının DNA'sı, +4°C'de saklanan BACTEC MGIT 960 sıvı besiyeri şişelerinden Mickle cihazı (Mickle tissue disintegrator) kullanılarak elde edildi. Ekstraksiyon ardından spektrofotometre (CHEBIOS) ile 260 nm'de ölçüm yapılarak DNA miktarı tespit edildi. Ekstrakte edilen DNA'lar moleküler işlemler yapılmaya kadar -20°C'de saklandı.

Spoligotiplendirme: Ekstraksiyon sonrası spoligotiplendirme yöntemi ile 36 bç uzunluğundaki DR bölgelerini hedef alan DRa ve DRb primerleri kullanılarak bu bölgelerinin amplifikasyonu gerçekleştirildi⁽⁸⁾.

M. bovis BCG, *M. tuberculosis* H37Rv veya genotipi bilinen klinik izolat pozitif kontrol, nükleaz içermeyen distile su ise negatif kontrol olarak kullanıldı. Her bir izolat için PCR 25 µl'lik hacimde [12.5 µl 2X PCR karışımı (Fermentas) (1.6 mM dNTP karışımı [her bir dNTP'den 0.4 mM], 4 mM MgCl₂, 0.05 U/µl Taq DNA polimerazdan oluşmaktadır), 0.25 µl DRa ve DRb primerleri (0.25 pmol/µl), 9.5 µl nükleaz içermeyen distile su ve 2.5 µl kalıp DNA] gerçekleştirildi. Spoligotiplendirme için ısı döngü cihazında (Applied Biosystem AB) amplifikasyon koşulları; 95°C'de beş dakika başlangıç denatürasyonu, 40 döngü 94°C'de bir dakika denatürasyon, 55°C'de bir dakika

bağlanma, 72°C'de 45 saniye uzama ve 72°C'de 10 dakika son uzama şeklinde uygulandı. Elde edilen sonuçlar Oktal kodlama anahtarı kullanılarak 0-7 arasında 15 rakamdan oluşan "Oktal kod" formatına çevrilerek kümelerin ve ailelerin belirlenmesi için SpoIDB4 veri tabanı kullanıldı.

MIRU-VNTR: Çalışmada her bir izolata özgü 15 MIRU (424, 577, 580, 802, 960, 1644, 1955, 2163b, 2165, 2401, 2996, 3192, 3690, 4052, 4156)⁽⁹⁾ lokusunun VNTR sayısının belirlenmesi için 15 PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Her bir izolat için 12.5 µl 2X PCR karışımı (Fermentas) (1.6 mM dNTP karışımı [her bir dNTP'den 0.4 mM], 4 mM MgCl₂, 0.05 U/µl Taq DNA polimerazdan oluşmaktadır), 1 µl DMSO (Sigma), 2 µl primer karışımı (2163b, 2165, 3690, 4156 ve 4052 için 3 µl) kullanıldı. Hazırlanan bu karışıma, son hacmi 20 µl'ye tamamlanacak şekilde nükleaz içermeyen distile su ile her bir örneğe ait 5 µl kalıp DNA ilave edildi.

Hazırlanan reaksiyon karışımı Termal Cyclus (Applied Biosystem AB) ısı döngü cihazında ilk denatürasyona takiben (95°C'de 5 dakika), 94°C'de 30 saniye, 61°C'de 30 saniye (1955 ve 3690 lokusları için bağlanma sıcaklığı 55°C'dir), 70°C'de bir dakika (toplam 35 döngü), son uzama için 72°C'de 7 dakika ve 4°C'de ∞ bekleme şeklinde uygulandı.

PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde (150 Voltta, 180 dakika) elektroforezi yapıldı ve jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, Fransa) ile görüntüledi. Elde edilen bant büyüklüklerine göre 15 MIRU lokusundaki allel tekrar sayıları miruvnrplus veritabanı (www.miruvnrplus.org) kullanılarak değerlendirildi.

BULGULAR

Hastaların %71.9 (74/103)'ü erkek, %28.1 (29/103)'i kadın ve yaş ortalamaları 47.35'dir (min: 6, maks: 92). Hastaların %88.3 (91)'ü akciğer TB'si, geri kalan %11.7 (12)'si ise akciğer dışı TB olarak tespit edilmiştir.

