

## Sığır tüberkülozunun PCR ile tanısı ve *Mycobacterium bovis*'in spoligotiplendirme yöntemi ile genotiplendirilmesi\*

Hakan YARDIMCI<sup>1</sup>, Can Bora ÜNAL<sup>2</sup>, Lale (KÖKÇÜ) ATASEVEN<sup>3</sup>, Barış SAREYYÜPOĞLU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı-Ankara; <sup>2</sup>Iontek Biyoteknoloji Ltd. Şti. 34010 Merter-İstanbul; <sup>3</sup>Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü, Bakanlıklar, Ankara.

**Özet:** Bu çalışmada, Ankara çevresindeki mezbahalardan toplanan tüberküloz şüpheli 36 sığıra ait 72 doku örneğinde (36 lenf yumrusu ve 36 kan örneği) Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (real-time PCR) ile *Mycobacterium bovis* DNA'sı arandı ve DNA'lar spoligotiplendirme yöntemi ile genotiplendirildi. Bu amaçla, ilk olarak sığır kan ve lenf yumrusu dokuları *Mycobacterium bovis* AN/5 suşu ile karıştırılarak PCR optimizasyonu için kullanıldı. PCR Light Cyclers (Real-Time Florescent deteksiyon yapan) sisteminde optimize edildi. Tüm PCR süresi toplam 40 dk olarak belirlendi. Amplikonların 92.176°C'de tamamen ayrıldığı, diğer bir deyişle, floresan yoğunluklarını kaybettikleri görüldü. Bu sıcaklık (erime noktası) primerlerin (DRa ve DRb) amplifiye ettiği bölgeye spesifiktir. PCR sensitivitesi 6 cfu/2 µl = 3 cfu/µl olarak belirlendi. Toplam 72 doku örneğinde, 36 lenf yumrusu numunesinden 9 *M. bovis* DNA'sı PCR ile amplifiye edildi ve ELISA ile gösterildi. Kan numunelerinde herhangi bir amplifikasyon kaydedilemedi. Spoligotiplendirme yöntemi mikroplyetlerde uygulandı. Mikroplyetlere bağlanan 43 farklı oligonükleotid 9 PCR ürünü ile hibridize edildi. Sonuç olarak 9 *M. bovis* DNA'sında 3 farklı spoligotip ortaya konuldu.

Anahtar sözcükler: *Mycobacterium bovis*, PCR, Spoligotiplendirme.

### Diagnosis of bovine tuberculosis by PCR and genotyping of *Mycobacterium bovis* by spoligotyping

**Summary:** In this study, the presence of *Mycobacterium bovis* DNA was investigated by Real-Time PCR in 72 tissue samples (36 of which were lymph nodes and 36 were blood samples) from 36 cows, suspected of having bovine tuberculosis, slaughtered at abattoirs in Ankara. *M. bovis* DNAs were genotyped by spoligotyping method. For this reason, bovine blood and lymph node tissues were spiked with *M. bovis* AN/5 strain and were used for PCR optimization. PCR optimization was done in Light Cyclers (performing Real-Time Florescent detection) system. Total PCR time was found to be 40 min. Amplicons were detected to lose their fluorescent densities (in other words they were totally denatured) at 92.176C. This situation was specific for the region specifically amplified by the primers DRa and DRb. PCR sensitivity was determined as 6 cfu/ 2 ul = 3 cfu/ul. 9 *M. bovis* DNA from 36 lymph nodes out of 72 tissues samples were amplified by PCR and these were detected by ELISA. No amplification was recorded from blood samples. Spoligotyping method was performed in microplates. 43 different oligonucleotides coated in microplate wells were hybridized with 9 PCR amplicons. As a result, 3 different spoligotypes were detected in 9 *M. bovis* DNA samples.

Key words: *Mycobacterium bovis*, PCR, Spoligotyping.

### Giriş

Tüberküloz gerek hayvan ve gerekse insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen, akciğer başta olmak üzere diğer organ ve dokularda kazeöz ve kazeökalserez karakterde tüberküllerin oluşması ile beliren kronik, bulaşıcı ve zoonotik bakteriyel bir hastalıktır. *Mycobacterium tuberculosis* insan, *Mycobacterium bovis* sığır ve *Mycobacterium avium* kanatlı kökenli tüberkülozun başlıca etkenleridir (4). Türkiye'de 3285 sayılı Hayvan Sağlığı ve Zabıtası Kanunu ve Yönetmeliğine göre sığır tüberkülozu ihbarı mecburi ve mücadelesi zorunludur (1, 2).

