

ÜLKEMİZDEKİ İZOLATLARIN MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ

Prof Dr Rıza DURMAZ

İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

Yıllar içinde tüberkülozla mücadelede önemli ilerlemeler kaydedilmiş olmakla birlikte, Türkiye halen orta insidansa sahip ülkeler arasında yer almaktadır. Bir yanda yıllık tüberküloz insidansı 100000'de 100'ün üzerinde olan Eski Sovyetler Birliği, Orta Asya, ve Güney Afrika ülkeleri diğer yanda insidansın 100000'de 10'un altında olduğu Batı Avrupa ülkeleri yer almaktadır. 2005 Dünya Sağlık Örgütü kayıtlarına göre Türkiye'de 2003 yılı için tahmin edilen insidans 100000'de 26 olarak belirtilmiştir. Ülkemizde tüberküloz basilleriyle oluşmuş infeksiyon pevelansının da yüksek olduğu tahmin edilmektedir. 1980-1982 yıllarında %25 olarak belirlenmiş olan prevelansla ilgili olarak daha sonra herhangi bir çalışma yapılmamıştır (1). Yapılan birçok çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde, ülkemizde, erkeklerdeki tüberküloz insidansının kadınlardan en az 2.5 kat daha yüksek olduğu görülmektedir (2-4). Tüberküloz olgularının önemli bir kısmının pulmoner orijinli olduğu; pulmoner : ekstrapulmoner oranının 3-3.8 arasında değiştiği belirtilmiştir (2, 5, 6). Yüksek tüberküloz insidansına ilave olarak, anti-tüberküloz ilaçlara direnç oranları da oldukça dikkat çekici boyutlardadır. Ulusal direnç durumunu yansıtacak veri olmamakla birlikte, farklı illerden yapılan çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde başlangıç ve kazanılmış çoğul ilaca direnç oranlarının sırasıyla %1.3-4.8 ve %4.4-16.6 arasında değiştiği görülmektedir. En az bir ilaca karşı primer ve sekonder direnç oranları ise sırasıyla %18-26.6 ve %28-53.4 arasında görülmektedir (7-10). Yüksek insidans yanında primer ilaç direncinin de yüksek olması ülkemizdeki bulaş oranının yüksekliğini ve tüberküloz kontrol önlemlerinin yetersizliğini göstermektedir.

Tüberküloz insidansını gelişmiş ülkelerdeki seviyeye düşürmede erken tanı, doğru tedavi ve etkin korunma-kontrol önlemlerinin önemi açıktır. Etkin kontrol önlemlerinin alınmasında infeksiyonun kaynağı ve bulaş yollarının bilinmesinin büyük önemi vardır. Moleküler tipleme yöntemleriyle bir ülkedeki farklı topluluklar arasında tüberküloz basillerinin bulaş dereceleri belirlenebilmekte, gruplaşmalarla sporadik vakalar ayırt edilebilmektedir (4, 11-13). Genellikle, moleküler tiplemede aynı grup içinde yer alan Mycobacterium tuberculosis suşlarının izole edildiği

hastaların, tüberkülozu yeni bulaş sonucunda aldıkları kabul edilmektedir (14, 15). Yeni bulaş oranı hakkındaki bilgiler, tüberkülozun önlenmesi için daha etkili olabilecek programların geliştirilmesine büyük katkı sağlamaktadır (16). Moleküler tiplendirme yöntemleri, birçok ülkenin farklı topluluklarındaki tüberküloz hastalarından üretilmiş *M. tuberculosis* izolatları arasındaki klonal ilişkiyi araştırmak amacıyla yaygın halde kullanılmaktadır. Ancak, ülkemizdeki *M. tuberculosis* kökenlerinin moleküler epidemiyolojisi üzerine sınırlı sayıda yayın bulunmaktadır (3, 4, 17, 18).