Tablo 1. Birinci seçenek anti-TB ilaçlara dirençli olduğu belirlenen 43 izolatın direnç profili

| Birinci seçenek anti-TB ilaç | Dirençli (%) |
|------------------------------|--------------|
| SM | 27 (62.8) |
| INH | 19 (44.2) |
| RIF | 7 (16.3) |
| EMB | 4 (9.3) |
| SM + INH | 7 (16.3) |
| SM + RIF | 4 (9.3) |
| SM + EMB | 3 (7.0) |
| INH + RIF | 3 (7.0) |
| SM + INH + RIF | 3 (7.0) |

TB: Tüberküloz, SM: Streptomisin, INH: İzoniazid, RIF: Rifampisin EMB: Etambutol

Çalışmada birinci seçenek anti-TB ilaçlardan en az birine dirençli 43 (%41.7) izolat, bu ilaçlara duyarlı 60 (%58.3) izolat olduğu belirlenmiştir. Dirençli 43 izolatın direnç profilleri Tablo 1'de verilmiştir.

15 lokus MIRU-VNTR yöntemi ile tiplendirmesi yapılan 103 MTK izolatına ait 12 izolat beş farklı küme (Küme 1: 13 ve 14; Küme 2: 10, 95 ve 100; Küme 3: 44, 49 ve 50; Küme 4: 40 ve 52; Küme 5: 23 ve 24) içerisinde dağılmış ve 91 özgün profil tespit edilmiştir.

Spoligotiplendirme ve 15 lokus MIRU-VNTR yöntemlerinin birlikte analizi sonucunda spoligotiplendirme sonuçlarına göre; 103 izolatın 10 spoligotiplendirme kümesi içerisinde dağıldığı, 48 (%46.6) izolat ile T ailesinin en büyük kümeyi oluşturduğu tespit edilmiştir. Bunu 16 (%15.5) izolat ile Haarlem ailesinin, 13 (%12.6) izolat ile TUR ailesinin, 10 (%9.7) izolat ile S ailesinin, dörder (%3.9) izolat ile Beijing ve LAM ailelerinin, üçer (%2.9) izolat ile Bovis ve NEW-1 ailelerinin, birer (%0.9) izolat ile Delhi/CAS ve H37Rv ailelerinin izlediği görülmüştür. T ailesinin T1 (n=47, %98) ve T4 (n=1, %2) olmak üzere 2 farklı spoligotip paterni gösterdiği belirlenmiştir. 103 izolata ait spoligotiplendirme aileleri, görülme oranları ve ailelere ait SIT gruplarının dağılımları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. 103 izolata ait spoligotiplendirme aileleri, görülme oranları ve SIT grupları

| Spoligotiplendirme kümesi | İzolot sayısı (n) | Görülme oranı (%) | SIT Grupları |
|---------------------------|-------------------|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| T ailesi | 48 | 46.6 | |
| T1 alt ailesi | 47 | | SIT53 n=24 SIT284 n=15 SIT7 n=3 SIT102 n=2 SIT205 n=2 SIT86 n=1 |
| T4 alt ailesi | 1 | | SIT40 n=1 |
| Haarlem | 16 | 15.5 | SIT50 (H3) n=4 SIT127 (H4) n=3 SIT2 (H2) n=2 SIT2077 (H3) n=2 SIT47 (H1) n=2 SIT1735 (H3) n=1 SIT1593 (H3) n=1 SIT62 (H1) n=1 |
| TUR | 13 | 12.6 | SIT41 n=12 SIT367 n=1 |
| S | 10 | 9.7 | SIT34 n=6 SIT784 n=4 |
| Beijing | 4 | 3.9 | SIT1 n=4 |
| LAM | 4 | 3.9 | SIT42 (LAM9) n=3 SIT254 (LAM-RUS) n=1 |
| Bovis | 3 | 2.9 | SIT1118 n=2 SIT685 n=1 |
| NEW-1 | 3 | 2.9 | * |
| Delhi/CAS | 1 | 0.9 | SIT25 n=1 |
| H37Rv | 1 | 0.9 | H37Rv n=1 |
| Toplam | 103 | 100 | |

*Çalışmanın yapıldığı tarihte NEW-1 ailesi olarak bulunan 3 izolotın SIT numaraları, daha sonra NEW-1 ailesinin URAL-2 ailesi olmasından dolayı verilememiştir.

