ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ YAYINLARI
ATATURK UNIVERSITY PUBLICATIONS

Araştırma Makalesi *Research Article* DOI: 10.5152/VetSciPract.2023.2308105

Multilokus Variable Number of Tandem Repeat Analiz (MLVA) Veri Tabanlarında Türkiye'den İzole Edilen *Bacillus anthracis* Genotiplerinin Moleküler Epidemiyolojisi

Molecular Epidemiology of *Bacillus anthracis* Genotypes Isolated From Turkey in Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis Databases

Ediz Kağan ÖZGEN

Tarım ve Orman Bakanlığı, Erzurum Veteriner Kontrol Enstitusu, Erzurum, Türkiye

Geliş Tarihi/Received: 15.02.2023
Kabul Tarihi/Accepted: 20.03.2023
Publication Date/Yayın Tarihi: 26.04.2023

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ediz Kağan ÖZGEN
E-mail: edizkagan.ozgen@tarimorman.gov.tr

Atıf: Özgen EK. Multilokus variable number of tandem repeat analiz (MLVA) veri tabanlarında Türkiye'den İzole edilen *Bacillus anthracis* genotiplerinin moleküler epidemiyolojisi. *Vet Sci Pract.* 2023; 18(1), 35-43.

Cite this article as: Özgen EK. Molecular epidemiology of *Bacillus anthracis* genotypes isolated from Turkey in multilocus variable number of Tandem repeat analysis databases. *Vet Sci Pract.* 2023; 18(1), 35-43.

Copyright@Author(s) - Available online at veterinarysciences-ataunipress.org
Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

ÖZ

Antraks, dünya genelinde insan ve hayvan sağlığını tehdit eden *Bacillus anthracis*'in neden olduğu önemli bir hastalıktır. *B. anthracis* doğada uzun süreler boyunca spor halinde kalması nedeniyle genetik olarak homojen bir yapı göstermektedir. Ancak epidemiyolojik olarak multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA), single nucleotide repeat (SNR), genome-wide single nucleotide polymorphism (SNP) gibi moleküler metotlar ile suşlar arasında ayrım yapılabilmektedir. Bu araştırmada, MLVA Bank for Genotyping Microbes veri tabanına yüklenmiş olan *B. anthracis* MLVA-8 genotiplerinin analiz edilmesi amaçlandı. Bu araştırmada veri tabanında bulunan 49 ülkeye ait 2313 genotip profili değerlendirildi. Toplamda 402 genotip, 24 klonal grup içerisinde dağılım gösterdi. Türkiye'ye ait genotipler ise, 8 grup içerisinde dağılım gösterdi. Türkiye genotiplerinden en yüksek sayıdaki genotip (%31) XXIV klonal grubunda yerleşim gösterdi. Analiz sonucunda tespit edilen genotiplerin %63,2'si IX, XXIII ve XXIV klonal grupları içerisinde yer aldı. Sonuç olarak, MLVA Bank for Genotyping Microbes veri tabanında bulunan genotipler içerisinde Türkiye genotipleri birçok ülkeden bildirilen genotiplerle yakın genotipik yapıya sahip olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Antraks, *Bacillus anthracis*, MLVA-8, moleküler epidemiyoloji

ABSTRACT

Anthrax is an important disease caused by *Bacillus anthracis* that threatens human and animal health worldwide. *B. anthracis* shows a genetically homogeneous structure because it can remain in the form of spores for a long time in nature. However, epidemiologically, it is possible to distinguish between strains with molecular methods such as multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, single nucleotide repeat, and genome-wide single nucleotide polymorphism. In this study, it was aimed to analyze the *B. anthracis* MLVA-8 genotypes uploaded to the Bank for Genotyping Microbes database by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis method. In this study, 2313 genotype profiles of 49 countries in the database were evaluated. In total, 402 genotypes were distributed within 24 clonal groups. Genotypes belonging to Turkey, on the other hand, show distribution in 8 groups. The highest number of genotypes (31%) among Turkey genotypes were localized in the XXIV clonal group. A total of 63.2% of the genotypes detected as a result of the analysis were included in the clonal groups IX, XXIII, and XXIV. As a result, among the genotypes in the MLVA Bank for Genotyping Microbes database, it was determined that the genotypes of Turkey were close to the genotypes reported from many countries.

Keywords: Anthrax, *Bacillus anthracis*, MLVA-8, molecular epidemiology

GİRİŞ

Bacillus anthracis (*B. anthracis*), Gram pozitif, sporlu, hareketsiz, basil şeklinde ve antraksın etiyolojik etkenidir.[1-3] Evcil ve yabani tüm memeli hayvanlarda enfeksiyon oluşturabilmektedir.[2] Antraks, dünya genelinde hayvan ve insan sağlığını tehdit eden genel olarak akut formda görülen bir hastalıktır.[3,4] Hastalık şarbon, woolsorters' disease, ragpickers' disease, malignant carbuncle, malignant pustule ve Siberian ulcer isimleriyle de bilinmektedir.[4] Bakteri sporlarının konak vücuduna girmesi sonrasında vejetatif hale dönüşmektedir. Vejetatif forma dönüştükten sonra bakteri tarafından salgılanan toksinler nedeniyle şiddetli bir hastalık tablosu oluşturmaktadır.[2] Enfekte hayvanlar genellikle 24 saat içerisinde ölmüş olarak bulunur.[4] İnsanlara enfeksiyonun bulaşması enfekte hayvanlarla direkt temas veya etken ile kontamine et, kıl ya da deri ile temas sonucunda meydana gelmektedir.[3,5]

