



ISSN:1306-3111

e-Journal of New World Sciences Academy  
2012, Volume: 7, Number: 4, Article Number: 1B0034

**NWSA-MEDICAL SCIENCES**

Received: April 2012  
Accepted: September 2012  
Series : 1B  
ISSN : 1308-7312  
© 2010 www.newwsa.com

**Erkan Yula**  
**Melek İnci**  
**Ülkü Oral Zeytinli**  
**Ayşe Karacalı**  
**Fatih Köksal**  
Mustafa Kemal University  
erkanyula@gmail.com  
Hatay-Turkey

**HATAY İLİNDE İZOLE EDİLEN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS İZOLATLARININ  
SPOLIGOTYPING YÖNTEMİ İLE GENOTİPLENDİRİLMESİ**

**ÖZET**

*Mycobacterium tuberculosis* basili başta gelişmekte olan bölgeler olmak üzere dünya nüfusunun önemli bir oranını enfekte etmektedir. Çalışmanın amacı Hatay ilinden izole edilen *M. tuberculosis* izolatlarının genotiplerinin spoligotyping yöntemi ile belirlenmesidir. Çalışmaya 2010 ve 2011 yıllarına çeşitli örneklerinden soyutlanan 19 *M. tuberculosis* suşu dahil edildi. Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen örnekler BacT/ALERT MP şişelerine ekim yapıldı ve BacT/ALERT 3D sistemi kullanıldı. Üreme saptanan izolatlar, biyokimyasal özelliklerine göre tanımlandı. Bakteriyel DNA, Mickle doku parçalayıcısı ile izole edildi. *M. tuberculosis* kompleksi içinde yer alan izolatların genotipik özellikleri Spoligotyping yöntemi ile araştırıldı. Spoligotyping metodu ile en sık prevalansa sahip *M. tuberculosis* kökenleri: T1 ailesi (7, %36.8), LAM7 TUR ailesi (5, %26.3), T3 ailesi (3, %15.8), X3 ailesi (2, %10.5) ve H3 ailesi (2, %10.5) olarak tespit edildi. Sonuç olarak bölgemize ait eğemen suşun T1 ailesine ait suşlar olduğu, bunu ikinci sırada LAM7 TUR ailesinin izlediği görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** *Mycobacterium tuberculosis*, Spoligotyping, Genotip, Tüberküloz, Hatay

**GENOTYPING OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS STRAINS ISOLATED IN HATAY CITY BY  
SPOLIGOTYPING METHOD**

**ABSTRACT**

*Mycobacterium tuberculosis* bacilli infect a significant proportion of the world population and constitute a major public health problem, particularly in developing regions. The aim of the study is to determine genotypes of *M. tuberculosis* strains isolated from Hatay city by spoligotyping method. Nineteen *M. tuberculosis* strains isolated from various clinical samples between 2010-2011 years were included the study. The samples send to Mustafa Kemal University, Faculty of Medicine, Department of Microbiology laboratory were cultivated to BacT/ALERT MP bottles and BacT/ALERT 3D system were used. Culture positive samples were identified by biochemical properties. The DNA of bacteria was extracted using Mickle cell disruptor. Genotypes of the *M. tuberculosis* isolates were determined by spoligotyping method. The most prevalent *M. tuberculosis* lineages were: T1 family (7, 36.8%), LAM7 TUR family (5, 26.3%), T3 family (3, 15.8%), X3 family (2, 10.5%) and H3 family (2, 10.5%) by spoligotyping method. In conclusion, it is observed that the dominant strains were belong to T1 family and followed by LAM7 TUR family in our region.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, Spoligotyping, Genotype, Tuberculosis, Hatay

## 1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

*Mycobacterium tuberculosis*'in neden olduğu akciğer ve akciğer dışı tüberküloz (TB) enfeksiyonlarının önemi giderek artmaktadır [1]. Özellikle bağışıklık sistemini etkileyen HIV gibi enfeksiyonların, düşük sosyoekonomik düzey, kötü hijyen ve kalabalık yaşam koşullarının TB insidansını artırdığı bilinmektedir.