Türkiye genelindeki *M. tuberculosis* izolatlarının genotipik profil farklılıklarını belirlemek amacıyla 7 coğrafi bölgeden 320 suş toplanmıştır. İzolatlar 1998 yılında, ülke genelinde rapor edilmiş mikroskopisi pozitif yeni akciğer tüberkülozlu 3692 olgunun %8.7'sini temsil etmektedir. Hastaların yaş ortalaması 36.717.8 yıl, erkeklerin kadınlara oranı ise 2.6'dır. Suşların tamamı, tüberküloz basillerinin tiplendirilmesinde altın standard olarak kabul edilen "IS6110-based restriction fragment length polymorphism" (IS6110 RFLP) yöntemiyle (19) tiplendirilmiş, pTBN12 tiplendirme yöntemi (20) ile IS6110 kopya sayısı 6 olup RFLP profili benzer olan 37 izolat ile IS6110 kopya sayısı 5 olup grup içinde yer alan 58 izolat için kullanılmıştır. IS6110-RFLP ile tiplendirilen 320 suşun 81 inde (%25.3) 1-5 adet, 235'inde (%73.4) 6-15 adet, 4'ünde (%1.3) 16-18 adet IS6110 kopyası saptanmıştır. Bu sonuçlara göre Türkiye genelinden toplanan tüberküloz basillerinin dörtte biri düşük sayıda (5) IS6110 kopyası bulundurmaktadır. İki tiplendirme yönteminin sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; incelenen 317 izolat içinde 216 (%68.9) farklı RFLP profili saptanmıştır. Profillerin 157 (%49.5)'si ayrı tüberküloz hastasından izole edilen suşlarda, 59 profilin her biri ise iki veya daha fazla hastada (toplam 160 hastada) ortak olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara gruplaşma oranı %50.5 olarak saptanmıştır. Bölgeler arasında RFLP farklılık derecesi benzerdir. Elli dokuz grubun 48 tanesi iki veya daha fazla coğrafi bölgeye ait hastaları içermektedir. Bu bulgu ülkemizdeki coğrafi bölgeler arasında tüberküloz basillerinin geçiş oranının oldukça yaygın olduğunu göstermektedir. Yaş, cinsiyet, önceden tüberküloz geçirmiş olmak ve anti-tüberküloz ilaçlarına dirençli olmanın suşların grup oluşturmaları üzerine anlamlı derecede etkili olmadığı gösterilmiştir (3). Diğer bir çalışmada; 2000 yılı süresince Malatya'da yeni akciğer tüberkülozu tanısı almış olan hastalardan izole edilen toplam 88 *M. tuberculosis* suşu içerisinde dirençli ve duyarlı olanların moleküler tiplendirme sonuçları karşılaştırılmıştır. İncelen

suşlar Malatya’da bir yıl içinde yeni akciğer tüberküloz tanısı almış 272 hastanın %32.4’ünü ve kültür pozitif olanların tamamını temsil etmektedir. Hastaların yaşı 2-74 yıl arasında değişmekte (ortalama 31.6117.7 yıl), 36 (%40.9)’sı kadın, 83 (%94.3)’ü pulmoner tüberküloz tanısı almıştır. Yirmi altı (%27.7) hasta geçmişte veya hali hazırda tüberküloz hastası olan bir aileden gelmekte, 4 (%4.5) hasta tüberküloz tanısı almış arkadaşına sahiptir. Suşların tamamı IS6110-RFLP yöntemiyle tiplendirilmiştir. IS6110 kopya sayısı 1-15 arasında değişmekte olup, düşük sayıda IS6110 kopya bulunduran suşların oranı %28.4 (25/88) olarak saptanmıştır. pTBN12 tiplemesi; kopya sayısı düşük olup, IS6110 RFLP yöntemiyle grup içine konulmuş olan 15 suş ile IS6110 RFLP profili benzer olan 9 suş için çalışılmıştır. Her iki tipleme yönteminin sonuçları birlikte değerlendirildiğinde Malatya’da bir yıl içindeki yeni tüberküloz olgularından izole edilen 88 suş arasından 69 (%78.4) farklı genotipleme profili elde edilmiştir. Bu profillerin 58 (%65.9) tanesi özgü (herbiri yalnızca bir hastaya ait), kalan 11 profil ise grup oluşturanlar olup, toplam 30 hasta içermektedir. Kümeleşme oranı %34.1 dir. En az bir major antitüberküloz ilaca dirençli ve duyarlı suşlarda kümeleşme (grup oluşturma) oranları sırasıyla %13.8 ve %30.5 olarak bulunmuştur ($p<0.01$). Grup oluşturmuş 30 hasta ile özgü profil gösteren 58 hasta yaş, cinsiyet, alkol tüketimi, Diabetes mellitus ve ilaç direnci açısından benzerlik göstermektedir. İncelenen hastalarının %21.6’sının ailesinde tüberküloz hastasının olması, Malatya’daki tüberküloz olgularının önemli bir kısmının aile içi bulaş sonucu geliştiğini desteklemektedir. Klasik epidemiyolojik veri toplamayla ilgili bütün çabalara rağmen, grup içinde yer alan hastaların yalnızca ikisinde ailesel ilişki doğrulanabilmiştir. Diğerleri arasında doğrudan ilişki olmamakla birlikte, hastaların hepsi ortak bir coğrafi bölgeye aittir. Bu bugular, Malatya’daki tüberküloz olgularının yakın geçmişteki bir bulaştan çok, geçmişten beri süregelen bir bulaşı yansıttığını desteklemektedir (4).