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real-time PCR), amplifikasyonun eş zamanlı olarak floresan

sinyal ile ölçüldüğü ve kantitasyona olanak sağlayan bir PCR tekniğidir. Dünyadaki 3 tip real-time PCR sistemi (iCycler, Bio-Rad; Taq Man, Perkin Elmer ve LightCycler, Roche)'nden biri olan LightCycler PCR sistemi, kapiller PCR ile hedef DNA'nın amplifikasyonu, amplifiye olan DNA'nın gerçek-zamanlı olarak floresan artışı ile gözlenmesi ve PCR sonunda, amplikonun spesifitesini ortaya koymak için erime sıcaklığı (temperature of melting) analizini 40 dk gibi kısa bir sürede (konvansiyonel PCR ve jel elektroforezi ile karşılaştırılınca) gerçekleştirebilen bir donanımdır. Aynı anda, 32 klinik örneği birden test edebilen bu sistemde, oluşan amplikonun deteksiyonu amplikonu taşıyan

\* Tübitak tarafından desteklenen VHAG-1501 no'lu projeden özetlenmiştir.

kapillerler çıkarılıp, ayrıca jel elektroforezine tabi tutulmayacağı için, çevre kontaminasyon riski de taşımaktadır (5).

*M. bovis*'in genotiplendirilmesinde, DNA polimorfizmine dayanan yöntemler kullanılmaktadır. Son zamanlarda DR (Direct Repeat) bölgesinin PCR amplifikasyonuna dayanan "*spoligotyping*" (spacer oligotyping) bu tekniklere eklenmiştir (8, 13). Bu yöntemlerin her birinin üstün ya da zayıf yönleri bulunmaktadır. İnsersiyon sekans 6110 (IS6110)'un restriction fragment length polymorphism (RFLP)'si birçok araştırmacıya göre mükemmel olmasına karşın fazla miktarda DNA'ya gereksinim duyması ve restriksiyon paternlerinin analizi için ileri bilgisayar yazılımları gerektirmektedir. Spoligotyping yöntemi ise daha ucuz, hızlı ve kolay bir yöntem olarak bildirilmektedir. Bu yöntemde RFLP'ye gerek yoktur, daha kısa sürmektedir ve komplike olmayan bilgisayar yazılımları ile yapılabilmektedir (3, 6, 7, 8). İşaretli oligonukleotid emdirilmiş membranlarda PCR ürününün hibridizasyonu ve sonucun bilgisayar ortamında değerlendirilmesi ile genotipik farklılıklar ortaya konulabilmektedir. Direkt olarak dokulardan yapılan PCR ve hibridizasyon işlemi ile sonucun alınması kısa sürmesi, ekonomik ve sensitivitesinin yüksek olması son yıllarda yapılan çalışmalarda bildirilmektedir (6, 7, 13).

Bu çalışmada, Ankara çevresindeki mezbahalardan toplanan tüberküloz şüpheli örneklerde real-time PCR ile *M. bovis* DNA'sı aranması ve saptanan DNA'ların spoligotiplendirme yöntemi ile genotiplendirilmesi amaçlandı.

## Materyal ve Metot

### Standart Mikobakteri Suşları

PCR ve spoligotiplendirme çalışmalarında Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Tüberküloz-Paratüberküloz ve Ruam Teşhis Laboratuvarı'ndan sağlanan standart *M.bovis* AN/5 suşu kullanıldı.

### Mezbaha örnekleri

Akyurt Belediyesi ve Ankara Ticaret Odası Sincan mezbahalarında postmortem tüberküloz tanısı koyulan 36 sığıra ait lezyonlu lenf nodülü ve kalpten alınan anti-coagulanlı (EDTA'lı) kan örnekleri toplandı.

### PCR testlerinde kullanılan primerler

PCR prosedürü, Kamerbeek ve ark (8) tarafından tanımlanan ve Aranaz ve ark. (3) tarafından kullanılan DRa 5'-GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3' ve DRb 5'-CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3' primerleriyle gerçekleştirildi. DRb aynı zamanda 5'ucundan biotin işaretli olarak ta sentezlendi. Bu primerler spoligotiplendirme yapılacak DR bölgesinin amplifikasyonunda kullanıldı.

### Spoligotiplendirme problemleri

Spoligotiplendirme problemleri Kamerbeek ve ark (8) bildirdiğine göre ve plate bağlanmasını sağlayacak şekilde 3 uçlarına TTT TTT TTT T-3'-NH<sub>4</sub> ilave edilerek İontek A.Ş. (İstanbul, Türkiye) tarafından sentezlendi.