Dünya sağlık örgütü (DSÖ) tarafından 2011 yılında yayınlanan global tüberküloz kontrol raporuna göre, tahmini olarak 2010 yılında tüm dünyada 8.8 milyon TB vakasının olduğu, 1.1 milyon HIV negatif TB olgusunun öldüğü, ek olarak 0.35 milyon ölümün HIV pozitif TB olgularında gerçekleştiği bildirilmektedir [2]. Yine DSÖ verilerine göre Türkiye'de 2010 yılı içinde 15.183 yeni TB vakası raporlanmıştır [3].

Bağışıklık sistemini baskılayan kortikosterooidlerin ve antineoplastik benzeri ilaçların kullanımının artması, HIV prevalansındaki artış ile birlikte *M. tuberculosis* enfeksiyonlarının yeniden artış trendine girmesine yol açmıştır. Mikobakteriyel enfeksiyonların kontrolünde, hızlı, maliyet etkin, yüksek duyarlılık ve özgüllükte tanı yöntemlerine, daha etkili anti-tüberküloz ilaçların üretilmesine ve mikroorganizmanın toplum içerisindeki hareketlerinin ve bulaş mekanizmalarının tespitine imkan sağlayacak moleküler düzeyinde tanımlama yapabilen epidemiyolojik yöntemlerin ve sürveyans sistemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Moleküler epidemiyolojik yöntemler ile *M. tuberculosis* popülasyonunun genotipik karakterleri, muhtemel kaynak ve bulaş yolları, antijenik özellikleri, antibiyotik dirençleri ve coğrafi dağılımları gibi önemli prediktif bilgiler elde edilebilmektedir [4, 5 ve 6]. Ülkemizde bazı bölgelerde de varlığı bildirilen Beijing genotipine sahip *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının bölgemizde daha önce raporlanmamakla birlikte çoklu ilaç direncine sahip oldukları ve prevalanslarının dünya çapında giderek arttığı bildirilmektedir [7].

Literatürde özellikle endemik ve riskli bölgelerde tüberküloz epidemiyolojisi ile ilgili Spoligotyping ve Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit (MIRU) - Variable Number Tandem Repeats (VNTR) yöntemleri gibi moleküler bazlı yöntemler kullanılmaktadır [8 ve 9]. Spoligotyping yöntemi, PCR bazlı reverse dot blot hibridizasyon prensibinde çalışmakta ve klinik laboratuvarlarda, moleküler epidemiyoloji, evrim ve popülasyon genetiği araştırılmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Spoligotyping, tüberküloz enfeksiyonlarında en yaygın kullanılan epidemiyolojik yöntemlerdendir [10].

## 2. ÇALIŞMANIN ÖNEMİ (RESEARCH SIGNIFICANCE)

Tüberkülozun toplum içerisindeki yayılımı, endemileri ve epidemileri, reenfeksiyon ve reaktivasyon ayırımı moleküler bazlı epidemiyolojik yöntemlerle izlem altına alınabilmektedir. Çalışmanın amacı laboratuvarımızdan izole edilen *M. tuberculosis* izolatlarının spoligotyping yöntemi ile moleküler düzeyde tiplendirilmesi olarak belirlenmiştir.