Çalışmaya dâhil edilen 91 akciğer TB hastasına ait izolotların 41'inin T, 16'sının Haarlem, 11'inin TUR, sekizinin S, dördünün Beijing, dördünün LAM, üçünün Bovis, üçünün New-1, birinin Delhi/CAS ailesine; 12 akciğer dışı TB hastasına ait izolotların yedisinin T,

Tablo 3. Birinci seçenek anti-TB ilaçlara dirençli 43 izolotın spoligotiplendirme küme dağılımı

| Spoligotiplendirme kümesi | Dirençli izolot sayısı | | |
|---------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| T kümesi | 19 | Bir ilaca dirençli: 16 | SM: 8 INH: 5 RIF: 2 EMB: 1 |
| | | İki ilaca dirençli: 3 | SM+INH: 2 SM+EMB: 1 |
| | | Bir ilaca dirençli: 6 | SM: 1 INH: 4 RIF: 1 |
| Haarlem | 10 | İki ilaca dirençli: 2 | SM+INH: 1 SM+RIF: 1 |
| | | Üç ilaca dirençli: 2 | SM+INF+RIF: 2 |
| | | Bir ilaca dirençli: 4 | SM: 4 |
| S | 6 | İki ilaca dirençli: 2 | SM+EMB: 2 |
| | | Bir ilaca dirençli: 2 | SM: 2 |
| Beijing | 3 | Üç ilaca dirençli: 1 | SM+INF+RIF: 1 |
| LAM | 3 | Bir ilaca dirençli: 3 | SM: 1 INH: 2 |
| TUR | 1 | İki ilaca dirençli: 1 | SM+INH: 1 |
| H37Rv | 1 | Bir ilaca dirençli: 1 | INH: 1 |
| Toplam | 43 | | |

ikisinin TUR, ikisinin S ve birinin de H37Rv ailesine ait olduğu tespit edilmiştir.

Beijing izolotunun birinde üçlü ilaç direnci, ikisinde ise tekli ilaç direnci tespit edilmiştir (Tablo 3). Bu dört hastanın birinin Rusya, birinin Kırgızistan ve ikisinin Türk vatandaşı olduğu belirlenmiştir. Türk vatandaşı olan iki hastanın dosyaları incelendiğinde bu hastaların herhangi bir yurt dışı çıkış öyküleri veya yabancı uyruklu kimselerle temas öykülerinin olmadığı saptanmıştır.

Çalışmaya dâhil edilen 43 dirençli izolotın spoligotiplendirme küme dağılımları Tablo 3'te verilmiştir.

TARTIŞMA

Tüberküloz dünya çapında, özellikle gelişmekte olan ülkelerde morbidite ve mortalitenin başlıca nedenidir⁽¹⁰⁾. Dünya Sağlık Örgütü 2020 yılında, 9.9 milyon yeni TB olgusunun görüldüğünü, 1.3 milyon TB'li hastanın ve 214.000 HIV (+) hastanın TB nedeniyle öldüğü bildirilmiştir⁽²⁾. Günümüzde TB salgınında, ÇİD oranının artması ve HIV/AIDS ile ko-enfeksiyon mevcudiyeti, bu hastalığın artmasına ve buna bağlı olarak tedavi edilmemesindeki en önemli sorunlar olarak kabul edilmektedir^(11,12).

Günümüzde yaygın bir şekilde kullanılan moleküler tiplendirme yöntemleri ile genomik polimorfizmlerin doğrudan analizi yapılabilmektedir. Çeşitli epidemiyolojik yöntemler; *M. tuberculosis*'in popülasyonlar arasındaki geçişinin ölçülmesi, basilin moleküler tiplendirilmesi ve spesifik genotipler ile ilaca karşı dirençli izolatlar arasındaki ilişkiyi saptamak için kullanılmaktadır⁽⁴⁾. İnsanlar da dâhil çeşitli konakçı türlerine *M. tuberculosis*'in adaptasyonunda, bakterinin coğrafi kökeni ile bağıntılı olan genetik çeşitliliği önemli bir rol oynamaktadır. Bir izolatın mutasyon oranları, ilaç direnci, soy bilgisi, bulaşıcılık ve virülans özellikleri, o izolatın filocoğrafik kaynağı hakkında bilgi sahibi olmamıza yardımcı olmaktadır. Moleküler sürveyans programının temelini, epidemiyolojik veya klinik veriler ile soy sınıflandırmasının birleştirilmesi sonucu elde edilen veriler oluşturmaktadır⁽¹³⁾.