Bakterilerin genomik karakterleri dinamiktir ve fenotipik karakterlerini belirlemektedir. Geçmişte bakteriler, fenotipik özelliklerindeki farklılıklarına göre ayrım sınıflandırılmaktaydı ancak moleküler metotların geliştirilmesiyle bakterilerin veya suşların ayrımında moleküler metotlar daha fazla kullanılmaktadır.[3] Dünya genelinde *B. anthracis*'in toplanan izolatlarından yürütülen moleküler araştırmalarda etkenin suşları arasında homoloji olduğu belirlenmiştir.[3] *B. anthracis* suşları arasında homolojinin olması nedeniyle yüksek ayrım gücü olan multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA), single nucleotide repeat (SNR), genome-wide single nucleotide polymorphism (SNP) analizleri ve tüm genom sekans analizi, *B. anthracis*'in ayrımında etkin kullanılan metotlardır.[2] Moleküler epidemiyolojik incelemelerde öncelikle canonical SNP (canSNP) analizi kullanılmaktadır. Bu analize göre, incelenen tüm *B. anthracis* izolatlarında yalnızca A, B ve C olmak üzere üç filogenetik hat oluşmaktadır. Bu üç hat içerisinde 14 filogenetik grup oluşmaktadır. A grubunda: A.Br.Ames, A.Br.Australia 94, A.Br.003/004, A.Br.Vollum, A.Br.005/006, A.Br.001/002, A.Br.Western, A.Br.WNA, A.Br.008/009, A.Br.011/009, B grubunda: *B.*Br.001/002, *B.*Br.KrugerB, *B.*Br.CNEVA, C grubunda ise yalnızca C.Br.A1055 genotipi bulunmaktadır. Tespit edilen canSNP tiplerinin alt türlerinin ayrımında MLVA metodu kullanılmaktadır.[6,7] MLVA metotları arasından MLVA-8 ilk olarak geliştirilen ve *vrrA*, *vrrB1*, *vrrB2*, *vrrC1*, *vrrC2*, *CG3*, *pXO1*-aat ve *pXO2*-at bölgelerindeki tekrarları analiz eden metot olmuştur.[3] Bu metotla 30 ülkedeki 426 izolatın 89 genotip olduğu belirlenmiştir.[2] Daha sonraki dönemlerde ise MLVA-15, MLVA-25 ve MLVA-31 metotları geliştirilmiştir.[2,3]

B. anthracis'in moleküler tiplendirmesinde MLVA son 10 yılda yaygın bir metot haline gelmiş olup bir ülke içerisinde *B. anthracis*'in yayılımının anlaşılmasını sağlayan bir metottur.[2,8] Kromozomal DNA üzerinde variable number tandem repeat (VNTR) lokusları, lokuslardaki tekrar sayılarına göre suşlar arasında büyük ölçüde farklılıkların gözlemlenebildiği bölgelerdir.[2] Bu çeşitliliğin nedeni, bakteriyel DNA'nın replikasyonu sırasında slip-strand mismatch repair mutasyonu veya DNA polimeraz enzimi DNA'nın replikasyonunda geriye doğru kayarak belirli bir bölgeyi iki kez tekrar edebilmesi sonucunda meydana gelmektedir.[2,9] Bu durum sonucunda oluşan tekrarlı bölgeler nesil olarak aktarılır.[9]

Bakterinin yayılımları canSNP metoduna göre isimlendirmesine göre incelenmektedir. Türkiye'de baskın genotip olan A.Br.Aust94 genotipi Avrupa ülkelerinde tespit edilen genotipler arasında çok düşük orandadır. Avrupa'nın kuzey ülkelerinde daha baskın olan *B.*Br.CNEVA, güney ülkelerinde ise yaygın olarak A3 grubu genotipler görülmekedir. Avrupa ülkelerinde yaygın olarak bildirilen A3 grubu genotipler Türkiye'de düşük orandadır. Türkiye'nin doğudaki komşusu olan Gürcistan'da da A3 grubu genotipler bildirilmektedir.[2] Türkiye'ye ait MLVA verilerinin tümünün MLVA-8 metoduna göre genotiplendirilmesi sebebi ile bu araştırmada dünya geneli *B. anthracis* MLVA-8 profilleri içerisinde Türkiye'den izole edilen *B. anthracis* genotiplerinin moleküler epidemiyolojisinin belirlenmesi ve Türkiye genotiplerinin diğer ülkelere göre benzerliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

B. anthracis MLVA-8 verilerinin toplanması

Araştırmanın veri tabanının oluşturulması amacıyla Keim ve ark'[10] in MLVA-8 metoduna göre analiz edilmiş toplam 2313 adet insan ve hayvanlardan izole edilen *B. anthracis* seçildi ve *vrrA, vrrB1, vrrB2, vrrC1, vrrC2, CG3, pXO1* ve *pXO2* lokuslarındaki tekrar sayıları toplandı (https://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases/view/9 Erişim Tarihi:17.08.2022). MLVA-8 verileri MLVA Bank for Microbes Genotyping veri tabanından alındı.[11] Toplam 49 ülkedeki *B. anthracis* verileri değerlendirmeye alındı. Alınan MLVA-8 verileri içerisinde aynı ülke içerisinde dublike olan veriler tek örnek haline getirilerek toplam 402 adet veri kümesi oluşturuldu. Veri kümesindeki her *B. anthracis* izolatı için izole edildiği ülke adıyla tablo oluşturuldu.

Çalışmada analiz edilen 2313 genotip içerisinde Türkiye'den toplam 336 adet *B. anthracis* genotipin MLVA Bank for Microbes Genotyping sistemine yüklenen ancak şehir bilgisi bildirilmeyen 32 genotip dışındaki 304 adet genotip şehir bilgileri ve izole edilen konak veya örnek ile değerlendirildi.