## 3. MATERYAL VE METOD (MATERIALS AND METHODS)

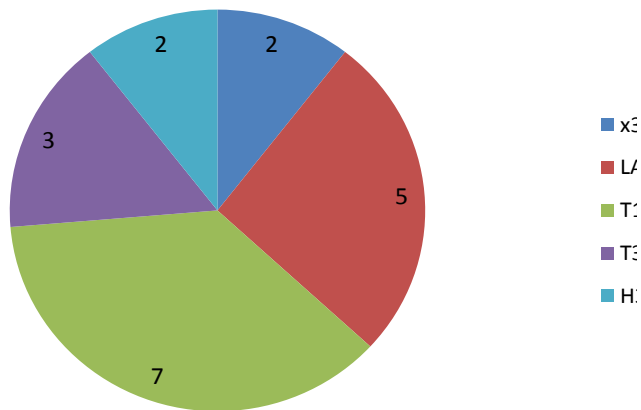
- **Örneklerin Seçilmesi ve Kültür:** Çalışmaya Hatay ilinde, 2010 ve 2011 yıllarına çeşitli örneklerinden izole edilen 19 *M. tuberculosis* suşu dahil edildi. Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına pulmoner ve ekstrapulmoner tüberküloz ön tanısı konan hastalardan gönderilen örnekler BacT/ALERT MP (BioMérieux, Fransa) şişelerine ekim yapıldı ve BacT/ALERT 3D (BioMérieux, Fransa) sistemi

kullanıldı. Aynı zamanda Lowenstein Jensen (BioMérieux, Fransa) besiyerine ekim yapılarak 37 °C'de 6-8 hafta inkübe edildi. Üreme saptanan suşlardan nitrat, niasin ve katalaz testleri pozitif olanlar ve parabenzoik asitli besiyerinde üremeyenler *Mycobacterium tuberculosis* olarak tanımlandı.

- **DNA İzolasyonu ve Moleküler Analiz:** Genotip tespiti Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji bölümünde gerçekleştirildi. *M.tuberculosis* izolatlarından DNA izolasyonu için Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinden mekanik parçalama yapan Mickle cihazını kullanarak gerçekleştirildi. Ekstraksiyon sonrası spektrofotometre ile DNA ölçümü yapılarak yeterli miktarda DNA bulunduğu kontrol edildi. *M. tuberculosis* kompleksi içinde yer alan izolatların genotiplendirilmesi Spoligotyping yöntemi ile araştırıldı. Özetle, spoligotyping metodunun PCR aşamasında 36 bp uzunluğunda DR bölgelerinin amplifikasyonu DRa: 5'-GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3' ve DRb: 5'-CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3' primer çiftleri ile amplifikasyon yapıldı. PCR sonrası elde edilen ampliconların hibridizasyonu gerçekleştirildi. Hibridizasyon ve hibridizasyon sonrası ürünlerin streptavidin alkalin fosfataz enzimi ve fosfatlı kemiluminesan substratı eklenerek görünür hale getirildi. Elde edilen veriler SpolDB4 veritabanı kullanılarak kümeler ve familyalar (clade) belirlendi [11].

#### 4. BULGULAR (FINDINGS)

Çalışmaya dahil edilen 19 *M. tuberculosis* izolatın Spoligotyping metodu ile tiplendirilmesi sonucu T1 ailesi 7(%36.8) suшта, LAM7 TUR ailesi 5(%26.3) suшта, T3 ailesi 3(%15.8) suшта, X3 ailesi 2(%10.5) suшта ve H3 ailesi 2(%10.5) suшта tespit edilmiştir. Sonuç olarak bölgemize ait eğemen izolatların T1 ailesine ait izolatlar olduğu, bunu ikinci sırada LAM7 TUR ailesinin izlediği belirlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. *M. tuberculosis* genotiplerinin grafiksel dağılımı  
(Figure 1. Grafical distribution of *M. tuberculosis* genotypes)

## 5. TARTIŞMA (DISCUSSION)

Günümüzde önemini artarak devam ettiren *M. tuberculosis* enfeksiyonları ciddi mortalite ve morbidite oranlarına yol açmaktadır. Tüberküloz, tüm dünyada AIDS'den sonra erişkinlerde en çok ölüme yol açan ikinci enfeksiyon hastalığıdır [12]. Bu nedenlerle patojenin klinik davranışının belirlenmesi kadar Beijing gibi anti-tüberküloz ilaçlara dirençli suşların ve genotiplerin bölgeler arasındaki dağılımının ve epidemiyolojik özelliklerin belirlenmesi etkenin biyolojik davranışını anlamaya ve korucu önlemler almaya yardımcı olacaktır. Günümüzde *M. tuberculosis* suşların izlenmesinde fenotipik karakterlere dayalı ayırımın yerini genotipik özelliklere dayalı spoligotipleme ve MIRU-VNTR yöntemleri almıştır.