Bu çalışmada, TB'li hastalardan izolen edilen MTK izolatlarında 15 lokus MIRU-VNTR ve spoligotiplendirme yöntemleri kullanılarak moleküler epidemiyolojik veri elde edilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmaya 103 MTK izolatı dâhil edilmiş, dirençli 43 izolatın farklı ilaç direnç profillerine sahip olduğu saptanmıştır (Tablo 1). 15 lokus MIRU-VNTR yöntemi ile tiplendirmesi yapılan 103 MTK izolatına ait 12 izolat beş farklı küme içerisinde dağılmış ve 91 özgün profil tespit edilmiştir. Bu sonuçlara kıyasla, spoligotiplendirme yöntemi ile izolatların 10 spoligotiplendirme küme dağılımı göstermesi, izolatların MIRU-VNTR yöntemi ile daha az kümeye

ayrıldığını bu da MIRU-VNTR'nin ayırım gücünün daha yüksek olduğunu göstermektedir (Tablo 2). Dirençli 43 izolatın spoligotiplendirme küme dağılımı ise Tablo 3'te verilmiştir.

Oudghiri ve ark.⁽¹⁴⁾ 2021 yılında Fas'ta dört yıl süre boyunca (2010-2013) toplam 70 ÇİD izolatının dâhil edildiği ve spoligotiplendirme ile 15 lokus MIRU-VNTR yöntemlerini kullandıkları çalışma sonucunda, en yaygın ailelerin sırasıyla LAM (%57.4); T (%18.5); Haarlem (%7.1); S (%7.1); SITVIT2 veritabanında tanımlanamayan (%5.6) ve Beijing (%4.3) olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmanın, Fas'ta TB'nin sıcak noktası olarak tanınan Kazablanka'daki ÇİD ve YİD öncesi MTK popülasyon yapısı hakkında fikir sahibi olmak için yapılan ilk moleküler karakterizasyon çalışması olduğunu bildirmişlerdir.

İran'da 162 MTK izolatının dâhil edildiği bir çalışmada, 15 lokuslu MIRU-VNTR sonuçlarına göre NEW-1 (%22.2) ve Beijing (%13.6) ailelerinin en sık görülen aileler olduğu belirtilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre Beijing izolatlarının tedavilerinde sorunlar yaşandığı ve diğer ilaçlarla göre SM direncinin hâlâ yüksek olduğu ifade edilmiştir⁽¹⁵⁾.

Spoligotiplendirme yöntemi ile 234 MTK izolatının genotip analizinin yapıldığı bir çalışmada, LAM (%37.2) ailesinin en yaygın görülen aile olduğu, bunu sırasıyla Haarlem (%15.8), T (%8.1), U (%3.4), S (%2.6), X (%2.1) ve Beijing (%0.9) ailelerinin izlediği belirtilmiştir. Bu çalışma sonucunda Beijing ailesinin Kolombiya'da varlığının tespit edildiği bildirilmiştir⁽¹⁶⁾.

Li ve ark.⁽¹⁷⁾ Çin'de 251 MTK izolatını dâhil ettikleri çalışmada MIRU-VNTR ve spoligotiplendirme yöntemleri ile, izolatların 49 farklı spoligotip paterni gösterdiği, Beijing (%62.2) ailesinin en yaygın görülen aile olduğu ifade edilmiştir. Beijing ailesine ait izolatların, Kuzey Çin bölgesinde daha baskın olduğu ve buna da ülkenin coğrafyası, iklimi ve nüfusu gibi çeşitli faktörlerin etki edebileceği vurgulanmıştır⁽¹⁷⁾.

Vluggen ve ark.⁽³⁾ Brüksel'de 2010-2013 yıllarını kapsayan bir çalışmalarında, 945 hasta örneğinin

spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR yöntemleri ile çalışıldığı, elde edilen sonuçlara göre LAM (%16.7) ve Haarlem (%15.7) ailelerinin en sık görülen aileler olduğu tespit edilmiştir. Çalışmaya dâhil edilen ÇİD-TB izolatlarının ayrıntılı analizi sonucunda, Beijing (%39.9) izolatları ile Doğu Avrupa'nın yerli halkı (%40.7) arasında bir ilişkinin olduğu vurgulanmıştır⁽³⁾. Yurt dışında yapılan çalışmaların aksine bizim çalışmamızda en sık T ailesi (%46.6) daha sonra ise Haarlem (%15.5) ve TUR (%12.6) aileleri tespit edilmiştir. Çalışmamızda LAM ailesi ise %3.9 oranı ile altıncı en sık tespit edilen aile olmuştur. Çalışmamızda tespit edilen dört (%3.9) Beijing izolatının birinde üçlü ilaç direnci, ikisinde ise tekli ilaç direnci tespit edilmiştir (Tablo 3). Bu dört hastadan ikisinin eski Sovyetler Birliği ülkelerinden oldukları belirlenmiştir.