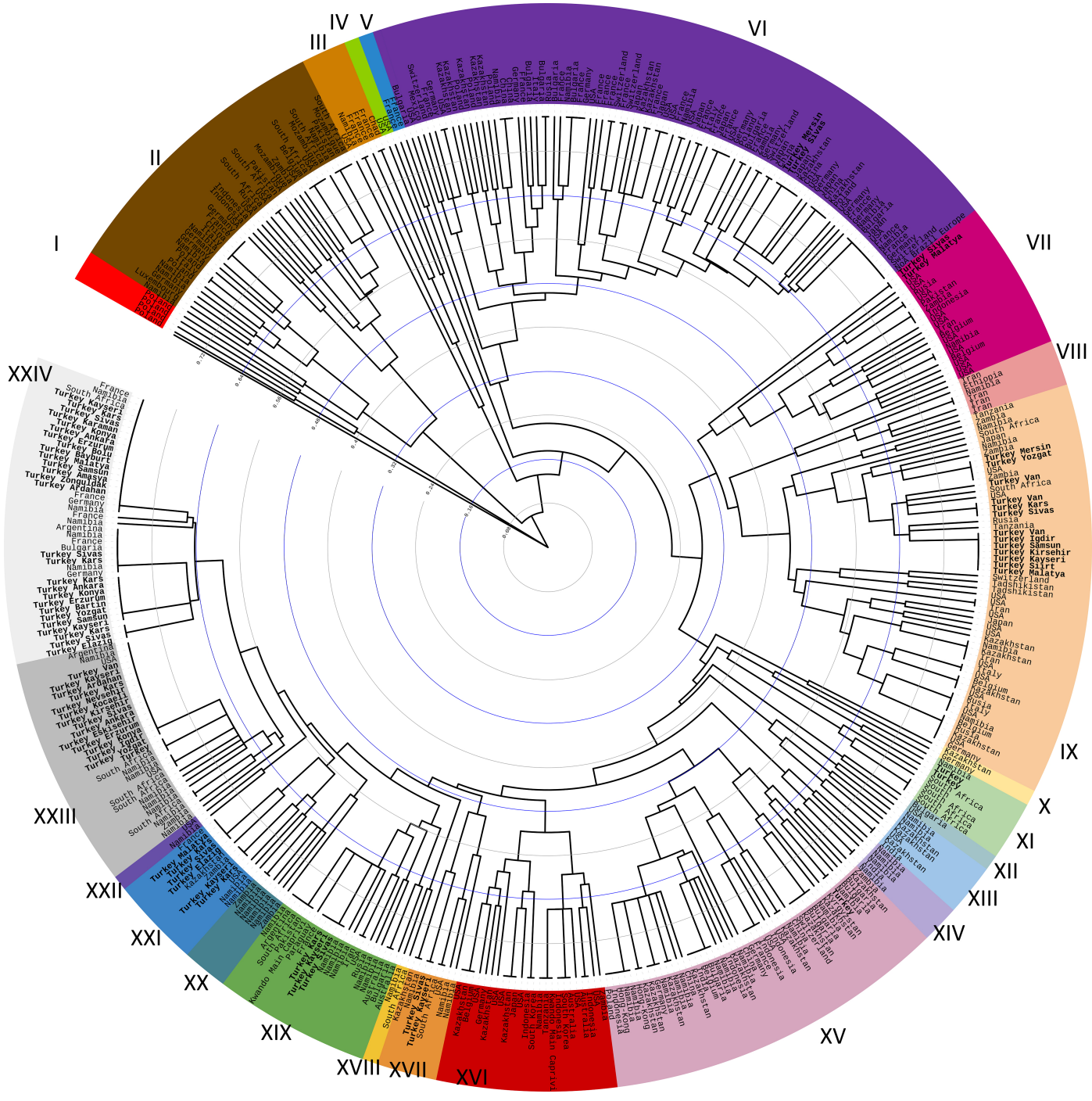
Veri Tabanının Kalıplarının Analizi

Verileri toplanan ve birleştirilen 402 adet *B. anthracis* MLVA-8 kalıplarının kümüleme analizleri için Past Software 4.06 kullanıldı. Veriler programa aktarıldıktan sonra unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA) metoduna göre analiz edildi. Benzerlik katsayısı olarak "Dice" kullanıldı.[12] UPGMA analizi sonucunda elde edilen clustering verilerine ait nexus dosyası elde edilerek Interactive Tree of Life (iTOL) v6 sistemine yüklenerek sirküler dendrogram oluşturuldu.[13] Aynı zamanda Türkiye'den bildirilen *B. anthracis* genotiplerinin izole edildikleri şehir, izole edildiği konak veya ortam ve genotip dağılımlarının gösterilmesinde chord dendrogram http://www.datasmith.org/ web sitesinde oluşturuldu.

BULGULAR

Toplam 2313 *B. anthracis* MLVA-8 verilerinin analizleri sonucunda toplam 24 klonal grup oluşturuldu (Şekil 1). MLVA verileri değerlendirildiğinde Türkiye'nin de aralarında yer aldığı 16 farklı ülkeden 88 genotipin bulunduğu görüldü. VI. grup, en geniş klonal grup olarak belirlendi. Analiz sonucunda, 49 farklı ülkeden elde edilen izolatların ülkelere göre dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir.

Türkiye'den analiz edilen *B. anthracis* izolatlarının 32'sinin şehir bilgisi bulunmamakta olup, Durmaz ve ark[14] tarafından verileri sağlanan 251 ile Ortatatlı ve ark[15] tarafından verileri sağlanan 53 olmak üzere toplam 304 *B. anthracis*'in 25 farklı şehirden alındığı belirlendi. Veri tabanına yüklenmiş olan Türkiye genotipleri en fazla Kars ilinden tespit edilen genotipler olup Türkiye genotiplerinin %32,2 (98/304)'sini oluşturmaktadır. Şehirler içerisinde en fazla farklı MLVA profiline sahip şehir ise, 39 *B. anthracis* izolatında 10 MLVA profiline sahip Sivas ilidir (Şekil 2). Türkiye'den yüklenen *B. anthracis* MLVA verilerinin 11 farklı klonal gruba dağılım gösterdiği



Şekil 1. *B. anthracis* genotiplerinin sirküler dendrogramı.

belirlenmiştir. Toplam 402 genotip değerlendirmesi sonucunda 24 klonal grup oluşmuştur (Şekil 1). Oluşturulan dendrogramdaki klonal gruplar ve gruplar içerisinde bulunan genotiplerin izole edildiği ülkelere ait veriler Tablo 2'de verildi.

İncelenen Türkiye MLVA profillerinin (Tablo 3.) en büyük kısmı Amasya, Ankara, Ardahan, Bartın, Bayburt, Bolu, Elazığ, Erzurum, Karaman, Kars, Kayseri, Konya, Malatya, Samsun, Sivas, Yozgat ve Zonguldak illerinden 27 MLVA genotipi XXIV klonal grubunda yerleşim gösterdiği belirlendi (Şekil 3). Diğer MLVA genotiplerinin klonal gruplara dağılımları sırasıyla 14 şehirden 14 genotip XXIII klonal grubu, 11 şehirden 13 genotip IX klonal grubu, beş farklı şehir altı genotip XXI klonal grubu, üç farklı şehirden üç genotip XIX klonal grubunda dağılım gösterdi. VI, VII ve XVII klonal gruplarının her birinde iki farklı şehirden genotipler olduğu tespit edildi.

Verilerin alındığı sistemde bildirilen *B. anthracis* genotiplerinin izole edildikleri konaklar hakkında bilgi mevcut değildi. Ancak, Durmaz ve ark[14] ile Ortatatli ve ark[15] verilerinden Türkiye genotiplerinin %32,2 (98/304)'i insan ve %67,8 (206/304)'i hayvan genotipi (163 sığır, 34 koyun, 6 keçi, 3 çevresel) olduğu belirlendi. İzole edilen konak veya ortam ile genotipler arasında değerlendirme yapıldığında; insan genotiplerinin en yoğun olarak IX ve XXIII klonal gruplarına yerleşim gösterdi bunun yanında sığır