Dong H. ve ark. [13] Çin'de 13 ayrı bölgeyi kapsayan ve 2.346 *M. tuberculosis* izolatının spoligotyping yöntemi ile tiplendirdikleri çalışmada en yüksek prevalansa sahip ailenin Beijing ailesinin (%74.08) olduğu ve bunu takiben T ailesinin (%14.11) olduğunu bildirmişlerdir. Meksikada, 2010 yılında Molina-Torres ve ark. [9] kırsal bölgelerden izole ettikleri 180 tüberküloz basilinini spoligotyping metodu ile genotiplendirmeleri sonucunda en sık görülen gen ailesinin 43 (%23,8) suş ile T1, ikinci sıklıkta görülen aileninde ise 28 (%15,5) suş ile X1 ailesi olduğunu bildirmişlerdir. Bulgaristan'ın farklı bölgelerinden izole edilen 113 *M. tuberculosis* suşunu, Spoligotyping ve MIRU-VNTR metodu ile genotipik özellikleri yönünden değerlendiren başka bir çalışmada ise en büyük kümenin %25,7'lik oran ile T1(ST53) ailesi suşlarına ait olduğunu, LAM7 TUR (ST41) ailesinin %5,4 oranı ile bunu takip ettiğini raporlamışlardır. Çalışmada LAM7 TUR sıklığının dünya ortalamalarının üzerinde bulunmasındaki etkenlerden birinin de Türkiye ile komşuluğu olabileceğini vurgulayan araştırmacılar, *M. tuberculosis* genotiplerinin yayılımında göçlerin önemini vurgulamışlardır [14]. Nieman S. ve ark. [15] 2010 yılında Gürcistan'da yaptıkları çalışmada Spoligotyping metodu ile 183 *M. tuberculosis* izolatını incelemişlerdir. Çalışmalarında suşların %26'sının Beijing, %18'inin LAM, %12'sinin Ural ve %5'inin de Haarlem ailelerine ait olduklarını bildirmişlerdir.

Ülkemizde ve Çukurova bölgesinde *M. tuberculosis* suşlarının klonal düzeyde suş tanımlaması yapabilen moleküler yöntemlerin kullanımı ile gerçekleştirilen çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Kisa O. ve ark. [16] 2012 yılında Ankara'da yaptıkları çalışma da 95 antibiyotik dirençli *M. tuberculosis* kompleksi üyesi klinik izolatları spoligotyping ile tanımlamışlardır. Çalışmalarında en çok prevalansa sahip *M. tuberculosis* kökenlerinin sırasıyla Haarlem (%24.2), T süper ailesi (%23.2), LAM7-TUR (%20), Beijing (%6.3) olduğunu tespit etmişlerdir. Durmaz R. ve ark. [17] 2007 yılında Malatya ilinde yaptıkları çalışmada 145 *M. tuberculosis* suşundan %23,9'unun LAM7 TUR ailesi içerisinde yoğunlaştığını bunu %22,5 oranı ile T1 ailesine ait suşların izlediğini bildirmişlerdir. Ülkemizde 2008 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise Zonguldak ilinde izole edilen 128 *M. tuberculosis* suşunu Spoligotyping ve MIRU-VNTR yöntemi ile incelemişler ve LAM7 TUR ailesine ait suşların %19,5 ile en sık karşılaşılan suşlar olduklarını bildirmişlerdir [18]. Zeytinli Ü. ve ark. [19] Hatay ilinin de bulunduğu Çukurova bölgesinde yaptıkları çalışmalarında 2007-2010 yılları arasında 467 *M. tuberculosis* izolatını spoligotyping ve MIRU-VNTR yöntemleri ile değerlendirmişler ve diğer çalışmalardan farklı olarak en yaygın olan ailenin 239 izolat (%51,9) ile T1 ailesi olduğu bunu 54 izolat (%11,5) ile LAM7 TUR ailesinin takip ettiğini bulmuşlardır. Biz de çalışmamızda tüberküloz şüpheli örneklerden izole edilen 19 *M. tuberculosis* izolatının Spoligotyping metodu ile tiplendirilmesi sonucu en sık genotipin T1