Karagöz ve ark.⁽¹⁸⁾ tarafından 2020 yılında Sivas ve Konya illerinde yapılan bir çalışmada, 200 MTK izolatının 86 (%43.0)'ünün T, 52 (%26.0)'ünün ise Latin Amerika-Akdeniz (LAM) ailesinden olduğunu, ayrıca 16 (%8.0) izolatın Haarlem, 24 (%12.0) izolatın X ve S ailelerinden, 12 (%6.0) izolatın Beijing ve 10 (%5.0) izolatın da U ailesine ait olduğunu bildirmişlerdir. Spoligotiplendirme sonuçlarına göre, Türkiye'de heterojen bir *M. tuberculosis* popülasyonunun bulunduğunu; MIRU-VNTR verilerine göre ise Türkiye'de ÇİD *M. tuberculosis* izolatları arasında gözlenen çapraz kontaminasyonun kontrol edilebilir olduğunu belirtmişlerdir⁽¹⁸⁾.

Oral Zeytinli ve ark.⁽¹⁹⁾ Çukurova bölgesinde 467 MTK izolatını dâhil ettikleri çalışma sonucunda, T1 (%51.9) ailesinin en yaygın, LAM7 TUR (%11.5) ailesinin ise ikinci en yaygın görünen aile olduğu vurgulanmıştır. 103 MTK izolatını dâhil ettiğimiz bu çalışmada, izolatların 10 küme içerisinde dağıldığı ve T (%46.6) ailesinin en yaygın kümeyi oluşturduğu, Haarlem (%15.5) ailesinin ise ikinci sırada yer aldığı görülmüştür. Oral Zeytinli ve ark.⁽¹⁹⁾ çalışmalarındaki sonuçlara göre Mersin'de sadece T1 ve LAM7 TUR ailelerinin tespit edilmesine rağmen, yaptığımız bu çalışmada değişen sayılarda olmak üzere Haarlem, TUR, S, Beijing, LAM, Bovis, NEW-1, Delhi/CAS ve H37Rv ailelerinin varlığı da gösterilmiştir.

Türkiye'nin farklı TB laboratuvarlarından gönderilen 63 ÇİD-TB'li izolatın ikinci seçenek anti-TB ilaç duyarlılıkları ve bu izolatların moleküler epidemiyolojik özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada IS6110-RFLP ve spoligotiplendirme yöntemleri kullanılmıştır. Spoligotiplendirme sonuçlarına göre, beş küme oluşturan 52 izolattan 42'sinin önceden tanımlanmış spoligotipler (LAM7-TUR, LAM9, T) olduğu ifade edilmiştir. 10 izolatın U spoligotip ailesinin özelliklerini gösterdiği, 11 farklı patern oluşturan 11 izolattan sekizinin Haarlem ve T ailesi, ikisinin Orphan, birinin BOV ailesine ait özellikler taşıdığı tespit edildiği vurgulanmıştır. Çalışma sonucunda LAM7-TUR, LAM9 ve T ailelerinin ülkemizde ve dünyada en yaygın olan aileler olduğu belirtilmiştir⁽²⁰⁾. Bizim çalışmamızda ise sırasıyla T, Haarlem ve TUR aileleri en yaygın aileler olarak bulunmuştur.

Ege bölgesinde 470 *M. tuberculosis* izolatının dâhil edildiği bir çalışmada, izolatların 132 değişik spoligopatemi gösterdiği ve 384 izolatın 46 değişik kümede dağıldığı belirtilmiştir. Çalışma sonucunda en baskın spoligotiplerin ST53 (n=116; %24.7) ve ST41 (n=38; %8,1) olduğu ve bunu sırasıyla ST50 (%5.7), ST284 (%4.7) ve ST4 (%4.3)'ün izlediği vurgulanmıştır. En baskın spoligotipin T ailesi (n=219; %46.6) olduğu, bunu Haarlem (n=75; %16), LAM (n=58; %12.3), bilinmeyen (n=30; %6.4), S (n=14; %3), Beijing (n=11; %2.3), CAS (n=4; %0.9) ve X (n=4; %0.9) ailelerinin izlediği ifade edilmiştir. Altısı ST1 olmak üzere 12 izolatın ÇİD-TB'li olduğu bildirilmiştir. Artan eğilimi ile ST284 (T1)'ün bu bölgede ilerleyen yıllarda ST41 (LAM7-TUR)'in yerini alabileceği vurgulanmıştır. Çalışmaya dâhil edilen 288 (%68.7) izolatın akciğer TB'li hastalara ait olup bu izolatlarda en sık görülen ailelerin sırasıyla T1 (n=69), LAM7-TUR (n=20) ve Haarlem (H3, n=20) ailelerinin, 131 (%31.3) izolatın ise akciğer dışı TB'li hastalara ait olup bu izolatlarda en sık görülen ailelerin sırasıyla T1 (n=36), LAM7-TUR (n=9) ve Haarlem (H1, n=6) ailelerinin olduğu belirtilmiştir⁽²¹⁾. Bizim çalışmamıza dâhil edilen 91 akciğer TB hastasına ait izolatlarda en sık görülen ailelerin T (n=41), Haarlem (n=16) ve TUR (n=11) aileleri; 12 akciğer dışı TB hastasına ait izolatlarda ise T (n=7), TUR (n=2) ve S (n=2) ailelerinin olduğu tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada da en baskın