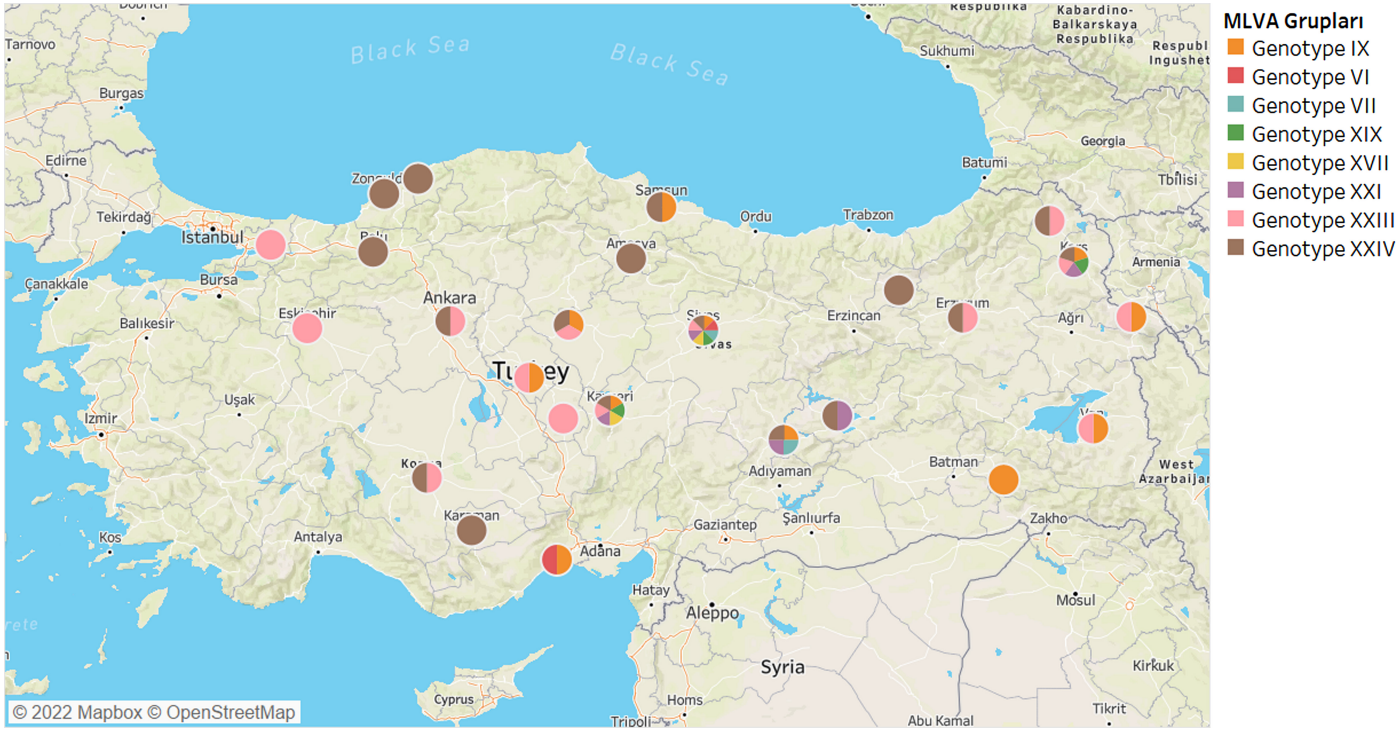
Tablo 1. MLVA bank for Microbes Genotyping Veri Tabanından Araştırmaya Alınan Genotiplerin Ülkelere Göre Izolat Sayıları ve Farklı Genotip Sayıları

Ülke	İzolat Sayısı	Farklı Genotip Sayısı	Ülke	İzolat Sayısı	Farklı Genotip Sayısı
ABD	85	55	İsviçre	10	4
Afganistan	28	4	İtalya	164	20
Afrika	1	1	Japonya	12	8
Almanya	84	33	Kamerun	23	2
Arjantin	12	8	Kanada	27	7
Arnavutluk	4	3	Kazakistan	20	11
Avustralya	6	3	Kırgızistan	1	1
Avusturya	2	2	Lüksemburg	1	1
Belçika	4	3	Macaristan	4	2
Birleşik Krallık	22	13	Meksika	2	1
Botsvana	1	1	Mozambik	7	3
Bulgaristan	40	7	Namibya	919	35
Çad	16	1	Norveç	11	5
Çin	213	31	Pakistan	12	6
Endonezya	8	4	Paraguay	1	1
Etiyopya	1	1	Polonya	32	12
Fransa	97	17	Rusya	13	2
Güney Afrika	11	19	Slovakya	4	3
Güney Kore	23	12	Tacikistan	3	2
Gürcistan	13	3	Tanzanya	4	2
Haiti	3	1	Tayland	4	3
Hindistan	6	4	Türkiye	336	33
Hong-Kong	2	2	Zambiya	6	3
İran	6	2	Zimbabve	7	4
İrlanda	2	1	*TOPLAM*	*2313*	*402*

genotiplerinin ise en fazla sayıda XXIII ve XXIV klonal gruplarında yerleşim gösterdi.

TARTIŞMA

B. anthracis'in doğal klonal yapısı, doğada uzun süre spor halinde kalması ve sporların uzun süre çoğalmaması etkenin genetik homojenlik göstermesi nedeniyle geleneksel metotlarla suşların ayrımı zordur. Dünya genelinde *B. anthracis*'in genotipik ayrımında MLVA ve canSNP analizleri kullanılmaktadır.[8] Bu araştırmada MLVA Bank for Genotyping veri tabanından seçilen 2313 adet *B. anthracis*'in 402 genotipi içerisinde Türkiye genotiplerinin dağılımları incelendi. İncelenen genotipler toplam 24 klonal grupta dağılım



Şekil 2. Türkiye'den bildirilen MLVA profillerin dağılımı genotiplerden 8 klonal grup oluşmaktadır. Şehirlerde bulunan genotipik gruplar farklı renklerle gösterilmiştir (Tableau Software 2022.2).

Tablo 2. Dendrogramda Tespit Edilen Klonak Gruplar ve Klonal Grup İçerisindeki Genotiplerin Izole Edildiği Ülkeler