ailesine(%36.8) bunu takiben %26.3 oranıyla LAM7 TUR ailesinin yer aldığı tespit ettik. Çalışmamız Zeytinli Ü. ve ark.'nın [19] Çukurova bölgesindeki yaptıkları çalışmaya paralel olarak en sık tespit edilen kökenin değişmekle birlikte ilk iki sıklıkta tespit edilen genotiplerin birbirleri ile benzer olduğunu göstermiştir. Aradaki farklılığın Hatay ilinin Suriye ile yakın komşuluğu ve artan iki yönlü ziyaretçi akımları nedeniyle olabileceğini düşünmekteyiz.

#### 6. SONUÇ VE ÖNERİLER (CONCLUSION AND RECOMMENDATIONS)

Hatay ilinde *M. tuberculosis* enfeksiyonu ciddi bir halk sağlığı problemi olarak görülmemekle beraber, Suriye gibi ilimize komşu ülkelerden muhtemel göçler nedeniyle çoklu ilaç direncine sahip ve Beijing familyasına ait suşların geçebileceği göz önüne alınarak yüksek örnek sayısı ile çalışmanın devam etmesinin ve tüberküloz sürveyans çalışmalarının yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır. Spoligotyping yönteminin tüberküloz enfeksiyonunun tedavisindeki başarısızlıklarının farklı genotipteki bir suşla reinfeksiyon mu yoksa reaktivasyon mu olduğunun belirlenmesinde son derece yararlı olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızdaki örnek sayısı az olmakla birlikte ilimizdeki eğemen *M. tuberculosis* suşlarının T1 ve LAM7 TUR genotipi olduğu belirlenmiştir.

#### NOT (NOTICE)

Bu çalışma 7. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara'da 5-8 Haziran 2012 tarihlerinde poster sunum olarak sunulmuştur.

#### KAYNAKLAR (REFERENCES)

1. Steingart, K.R., Flores, L.L., Dendukuri, N., Schiller, I., Laal, S., et al., (2011). Commercial Serological Tests for the Diagnosis of Active Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS Medicine, Volume:8, Issue:8, e1001062.
2. WHO, (2011). Global Tuberculosis Control: WHO report 2011. World Health Organization. ISBN 978 92 4 156438 0. Chapter 2, pp: 9-10.
3. DSÖ web sitesi, www.who.int/tb/data. Erişim tarihi: 01.08.2012
4. Otal, I., Martin, C., Thierry, D., and Gicquel, B., (1991). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Using Is6110 As An Epidemiological Marker in Tuberculosis. J Clin Microbiol, Volume:29, Number:6 pp: 1252-1254.
5. Burgos, M.V. and Pym, A.S., (2002). Molecular Epidemiology of Tuberculosis. Eur Respir J, Volume:36, pp: 54-65.
6. Asgharzadeh, M. and Kafil, H.S., (2007). Current Trends in Molecular Epidemiology Studies of *Mycobacterium tuberculosis*. Biotechnology and Molecular Biology Review, Volume: 2, Number:5, pp: 108-115.
7. Koksalan, O.K., Kilicaslan, Z., Zanlier, G., Guzel, R., and Seber E., (2006). Prevalence of Beijing genotype *Mycobacterium tuberculosis* Strains in Istanbul. Int J Tuberc Lung Dis, Volume:10, Number:4, pp: 469-472.
8. Allix-Béguec, C., Fauville-Dufaux, M., and Supply, P., (2008). Three-Year Population-Based Evaluation of Standardized Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, Volume:46, Number:4, pp: 1398-1406.
9. Molina-Torres, C.A., Moreno-Torres, E., Ocampo-Candiani, J., Rendon, A., Blackwood, K., Kremer, K., Rastogi, N., Welsh, O.,