Üçüncü çalışma; Ege Bölgesi’nden toplanan 23’ü çoğul ilaca dirençli toplam 26 rifampin-dirençli *M. tuberculosis* suşu üzerinde yapılmıştır. Suşların %26.9’u düşük kopyalı suş olarak tanımlanmıştır. IS6110-RFLP ve pTBN12 tipleme yöntemlerinin sonuçları birlikte değerlendirildiğinde 21 (%80.7) farklı bant profili elde edilmiştir ve 26 suş içindeki kümeleşme oranı %34.6 olarak saptanmıştır (17).

Dördüncü çalışmada; Malatya’dan toplanmış 147 *M. tuberculosis* suşu ile

Ankara'dan toplanmış 98 suşun spoligotiplleme profilleri çıkarılmıştır. Toplam 71 spoligotipi saptanmış olup bunların 33 tanesi kümeleşmiş, 39'u ise özgü profillerdir. Spoligotipllemeye göre 206 suş kümeleşme içinde yer almaktadır ve kümeleşme oranı %84.1 dir. Sıklıkla saptanan spoligotipler şöyledir: Malatya'daki hastaların %58'den ve Ankara'dakilerin %38'den fazlası ST41 (LAM7-TUR, %21), ST53 (geçici olarak tanımlanmış T1 süperfamilya, %16.3), ST50 (Haarlem 3 familyası, %5.3) ve ST284 (isimlendirilememiş familya, %5.7) olarak adlandırılan dört tipten oluşmaktadır. Bu tiplerin Türkiye ve dünyadaki dağılımlarına bakıldığında; ST41'in Türkiye için predominan olduğu, ST53 ve ST50'nin Türkiye ve dünyanın diğer kısımlarında eşit dağılım gösterdiği, ST28'in ise dünya veri bankasında çok nadir olduğu ve bu tipin de lokal filoçoğrafi özellik gösterdiği belirlenmiştir. Suşların dörtte birini içermekte olan ST41 tipinden 34 suş, IS6110 RFLP ve MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) tiplleme yöntemleriyle tiplendirildiğinde, ilginç olarak bunların 21 tanesi iki adet IS6110 kopyası bulundurmakta ve "215125113322" MIRU-VNRT (Variable number of tandem repeats) profili göstermektedir. Filoçoğrafi olarak Türkiye'ye özgü olan bu yeni M. tuberculosis klonu, LAM7-TUR olarak tanımlanmıştır (18). IS6110 RFLP tiplmeleri de yapılmış olan Malatya'dan toplanan 147 suş ayrı olarak değerlendirildiğinde; spoligotiplleme 27 özgü, 19 grup (toplam 120 suş içermekte) halinde olan toplam 46 tip saptamıştır. Buna göre Malatya'dan toplanmış olan suşların %80.2'si grup içinde yer almaktadır. Grupların genişliği 2-33 suş arasında değişmektedir. Major M. tuberculosis familyalarına göre suşların dağılımı sırasıyla şöyledir: geçici olarak tanımlanmış (ill-defined) T süperfamilyası (45.7%)> Latin American and Mediterranean (LAM, 29%)> Haarlem (15.9%). İlginç olarak, Malatya'daki 147 suş arasından "Central Asian (CAS), East-African Indian (EAI), Beijing ve Africanum" süperfamilyalarına ait suş bulunamamıştır. IS6110-RFLP uygulamasıyla grup sayısı 18, grup içindeki suş sayısı 50'ye, kümeleşme oranı ise %34'e inmiştir.