Klonal Grup	Grup İçinde Bulunan Ülkeler	Klonal Grup	Grup İçinde Bulunan Ülkeler	Klonal Grup	Grup İçinde Bulunan Ülkeler	Klonal Grup	Grup İçinde Bulunan Ülkeler
I	Polonya	IX	ABD	XV	ABD	XX	Namibya
II	ABD		Almanya		Almanya		Zambiya
	Almanya		Belçika		Belçika	XXI	ABD
	Belçika		Güney Afrika		Bulgaristan		Fransa
	Çin		İran		Çin		Kazakistan
	Endonezya		İsviçre		Endonezya		Namibya
	Fransa		İtalya		Fransa		**Türkiye** Elazığ
	Güney Afrika		Japonya		Hindistan		**Türkiye** Kars
	İtalya		Kazakistan		Hong-Kong		**Türkiye** Kayseri
	Lüksenburg		Namibya		İsviçre		**Türkiye** Malatya
	Mozambik		Rusya		Kazakistan		**Türkiye** Sivas
	Namibya		Tacikistan		Kırgızistan		Zambiya
	Pakistan		Tanzanya		Namibya	XXII	ABD
	Polonya		**Türkiye** Iğdır		Polonya		Namibya
	Rusya		**Türkiye** Kars		**Türkiye**	XXIII	ABD
	Zambiya		**Türkiye** Kayseri		Zambiya		Arjantin
III	ABD		**Türkiye** Kırşehir	XVI	ABD		Güney Afrika
	Çad		**Türkiye** Malatya		Almanya		Namibya
	Fransa		**Türkiye** Mersin		Avustralya		**Türkiye** Ankara
	Namibya		**Türkiye** Samsun		Belçika		**Türkiye** Ardahan
IV	ABD		**Türkiye** Siirt		Endonezya		**Türkiye** Erzurum
V	Fransa		**Türkiye** Sivas		Güney Kore		**Türkiye** Eskişehir
VI	ABD		**Türkiye** Van		Japonya		**Türkiye** Iğdır
	Almanya		**Türkiye** Yozgat		Kazakistan		**Türkiye** Kars
	Bulgaristan		Zambiya		Namibya		**Türkiye** Kayseri
	Çin	X	Almanya		Tanzanya		**Türkiye** Kırşehir
	Fransa		Kazakistan		Zambiya		**Türkiye** Kocaeli
	İsviçre	XI	Güney Afrika	XVII	ABD		**Türkiye** Konya
	İtalya		Namibya		Güney Afrika		**Türkiye** Malatya
	Japonya		**Türkiye**		Kazakistan		**Türkiye** Nevşehir
	Kazakistan	XII	ABD		Namibya		**Türkiye** Sivas
	Meksika		Bulgaristan		**Türkiye** Kayseri		**Türkiye** Van
	Namibya	XIII	ABD		**Türkiye** Sivas		Zambiya
	Polonya		Hindistan	XVIII	Güney Afrika	XXIV	Almanya
	Rusya		Kazakistan		Namibya		Arjantin
	Türkiye Mersin		Namibya	XIX	ABD		Bulgaristan
	Türkiye Sivas	XIV	Hindistan		Arjantin		Fransa
VII	ABD		Namibya		Avustralya		Güney Afrika
	Belçika				Bulgaristan		Namibya
	Endonezya				Fransa		**Türkiye** Ankara
	İran				Güney Afrika		**Türkiye** Bartın
	Namibya				İran		**Türkiye** Elazığ
	Pakistan				Namibya		**Türkiye** Erzurum
	Rusya				Pakistan		**Türkiye** Erzurum
	Türkiye Malatya				Paraguay		**Türkiye** Kars
	Türkiye Sivas				Rusya		**Türkiye** Kayseri
	Zambiya				**Türkiye** Kars		**Türkiye** Konya
VIII	Etiyopya				**Türkiye** Kayseri		**Türkiye** Samsun
	İran				**Türkiye** Sivas		**Türkiye** Sivas
	Namibya						**Türkiye** Yozgat

gösterdi. Klonal gruplar içerisinde en büyüğü olan VI. grup içerisinde Bulgaristan,[16] Amerika Birleşik Devletleri,[10,17,18] Meksika,[18] İsviçre,[19] Fransa,[18,20] Almanya (MLVA Bank), Kazakistan,[21] Polonya,[18,22] Namibya,[23] Çin,[18] İtalya,[24,25] Rusya,[26] Japonya,[27] Zambiya,[18] Brezilya'dan[10] genotiplerle Türkiye'nin Mersin ve Sivas illerinden iki genotipinde aynı grupta yer aldığı tespit edildi. Bu klonal grup çok geniş coğrafi dağılım göstermesine rağmen analize dahil edilen Durmaz ve ark[14] ve Ortatatli ve ark[15] tarafından bildirilen 69 genotip içerisinden, Mersin ve Sivas illerinden olmak üzere yalnızca iki (%2,9) genotip profili bu grupta yerleşim göstermiştir. *B. anthracis*'in uzun yıllar doğada spor halinde bulunması genetik olarak homojen kalmasının en önemli sebebidir.[18] *B. anthracis*'in ülkeler arasında yayılımında tarihsel yönden hayvansal ürün ticaretinin etkili olduğu bildirilmektedir. Van Ert ve ark[18] tarafından Hindistan'dan alınan 10 adet *B. anthracis* izolatlarının aynı zamanda Avustralya'da da baskın genotip A.Br.Aust94 genotipi olduğu ve Avustralya'ya Asya üzerinden hayvan ürünlerin ticaretiyle yayıldığı bildirilmektedir.[18] Aynı zamanda A.Br.Aust94 genotipi Türkiye'de de baskın genotiptir.[2]

Türkiye'nin farklı şehirlerden Durmaz ve ark[14] ile Ortatatli ve ark'nın[15] bildirdiği *B. anthracis* genotiplerin dağılımları

Tablo 3. MLVABank for Microbes Genotyping sistemindeki Türkiye'ye ait *Bacillus anthracis* MLVA-8 Genotip Profilleri