- and Vera-Cabrera, L., (2010). *Mycobacterium tuberculosis* Spoligotypes in Monterrey, Mexico. J Clin Microbiol, Volume:48, Number:2, pp: 448-455.
10. Silvana Spíndola de Miranda et al., ( 2011). Spoligotyping of clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from the State of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Volume:106, Number:3, pp: 267-273.
  11. Database adres: [http:// www.pasteurguadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/ outilsConsultation.jsp](http://www.pasteurguadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/outilsConsultation.jsp). Erişim tarihi: 01.02.2012.
  12. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı(2009). Türkiye’de Verem Savaşı 2009 Raporu. Ankara.
  13. Dong, H., Liu, Z., Lv, B., Zhang, Y., Liu, J., Zhao, X, Liu, J., and Wan, K., (2010). Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* From Different Provinces of China. J Clin Microbiol, Volume:48, Number:11, pp: 4102-4106.
  14. Valcheva, V., Mokrousov, I., Narvskaya, O., Rastogi, N., and Markova, N., (2008). Utility Of New 24-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Typing for Discriminating *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates Collected In Bulgaria. J Clin Microbiol, Volume:46, Number:9, pp: 3005-3011.
  15. Niemann, S., Diel, R., Khechinashvili, G., Gegia, M., Mdivani, N., and Tang, Y.W., (2010). *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Lineage Favors The Spread of Multidrug-Resistant Tuberculosis in the Republic of Georgia. J Clin Microbiol, Volume:48, Number:10, pp: 3544-3550.
  16. Kisa, O., Tarhan, G., Gunal, S., Albay, A., Durmaz, R., et al., (2012). Distribution of Spoligotyping Defined Genotypic Lineages among Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Complex Clinical Isolates in Ankara, Turkey. PLoS ONE, Volume:7, Number:1, e30331.
  17. Durmaz, R., Zozio, T., Gunal, S., Allix, C., Dufaux, M.F., and Rastogi, N., (2007). Population-Based Molecular Epidemiological Study of Tuberculosis in Malatya, Turkey. J Clin Microbiol, Volume:45, Number:12, pp: 4027-4035.
  18. Aktas, E., Zozio, T., Cömert, F.B., Külah, C., Aydın, O., Rastogi, N., and Sola, C., (2008). A First Insight Into The Genetic Diversity and Population Structure of *Mycobacterium tuberculosis* In Zonguldak, Turkey. Clin Microbiol Infect, Volume:14, Number:1, pp: 55-59.
  19. Zeytinli, Ü.O., (2010). Çukurova Bölgesinde Akciğer Tüberkülozlu Hastalardan İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Spoligotyping ve MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unitvariable Number of Tandem Repeat) Yöntemiyle Tiplendirilmesi. Yayınlanmamış Uzmanlık Tezi. Adana: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.



**Erkan YULA**  
**Melek İnci**  
**Ülkü ORAL ZEYTİNLİ**  
**Ayşe Karacalı**  
**Fatih KÖKSAL**

University of Mustafa Kemal, Faculty of Medicine, Department of  
Medical Microbiology

erkanyula@gmail.com

Hatay-Turkey

**e-Journal of New World Sciences Academy**  
MEDİKAL SCIENCES

\*Bu çalışma 7. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji  
Kongresi, Ankara'da 5-8 Haziran 2012 tarihlerinde poster sunum  
olarak sunulmuştur.