Devam etmekte olan bir çalışmamızda Türkiye'nin üç coğrafi bölgesinden toplanan 49'u çoğul dirençli, 32'si çoğul dirençli olmayan 81 M. tuberculosis suşu IS6110-RFLP ve spoligotyping (20) yöntemleriyle tiplendirilmiştir. Otuz beş farklı spoligotip profili saptanmış olup bunların 27'si özgü, kalan 8'i ise 54 suş tarafından paylaşılmaktadır (kümeleşme oranı: %66.7). En yaygın olan spoligotip ST 41 (LAM7-TUR) olup 18 suşta (%22.2) saptanmıştır. Suşların major M. tuberculosis

familyalarına göre dağılımı sırasıyla şöyledir: LAM (37%)> T clade (32.1%)> Haarlem (13.6%). Bir Beijing ve bir CAS1-Delhi tip suşu bulunmuştur. Spoligotipleme ve IS6110 RFLP yöntemlerinin kombinasyonları, farklı genotipik profil sayısını 68'ye çıkarmış ve kümeleşme oranını %25.9'a düşürmüştür. Saptanan sekiz kümenin genişliği 2-6 suş arasında değişmektedir. Çoğul dirençli olan ve olmayan suşlardaki kümeleşme oranları sırasıyla %12.2 ve %6.3 olarak bulunmuştur. Düşük sayıda IS6110 kopya bulunduran suşların oranı %35.8 olarak saptanmış olup, Türkiye'deki diğer çalışmalarda belirtilmiş olan değerlerden yüksektir (21).

Sonuçlar:

- 1- Türkiye'deki M. tuberculosis suşlarının en az dörtte biri düşük sayıda (5) IS6110 kopya bulundurmaktadır.
- 2- Türkiye genelindeki M. tuberculosis suşlarında RFLP profil farklılık oranı $\geq$ %69 dur. Malatya ve İzmir bölgesinde saptanan değerler bundan daha düşük değildir.
- 3- Türkiye'deki tüberküloz hastaları arasındaki kümeleşme oranı %34-50.5 arasında değişmektedir.
- 4- Ortak profil gösteren izolatlar, çoğunlukla birbirine komşu iki bölgeye dağılmış durumdadır
- 5- Yaş, cinsiyet, alkol tüketimi sigara içmek ve antitüberküloz ilaçlara direnç durumu ortak profil oluşturma (kümeleşme) için anlamlı derecede risk faktörleri değildir
- 6- Bir yıl içindeki yeni bulaş oranları Malatya için %21.6, Türkiye geneli için %31.6 olarak hesaplanmıştır.
- 7- Tüberküloz insidansı, kümeleşme ve primer ilaç direnç oranlarının yüksek olması tüberküloz kontrol önlemlerinin yetersizliğini doğrulamaktadır.
- 8- Kümeleşen hastalar arasında doğrudan epidemiyolojik ilişkinin düşük olması, tüberküloz olgularının yakın geçmişteki bulaşından ziyade, devam etmekte olan bulaşı desteklemektedir
- 9- LAM, Haarlem ve geçici tanımlanmış (ill-defined) T süperfamilyası Türkiye'de saptanan üç major spoligotip familyasıdır
- 10- Predominant olarak saptanan tip LAM 7, Türkiye izolatları için özel bir spoligotip olarak görülmektedir
- 11- Beijing tipi henüz ülkemiz için önemli bir problem değildir.