görülen spoligotip ailesi %51.1 oranı ile SIT53 (n=24) olarak bulunmuş, bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda ikinci sırada %31.9 ile SIT284 (n=15) ailesinin geldiği belirlenmiştir. Yine bu çalışmaya benzer olarak bizim çalışmamızda da en baskın olarak T ailesinin (n=48, %46.6) daha sonra da Haarlem ailesinin (n=16, %15.5) geldiği tespit edilmiştir.

Otlu ve ark.⁽²²⁾ 2009'da yaptıkları çalışmada toplam 220 *M. tuberculosis* izolatının spoligotipleme ile tiplendirildiği ve çalışma sonucuna göre, ST küme dağılımına bakıldığında en fazla ST53 (T1; n=55, %25), ST41 (LAM7-TUR; n=19, %8.6) ve ST284 (T1; n=15, %6.8) kümelerinin olduğu belirtilmiştir. En sık görülen ailelerin sırasıyla T (n=112, %50.9); Latin-Amerikan-Akdeniz (LAM; n=33, %15); Haarlem (n=24, %10.9) ve S (n=9, %4.1) ailelerinin olduğu, Beijing ailesinde ise üç izolatın bulunduğu ifade edilmiştir. Malatya'daki *M. tuberculosis* izolatlarının, hem dünya çapında yaygın bir dağılım gösteren ST'lere, hem de bu şehirle sınırlı olan ST'lere sahip olduğu ve bu sonuçların da TB'nin oldukça çeşitli genotip dağılımını doğruladığı vurgulanmıştır. Çalışma sonuçlarına göre, ÇİD-TB ve izoniazid direnci olan izolatlar arasında daha yaygın olan Beijing ailesinin Doğu Türkiye'de bir sorun olmadığını bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışma sonucunda en fazla SIT53 (T1, n=24, %51.1) kümesinin tespit edilmesine karşılık ikinci sırada SIT284 (T1, n=15, %31.9) kümesi tespit edilmiş, 12 (%11.6) izolatın ise SIT41 (TUR) kümesinde olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda T ailesini (%46.6) Haarlem ailesi (%15.5) takip etmekte, LAM ailesi (%3.9) ise altıncı sırada gelmektedir (Tablo 2). Yaptığımız çalışmada bölgemizde Beijing ailesinin varlığı gösterilmiş ve dört Beijing izolatından birinde üçlü ilaç direnci, bir tanesinde ise tek ilaca direnç tespit edilmiştir (Tablo 3).

Ülkemizde bu konu ile ilgili değişik tarihlerde yapılan çalışmalarda bakıldığında SIT53 kümesinin %27.2-16.3⁽²³⁻²⁶⁾ arasında değişen oranlarda tespit edildiği belirtilmektedir. Bu çalışmaların ikisinde SIT53 kümesinin en yaygın küme olduğu ifade edilmiştir. Bizim çalışmamızda da SIT53 kümesi %51.1 ile en yaygın küme olarak tespit edilmiştir (Tablo 2).

Yine ülkemizde yapılan çalışmalara baktığımızda SIT41 kümesi %23.9-7.9⁽²³⁻²⁸⁾ arasında değişen oranlarda saptanmıştır. SIT41 kümesinin üç çalışmada en yaygın, iki çalışmada ise ikinci sıklıkla tespit edilen küme olduğu vurgulanmıştır. Yaptığımız çalışmada ise SIT41 kümesi %11.6 oranında tespit edilmiş ve bu oran ile üçüncü en sık küme olarak bulunmuştur. Yapılan bu çalışmalarda Haarlem ailesi üçüncü ve dördüncü en sık tespit edilen aile olarak bildirilirken⁽²³⁻²⁸⁾, bizim çalışmamızda ise bu aile ikinci en sık tespit edilen aile olmuştur (Tablo 2).