Coğrafi Kaynak	Referans	vrrA	vrrB1	vrrB2	vrrC1	vrrC2	CG3	pXO1	pXO2
Türkiye	10	4	20	15	57	21	1	10	8
Türkiye	10	4	20	13	57	21	1	9	8
Türkiye	10	4	20	14	57	21	1	10	8
Türkiye	10	4	20	14	57	21	2	13	8
Türkiye	10	4	20	13	57	21	2	5	8
Türkiye	10	4	20	14	57	17	2	7	10
Türkiye	10	4	20	14	57	17	2	10	10
Türkiye	10	4	20	14	57	17	2	10	12
Türkiye	10	4	20	14	57	17	2	10	11
Türkiye	10	3	20	14	57	17	2	10	10
Türkiye	10	4	20	14	44	17	2	10	10
Türkiye	10	4	20	14	57	17	2	11	10
Türkiye	10	4	20	14	57	17	2	8	10
Türkiye	10	4	20	14	57	17	2	9	10
Türkiye	17	4	20	14	53	17	2	8	0
Türkiye	17	2	20	14	57	17	2	9	10
Türkiye	17	4	20	14	57	17	2	5	10
Türkiye	18	4	20	13	56	21	2	5	8
Türkiye: Amasya	14, 27	4	20	14	57	17	2	9	10
Türkiye: Ankara	14, 27	4	20	14	57	17	2	9	10
Türkiye: Ankara	14, 27	4	20	14	57	17	2	7	10
Türkiye: Ankara	14, 27	4	20	14	57	17	2	10	10
Türkiye: Ardahan	14	4	20	14	57	17	2	10	10
Türkiye: Ardahan	14	4	20	14	57	17	2	9	10
Türkiye: Bartın	14, 27	4	20	14	57	17	2	7	10
Türkiye: Bayburt	14, 27	4	20	14	57	17	2	9	10
Türkiye: Bolu	14, 27	4	20	14	57	17	2	9	10
Türkiye: Elazığ	14	4	20	14	57	17	2	9	12
Türkiye: Elazığ	14	4	20	14	57	17	2	6	10
Türkiye: Erzurum	14, 27	4	20	14	57	17	2	9	10
Türkiye: Erzurum	14, 27	4	20	14	57	17	2	7	10
Türkiye: Erzurum	14, 27	4	20	14	57	17	2	10	10
Türkiye: Eskişehir	14, 27	4	20	14	57	17	2	10	10
Türkiye: Igdır	14, 27	4	20	14	57	21	2	9	9
Türkiye: Igdır	14	4	20	14	57	17	2	10	10
Türkiye: Karaman	14, 27	4	20	14	57	17	2	9	10
Türkiye: Kars	14	4	20	14	57	21	2	9	11
Türkiye: Kars	14	4	20	14	57	17	2	9	10
Türkiye: Kars	14	4	20	14	57	17	2	9	9
Türkiye: Kars	14	4	20	14	57	17	2	7	10
Türkiye: Kars	14	4	20	14	57	17	2	10	10
Türkiye: Kars	14	4	20	14	57	17	2	6	10
Türkiye: Kars	14	4	20	14	57	17	2	9	12
Türkiye: Kars	14	4	20	14	57	17	2	8	10
Türkiye: Kars	14	4	20	14	57	17	2	9	11
Türkiye: Kayseri	14, 27	4	20	14	57	21	2	9	9
Türkiye: Kayseri	14	4	20	14	57	17	2	9	10
Türkiye: Kayseri	14	4	20	14	57	17	2	9	11
Türkiye: Kayseri	14, 27	4	20	14	57	17	2	7	10
Türkiye: Kayseri	14, 27	4	20	14	57	17	2	10	10
Türkiye: Kayseri	14	3	20	14	57	17	2	9	10
Türkiye: Kayseri	14	4	20	14	57	17	2	9	9
Türkiye: Kırşehir	14	4	20	14	57	21	2	9	9
Türkiye: Kırşehir	14	4	20	14	57	17	2	10	10
Türkiye: Kocaeli	14	4	20	14	57	17	2	10	10
Türkiye: Konya	14, 27	4	20	14	57	17	2	9	10
Türkiye: Konya	14, 27	4	20	14	57	17	2	7	10
Türkiye: Konya	14, 27	4	20	14	57	17	2	10	10
Türkiye: Malatya	14	4	20	14	57	21	2	9	9
Türkiye: Malatya	14	4	20	13	57	21	2	4	8
Türkiye: Malatya	14	4	20	14	57	17	2	9	12
Türkiye: Malatya	14	4	20	14	57	17	2	9	10

(*Continued*)

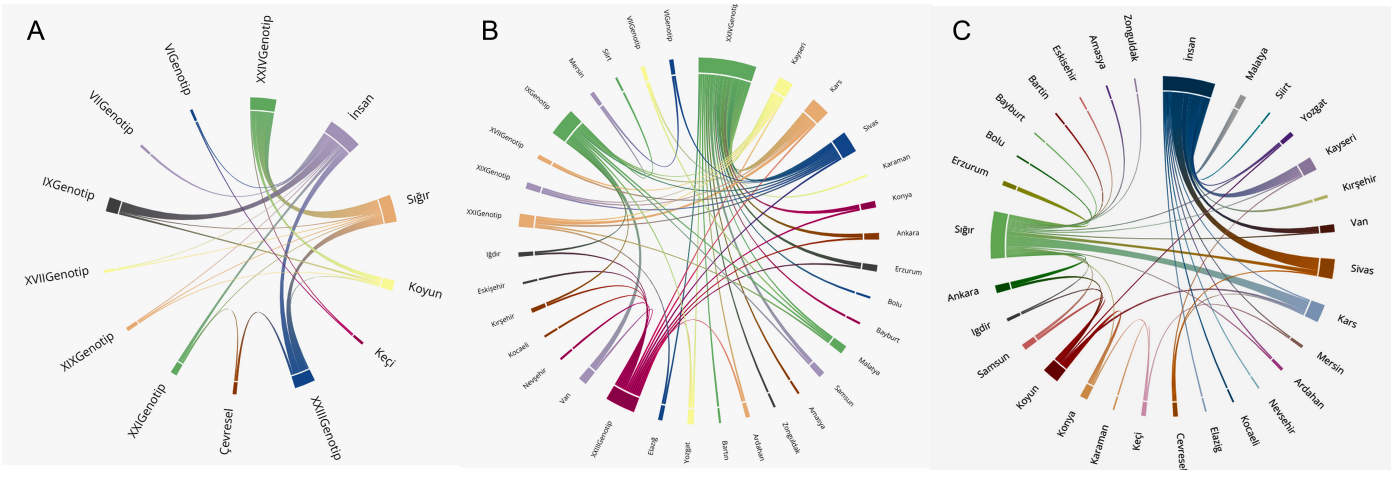
Tablo 3. MLVABank for Microbes Genotyping sistemindeki Türkiye'ye ait Bacillus anthracis MLVA-8 Genotip Profilleri (*Continued*)

Coğrafi Kaynak	Referans	vrrA	vrrB1	vrrB2	vrrC1	vrrC2	CG3	pXO1	pXO2
Türkiye: Mersin	14, 27	4	20	14	57	21	1	9	8
Türkiye: Mersin	14	4	20	14	57	21	2	9	8
Türkiye: Nevşehir	14	4	20	14	57	17	2	10	10
Türkiye: Samsun	14, 27	4	20	14	57	21	2	9	9
Türkiye: Samsun	14, 27	4	20	14	57	17	2	7	10
Türkiye: Samsun	14, 27	4	20	14	57	17	2	9	10
Türkiye: Siirt	14	4	20	14	57	21	2	9	9
Türkiye: Sivas	14	4	20	14	57	21	2	9	11
Türkiye: Sivas	14	4	20	14	57	21	1	9	8
Türkiye: Sivas	14	4	20	13	57	21	2	4	8
Türkiye: Sivas	14, 27	4	20	14	57	17	2	9	10
Türkiye: Sivas	14	4	20	14	57	17	2	10	10
Türkiye: Sivas	14	3	20	14	57	17	2	9	10
Türkiye: Sivas	14	4	20	14	57	17	2	9	12
Türkiye: Sivas	14	4	20	14	57	17	2	9	9
Türkiye: Sivas	14	4	20	14	57	17	2	8	10
Türkiye: Sivas	14	4	20	14	57	17	2	6	10
Türkiye: Van	14	4	20	14	57	21	2	9	9
Türkiye: Van	14	4	20	14	57	21	2	9	11
Türkiye: Van	14	4	20	14	57	17	2	10	10
Türkiye: Van	14	4	20	14	57	21	2	9	10
Türkiye: Yozgat	14, 27	4	20	14	57	21	2	9	8
Türkiye: Yozgat	14	4	20	14	57	17	2	7	10
Türkiye: Yozgat	14	4	20	14	57	17	2	10	10
Türkiye: Zonguldak	14, 27	4	20	14	57	17	2	9	10