KAYNAKLAR

- 1- Bilgiç H. Türkiye’de tüberkülozun durumu ve eradikasyon programı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, 11-12 Haziran, 2003 Samsun, Türkiye. s.18-33.
- 2- Ozkara S, Kiliçaslan Z, Öztürk F, ve ark. Bölge verileriyle Türkiye’de Tüberküloz. Toraks Dergisi 2002;3:178-187.
- 3- Durmaz R, Gunal S, Yang Z, Ozerol IH, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis in Turkey. Clin Microbiol Infect 2003; 9:873-7.
- 4- Durmaz R, Ozerol IH, Durmaz B, et al. Primary drug resistance and molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis isolates from patients in a population with high tuberculosis incidence in Turkey. Microbial Drug Resistance 2003;9:361 6.
- 5- Çiçek AM, Özkan S, Aktaş Z, Çağlar AŞ. Ankara il merkezindeki dispanserlerin 3 yıllık olgularının değerlendirilmesi. XXIII. Ulusal Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi. 3-5 Nisan 2003, Malatya. s.93.
- 6- Kolsuz M, Ersoy S, Demircan N ve ark. Eskişehir-Deliklitaş Verem Savaş Dispanseri’nde izlenen akciğer dışı tüberküloz olgularının değerlendirilmesi. Toraks Dergisi 2003;4:25-32.
- 7- Tahaoglu K, Kizkin O, Karagoz T, Tor M, Partal M, Sadoglu T. High initial and acquired drug resistance in pulmonary tuberculosis in Turkey. Tuber Lung Dis. 1994;75(5):324-8.
- 8- Talay F, Altın S, Çetinkaya E, Kümbetli Ş. İstanbul Eyüp verem savaş dispanserinde 1997-2000 yıllarında ilaç direnç oranları. XXIII. Ulusal Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi. 3-5 Nisan 2003, Malatya. s.89.
- 9- Çağlar AŞ, Çiçek AM, Özkan S, Çağlar A. Ankara’da akciğer tüberkülozlu hastalarda ilaç direnci. XXIII. Ulusal Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi. 3-5 Nisan 2003, Malatya. s. 90.
- 10- Yolsal N, Malat G, Dişçi R, Örkün M, Kılıçaslan Z. Türkiye’de tüberküloz ilaçlarına direnç sorununun 1984-1989 ve 1990-1995 yılları için karşılaştırılması: Meta-analiz, Klimik Dergisi 1998;1:6-9.
- 11- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A et al. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997;35:907-14.
- 12- Lari N, Rindi L, Sola C, et al. Genetic diversity, determined on the basis of

- katG463 and gyrA95 polymorphisms, Spoligotyping, and IS6110 typing, of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from Italy. *J Clin Microbiol.* 2005 ;43:1617-24
- 13- Godfrey-Faussett P, Sonnenberg P, Shearer SC et al. Tuberculosis control and molecular epidemiology in a South African gold-mining community. *Lancet* 2000;356:1066-71.
- 14- van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2578-86.
- 15- Barnes PF, Yang Z, Preston-Martin S et al. Patterns of tuberculosis transmission in Central Los Angeles. *JAMA* 1997; 278:1159-63.
- 16- Cronin WA, Golub JE, Lathan MJ et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in a low- to moderate-incidence state: Are contact investigations enough? *Emerg Infect Dis* 2002;8:1271-9.
- 17- Cavusoğlu C, Durmaz R, Bilgic A, Gunal S. Genotyping of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from western Turkey. *Ann Saudi Med* 2004;24:102-105.
- 18- Zozio T, Allix C, Günel 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.
- 19- van Embden JD, Cave MD, Crawford JT et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 406-9.
- 20- Chaves F, Yang Z, el Hajj H et al. Usefulness of the secondary probe pTBN12 in DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1118-23.
- 21- Durmaz R, Zozio T, Günel S. et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Turkey. 26th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, Istanbul, Turkey, June 26-29, 2005.