Köksalan ve ark.⁽²⁹⁾ Beijing ailesinin İstanbul'daki prevalansını belirlemek için 4069 *M. tuberculosis* izolatını dâhil ettikleri çalışmalarında spoligotiplendirme yöntemi ile 46 (yaklaşık %1.13) Beijing izolatının saptandığını belirtmişlerdir. Yapılan çalışma ile bu izolatların eski Sovyetler Birliği ülkelerinden taşındığını göstermişlerdir. Yaptığımız bu çalışmada, daha önce yapılan çalışmalarda özellikle ÇİD-TB ile ilişkili olduğu bildirilen Beijing ailesinin varlığı ilimizde belirlenmiştir. Dört Beijing izolatında SM direnci iki izolatta, SM+INH+RIF direnci ise bir izolatta görülmüştür (Tablo 3). Bu dört izolata ait hastaların uyruklarına baktığımızda birinin Kırgızistan diğeri ise Rusya vatandaşı olduğu, diğeri iki hastanın ise Türk vatandaşı olduğu belirlenmiştir.

İlimizde yapılan bu çalışma sonucunda, ülkemizde yapılan diğeri çalışma sonuçlarına benzer şekilde en yaygın görülen ailenin %46.6 oranıyla T ailesi olduğu, T ailesinin T1 (n=47, %98) ve T4 (n=1, %2) olmak üzere 2 farklı spoligotip paterni gösterdiği belirlenmiştir. MIRU-VNTR ve spoligotiplendirme yöntemlerinin kombinasyonu ile *M. tuberculosis*'in, moleküler epidemiyolojik çalışmaların yapıldığı bölgedeki hareketliliğinin izlenmesi ile o bölgedeki popülasyonda TB'nin kontrolünde ve eliminasyonunda yararlı olacağı düşünülmektedir.

Etik Kurul Onayı: Bu araştırma, Mersin Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurul tarafından (04.09.2019 tarih ve 2019/355 karar numarası) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Yoktur/bildirilmemiştir.

Ethics Committee Approval: This study was conducted with the approval of Mersin University, Clinical Research Ethics Committee (04.09.2019; 2019/355).

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Funding: None/not declared.

KAYNAKLAR

1. Sia JK, Rengarajan J. Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Microbiol Spectr*. 2019;7(4):7.4.6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0022-2018>
2. World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. [<https://www.who.int/publications/item/9789240037021>] (Erişim tarihi: 10/04/2022).
3. Vluggen C, Soetaert K, Groenen G, et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Brussels 2010-2013. *PLoS One*. 2017;12(2):e0172554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172554>
4. Ei PW, Aung WW, Lee JS, Choi GE, Chang CL. Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis*: a review of frequently used methods. *J Korean Med Sci*. 2016;31(11):1673-83. <https://doi.org/10.3346/jkms.2016.31.11.1673>
5. Chemeda A, Mihret A, Abebe T, Worku A, Ameni G. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from pulmonary tuberculosis patients among people living with HIV in Addis Ababa: Cross-sectional study. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis*. 2018;19(12):34-7. <https://doi.org/10.1016/j.jctube.2018.06.004>
6. Zeng X, Li H, Zheng R, et al. Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by use of ligation-based amplification and melting curve analysis. *J Clin Microbiol*. 2016;54(9):2384-87. <https://doi.org/10.1128/JCM.00857-16>
7. National TB Controllers Association / CDC Advisory Group on Tuberculosis Genotyping. Guide to the application of genotyping to tuberculosis prevention and control. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; June 2004. [https://www.cdc.gov/tb/programs/genotyping/images/tbgenotypingguide_june2004.pdf] (Erişim tarihi: 20/04/2022).
8. Kremer K, Bunschoten A, Schouls L, Soolingen VD, Embden VJ. "Spoligotyping" a PCR-based method to simultaneously detect and type *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands Version November 2002. [<https://www.rivm.nl/sites/default/files/2018-11/protocol%20spoligotyping.pdf>] (Erişim tarihi: 22/03/2022).
9. Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2006;44(12):4498-510. <https://doi.org/10.1128/JCM.01392-06>
10. Mousavi SMJ, Amini S, Mirsaedi M, et al. Genotyping and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Iran: a multi-centre study. *New Microbes New Infect*. 2020;37:100729. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100729>
11. Stavrum R, Mphahlele M, Ovreås K, et al. High diversity of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in South Africa and preponderance of mixed infections among ST53 isolates. *J Clin Microbiol*. 2009;47(6):1848-56. <https://doi.org/10.1128/JCM.02167-08>
12. Ravansalar H, Tadayon K, Ghazvini K. Molecular typing methods used in studies of *Mycobacterium tuberculosis* in Iran: a systematic review. *Iran J Microbiol* 2016;8(5):338-46.
13. Thain N, Le C, Crossa A, et al. Towards better prediction of *Mycobacterium tuberculosis* lineages from MIRU-VNTR data. *Infect Genet Evol*. 2019;72:59-66. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.06.029>
14. Oudghiri A, Momen G, Aainouss A, et al. Genotypic diversity of multi-and pre-extremely drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Morocco. *PLoS One*. 2021;16(7):e0253826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253826>
15. Kochkaksaraei MB, Kaboosi H, Ghaemi EA. Genetic variation of the *Mycobacterium tuberculosis* in north of Iran; the Golestan Province. *Iran Red Crescent Med J*. 2019;21(8):e91553. <https://doi.org/10.5812/ircmj.91553>
16. Puerto D, Erazo L, Zabaleta A, Murcia MI, Llerena C, Puerto G. Characterization of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from indigenous peoples of Colombia. *Biomedica*. 2019;39(Supl.2):78-92. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4318>
17. Li B, Wang Z, Ma Y, et al. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Qinghai Province of Northwest China by spoligotyping and 15-locus MIRU-VNTR. *J Microbiol Biotechnol Rep*. 2018;2(1):1-4.
18. Karagoz A, Tutun H, Altintas L, Alanbayi U, Yildirim D, Kocak N. Molecular typing of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Turkey. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020;23:130-4. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.08.012>