incelendiğinde insan, sığır, koyun ve keçilerden izole edilen genotiplerin oluşturduğu XXIV klonal grubun en yüksek sayıda Türkiye genotipi bulundurduğu saptanmıştır. Bu grup içerisinde Amasya, Ankara, Ardahan, Bartın, Bayburt, Bolu, Elazığ, Erzurum, Karaman, Kars, Kayseri, Konya, Malatya, Samsun, Sivas, Yozgat ve Zonguldak illerinden toplam 27 genotip Arjantin,[17] Fransa (MLVA Bank), Nambiya,[23] Güney Afrika,[18] Almanya[18] ve Bulgaristan'dan[16] genotiplerle aynı grupta yerleşim gösterdi.

XXIII klonal grup, Durmaz ve ark[14] ile Ortatatli ve ark[15] tarafından bildirilen genotiplerin yoğunluk gösterdiği ikinci en büyük genotip grubudur. Bu grup içerisinde Ankara, Ardahan, Erzurum, Eskişehir, Iğdır, Kars, Kayseri, Kırşehir, Kocaeli, Konya, Nevşehir, Sivas, Van ve Yozgat illerinden genotipler bulunmakta olup, aynı grup içerisinde Arjantin,[18] Namibya,[10,18] ABD,[17,18] Güney Afrika[18] ve Zambiya[18] gibi ülkelerden bildirilen genotipler de bulunmaktadır. Ülkemizden bildirilen *B. anthracis* izolatları ortak atadan gelmekte olup, minor mutasyonlar nedeniyle farklı MLVA profilleri göstermekte olduğu düşünülmektedir.[14] Ülkemizin de içerisinde yer aldığı Akdeniz ve Avrupa'nın doğu ülkelerinde antraks yaygındır.[2]

Analiz edilen genotipler arasında Türkiye'ye komşu ülkelerden yalnızca Bulgaristan ve İran'a ait genotipler bulunmaktadır. Bulgaristan ile VI, XV ve XXIV klonal gruplarında Türkiye genotipleri de



Şekil 3. Türkiye'den bildirilen *B. anthracis* genotiplerinin konak, şehir ve genotip dağılımlarını gösterir chord dendrogram. (A) Türkiye'de izole edilen *B. anthracis*'lerin 8 genotip gruplarının insan, sığır, koyun, keçi ve çevresel orijinlerine göre dağılımları, (B) *B. anthracis* genotip grupları ile tespit edilen şehirlere göre dağılımları, (C) Türkiye'den bildirilen genotiplerin insan, sığır, koyun, keçi ve çevresel orijinlerine göre tespit edildiği şehirlere göre dağılımları.

bulunmuştur. Bunlar Amasya, Ankara, Ardahan, Bartın, Bayburt, Bolu, Elazığ, Erzurum, Karaman, Kars, Kayseri, Konya, Malatya, Mersin, Samsun, Sivas, Yozgat ve Zonguldak illerinden elde edilen genotiplerdir.[14,16] Türkiye ile İran genotipleri VII, IX ve XIX klonal gruplarında ortak olarak bulunmakta olup, bu genotipler ülkemizde de Iğdır, Kars, Kayseri, Kırşehir, Malatya, Mersin, Samsun, Siirt, Sivas, Van ve Yozgat illerindede tespit edilmiştir.[14,18] Ortatatli ve ark[15] Türkiye'de tespit edilen 55 adet *B. anthracis*'in MLVA metodu ile genotiplendirmesini gerçekleştirmiştir. Araştırmacılar tespit edilen genotiplerin bölgeler arasındaki hayvan hareket rotalarına göre dağılım gösterdiğini belirtmektedir.[15] Gerçekleştirilen analiz sonucunda, İran ile aynı klonal grup içerisinde bulunan genotiplerin genel olarak ülkemizin İç Anadolu, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu illerinden olmasına rağmen Bulgaristan ile yakınlık tespit edilen genotiplerin Türkiye'de belirli bir bölgede kümelenmediği belirlendi.

B. anthracis'in genotipik yapılarının araştırılması Amerika Birleşik Devletleri'ndeki biyoterörizm vakasından sonra daha da önem kazanmıştır.[28] MLVA yöntemi, *B. anthracis*'in genotiplendirmesinde kullanılan sağlam, hızlı ve kolay aktarılabilir bir metottur.[10] MLVA-8 metodu *B. anthracis*'in genotiplendirilmesinde kullanışlı bir metottur.[29] *B. anthracis*'in tiplendirmesinde canSNP ve MLVA'nın ikisinin birlikte kullanımı moleküler epidemiyoloji için yararlı olmasının yanında tarihsel sürecin izlenmesini de sağlamaktadır.[18] Ülkeler içerisinde *B. anthracis*'in genomik farklılıkların açıklaması olarak hayvan hareketlerinin yoğunluğu ile ilgili olabileceği bildirilmektedir.[8] Türkiye'den bildirilen genotiplerin 8 klonal grup içerisinde olması ise hayvan hareketlerinin yoğunluğu nedeniyle olduğu düşünüldü. Bunun yanında ülkeler içerisine hayvan ürünlerinin ithal edilmesinde de ülkede görülmemiş genotiplerin görülmesine neden olduğu bildirilmektedir.[30]

Sonuç olarak; MLVA Bank for Genotyping veri tabanında bulunan 2313 adet *B. anthracis* genotipinin verileri, 49 ülke ve 402 MLVA genotipi olacak şekilde daraltıldıktan sonra analiz edilerek Türkiye genotiplerinin dağılımları değerlendirilmiştir. Bu araştırma ile ülkemizden bildirilen genotiplerin dağılımlarının 8 klonal grupta yer aldığı belirlenmiş olup, ülkeler arası coğrafi dağılımda dünya genelinde yayılım göstermektedir. *B. anthracis*'in genotipleri homojen bir yapı göstermesine rağmen MLVA analizleri yapılarak epidemiyolojik takiplerinin sürekli yapılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

Etik Komite Onayı: Çalışmada herhangi bir hayvan veya insan örneği analiz edilmemiş olup MLVA Bank for Microbes Genotyping veritabanında bulunan veriler analiz edilmiştir. Bu nedenle Etik Kurul onayı alınmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazar çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Yazar bu çalışma için finansal destek almadığını beyan etmiştir.