19. Oral Zeytinli Ü, Köksal F. Çukurova Bölgesinde akciğer tüberkülozlu hastalardan izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR yöntemiyle tiplendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 2012;46(2):202-10.
20. Tarhan G, Ceylan İ, Durmaz R, Cesur S. The evaluation of second line drug susceptibilities and molecular epidemiological profiles of multidrug resistance *Mycobacterium tuberculosis* isolates isolated from different region of Turkey. Anatolian Curr Med J. 2022;4(1):81-8. <https://doi.org/10.38053/acmj.1018648>
21. Çavuşoğlu C, Yılmaz FF, Onmuş İRD, Bozdemir T, Taşlı H, Limoncu MH. Genotype distribution of *Mycobacterium tuberculosis* in the Aegean Region and associated demographic factors. Turk J Med Sci. 2017;47(5):1593-601. <https://doi.org/10.3906/sag-1607-115>
22. Otlu B, Durmaz R, Günel S, Sola C, Zozio T, Rastogi N. Beijing/W and major spoligotype families of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from tuberculosis patients in Eastern Turkey. New Microbiol. 2009;32(3):255-63.
23. Aktaş E, Zozio T, Cömert FB, et al. A first insight into the genetic diversity and population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Zonguldak, Turkey. Clin Microbiol Infect. 2008;14(1):55-9. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01882.x>
24. Kisa O, Albay A, Baylan O, Tozkoparan E, Acikel CH, Doganci L. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates at the Military Medical Academy in Ankara, Turkey. Res Microbiol. 2007;158(4):318-23. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.01.004>
25. Zozio T, Allix C, Gunal S, et al. 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 Microbiol. 2005;5:44. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-44>
26. Durmaz R, Zozio T, Gunal S. Genetic diversity and major spoligotype families of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from different regions of Turkey. Infect Genet Evol. 2007;7(4):513-9. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.03.003>
27. Durmaz R, Zozio T, Gunal S, Allix C, Fauville-Dufaux M, Rastogi N. Population-based molecular epidemiological study of tuberculosis in Malatya, Turkey. J Clin Microbiol. 2007;45(12):4027-35. <https://doi.org/10.1128/JCM.01308-07>
28. Sürücüoğlu S, Günel S, Özkütük N. Molecular diversity of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Western Turkey. Balkan Med J. 2012;29(2):160-5. <https://doi.org/10.5152/balkanmedj.2012.012>
29. Koksalan OK, Kilicaslan Z, Zanlier G, Guzel R, Seber E. Prevalence of Beijing genotype *Mycobacterium tuberculosis* strains in Istanbul. Int J Tuberc Lung Dis. 2006;10(4):469-72.