Ethics Committee Approval: No animal or human samples were analyzed in the study, and data in the MLVA Bank for Microbes Genotyping database were analyzed. Therefore, Ethics Committee approval was not obtained.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Declaration of Interests: The author has no conflicts of interest to declare.

Funding: The authors declared that this study has received no financial support.

KAYNAKLAR

1. Koehler TM. *Bacillus anthracis* physiology and genetics. *Mol Aspects Med*. 2009;30(6):386-396. [CrossRef]
2. Derzelle S, Thierry S. Genetic diversity of *Bacillus anthracis* in Europe: genotyping methods in forensic and epidemiologic investigations. *Biosecur Bioterror*. 2013;11(suppl 1):S166-S176. [CrossRef]
3. Pilo P, Frey J. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infect Genet Evol*. 2018;64:115-125. [CrossRef]
4. WOAH. *Anthrax* (Terrestrial Manual, 8th edn, pp. 1–14). 2018.
5. Zasada AA. Detection and identification of *Bacillus anthracis*: from conventional to molecular microbiology methods. *Microorganisms*. 2020;8(1) [CrossRef]
6. Anisimova EA, Fakhrutdinov NA, Mirgazov DA, et al. *Bacillus anthracis* strain differentiation based on SNP and VNTR loci. *Vavilovskii Zhurnal Genet Selektsii*. 2022;26(6):560-567. [CrossRef]
7. Wang D, Wang B, Zhu L, et al. Genotyping and population diversity of *Bacillus anthracis* in China based on MLVA and canSNP analysis. *Microbiol Res*. 2020;233:126414. [CrossRef]
8. Rondinone V, Serrecchia L, Parisi A, et al. Genetic characterization of *Bacillus anthracis* strains circulating in Italy from 1972 to 2018. *PLoS One*. 2020;15(1):e0227875. [CrossRef]
9. Keim P, Gruendike JM, Klevytska AM, Schupp JM, Challacombe J, Okinaka R. The genome and variation of *Bacillus anthracis*. *Mol Aspects Med*. 2009;30(6):397-405. [CrossRef]
10. Keim P, Price LB, Klevytska AM, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol*. 2000;182(10):2928-2936. [CrossRef]
11. Grissa I, Bouchon P, Pourcel C, Vergnaud G. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie*. 2008;90(4):660-668. [CrossRef]
12. Aslan S. *Klinik örneklerden izole Edilen Brucella izolatlarının epidemiyolojik özelliklerinin multi-locus Variable Number Tandem Repeat Analysis ve Pulsed Field Gel Electrophoresis Yöntemleri ile Tespiti*. Dissertation. Çukurova University; 2015.
13. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res*. 2021; 49(W1):W293-W296. [CrossRef]
14. Durmaz R, Doganay M, Sahin M, et al. Molecular epidemiology of the *Bacillus anthracis* isolates collected throughout Turkey from 1983 to 2011. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(10):2783-2790. [CrossRef]
15. Ortatatli M, Karagoz A, Percin D, Kenar L, Kilic S, Durmaz R. Antimicrobial susceptibility and molecular subtyping of 55 Turkish *Bacillus anthracis* strains using 25-loci multiple-locus VNTR analysis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2012;35(4):355-361. [CrossRef]
16. Antwerpen M, Ilin D, Georgieva E, Meyer H, Savov E, Frangoulidis D. MLVA and SNP analysis identified a unique genetic cluster in Bulgarian *Bacillus anthracis* strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011; 30(7):923-930. [CrossRef]
17. Sue D, Marston CK, Hoffmaster AR, Wilkins PP. Genetic diversity in a *Bacillus anthracis* historical collection (1954 to 1988). *J Clin Microbiol*. 2007;45(6):1777-1782. [CrossRef]
18. Van Ert MN, Easterday WR, Huynh LY, et al. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One*. 2007;2(5):e461. [CrossRef]
19. Pilo P, Perreten V, Frey J. Molecular epidemiology of *Bacillus anthracis*: determining the correct origin. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74(9):2928-2931. [CrossRef]
20. Fouet A, Smith KL, Keys C, et al. Diversity among French *Bacillus anthracis* isolates. *J Clin Microbiol*. 2002;40(12):4732-4734. [CrossRef]

21. Aikembayev AM, Lukhnova L, Temiraliyeva G, et al. Historical distribution and molecular diversity of *Bacillus anthracis*, Kazakhstan. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(5):789-796. [CrossRef]
22. Gierczyński R, Kałuzewski S, Rakin A, et al. Intriguing diversity of *Bacillus anthracis* in eastern Poland – the molecular echoes of the past outbreaks. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;239(2):235-240. [CrossRef]
23. Beyer W, Bellan S, Eberle G, et al. Distribution and molecular evolution of *Bacillus anthracis* genotypes in Namibia. *PLOS Negl Trop Dis*. 2012;6(3):e1534. [CrossRef]
24. Fasanella A, Van Ert M, Altamura SA, et al. Molecular diversity of *Bacillus anthracis* in Italy. *J Clin Microbiol*. 2005;43(7):3398-3401. [CrossRef]
25. Lista F, Faggioni G, Valjevac S, et al. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis. *BMC Microbiol*. 2006;6:33. [CrossRef]
26. Wattiau P, Klee SR, Fretin D, et al. Occurrence and genetic diversity of *Bacillus anthracis* strains isolated in an active wool-cleaning factory. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(13):4005-4011. [CrossRef]
27. Okutani A, Sekizuka T, Boldbaatar B, Yamada A, Kuroda M, Inoue S. Phylogenetic typing of *Bacillus anthracis* isolated in Japan by multiple locus variable-number tandem repeats and the comprehensive single nucleotide polymorphism. *J Vet Med Sci*. 2010;72(1):93-97. [CrossRef]
28. Van Belkum A. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;49(1):22-27. [CrossRef]
29. Yudianingtyas DW, Sumiarto B, Susetya H, et al. Identification of the molecular characteristics of Bacillus anthracis (1982-2020) isolates in East Indonesia using multilocus variable-number tandem repeat analysis. *Vet World*. 2022;15(4):953-961. [CrossRef]
30. Lienemann T, Beyer W, Pelkola K, et al. Genotyping and phylogenetic placement of *Bacillus anthracis* isolates from Finland, a country with rare anthrax cases. *BMC Microbiol*. 2018;18(1):102. [CrossRef]