### PCR tekniğinin uygulanması

*Yapay örnek hazırlama ve deteksiyon limiti belirleme:* PCR tekniğinin optimizasyonu için mezbahalardan alınacak klinik örneklerin benzerleri yapay olarak hazırlandı. Bunun için önce *M. bovis* AN/5 standart suşu üretilip sayıldı sonra da değişik sayıları hazırlanan dokulara karıştırıldı. Bu amaçla, gliserinsiz Lowenstein Jensen besi yerinde üretilen *M. bovis* AN/5 saf kültürü içi cam boncuklu steril bir tüp içerisinde PBS (pH.6.8) ile homojenize edildikten sonra yoğunluğu McFarland 1'e göre ayarlandı. Bu, ana sulandırma olarak kabul edildi ve 10<sup>-1</sup>'den başlayarak 10 katlı seri sulandırmalar şeklinde 10<sup>-7</sup>'e kadar dilue edildi. Her bir dilusyondan 6 seri Lowenstein Jensen besiyerine 150'şer µl ekim yapıldı. Ekimlerin yüzeye iyice yayılması için önce yatık durumda 37°C'de 48 saat tutulan besiyerleri, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde dik konumda 6 hafta inkube edildi. Bu süre sonunda üreyen koloniler sayıldı. Lenf yumrusu ve kan doku örneklerinin hazırlanması için, sağlıklı bir hayvandan alınan lenf yumrusu doku örneği steril %0.85'lik NaCl ile 1/1 oranında karıştırılarak homojenize edildi. Aynı hayvandan alınan EDTA'lı kan örneği ise direkt olarak kullanıldı. *M. bovis* ile infekte yapay örnekler için 100 µl homojenize lenf yumrusu dokusu ve 100 µl kan örneği yukarıda seri sulandırmaları yapılan ve her bir sulandırmadaki bakteri sayısı belirlenen standart *M. bovis* AN/5 dilasyonları ile 1/1 (100 µl doku / 100 µl bakteri) oranında karıştırıldı. Bakteri ilave edilmemiş lenf yumrusu ve EDTA'lı kan dokusu örnekleri negatif kontrol olarak kullanıldı. Pozitif kontrol için ise *M. bovis*'in ana sulandırması kullanıldı (Tablo 1).

Tablo 1. PCR'da sulandırmalardan reaksiyona giren bakteri sayısı.

Table 1. Number of bacteria in the 10 fold dilutions added to PCR reactions.

Sulandırma	cfu/ml	cfu/100 µl	cfu/2 µl
10 <sup>0</sup> (stok)	3 x 10 <sup>8</sup>	3 x 10 <sup>7</sup>	6 x 10 <sup>5</sup>
10 <sup>-1</sup>	3 x 10 <sup>7</sup>	3 x 10 <sup>6</sup>	6 x 10 <sup>4</sup>
10 <sup>-2</sup>	3 x 10 <sup>6</sup>	3 x 10 <sup>5</sup>	6 x 10 <sup>3</sup>
10 <sup>-3</sup>	3 x 10 <sup>3</sup>	3 x 10 <sup>2</sup>	6

*DNA ekstraksiyonu:* İnfekte doku örnekleri, negatif ve pozitif kontroller Master Pure DNA saflaştırma kiti (Epicentre Technologies) ile kullanma talimatı doğrultusunda DNA'lar elde edildi.

*Real-Time PCR optimizasyonu:* PCR, Real-Time Flourescent deteksiyon yapan Light Cycler (LightCycler PCR, Roche Diagnostics) sisteminde optimize edildi. Real-time PCR sonucu oluşan amplikonların erime eğrisi analizleri (melting curve analysis) yapılarak, testin, dolayısıyla oluşan PCR ürünlerinin spesifik oldukları tespit edildi (Tablo 2).

Tablo 2. Real Time PCR’da kullanılan reaktifler ve final hacimleri.  
Table 2. Real Time PCR components and final volumes.

PCR içeriği	Standart suş	Negatif kontrol
Distile su	4.7 µl	4.7
DNTP mix	1 µl	1 µl
DRa	0.5 µl	0.5 µl
DRb	0.5 µl	0.5µl
SYBR green*	1 µl	1 µl
10xbuffer	1 µl	1 µl
Taq pol	0.3 µl	0.3 µl
Template	1µl	1 µl**
Toplam reaksiyon	10 µl	10 µl

\* LightCycler-DNA Master SYBR Green, 10x konsantrasyonunda: SYBR green I boyası, ve 10 mM MgCl<sub>2</sub> içeren kullanıma hazır reaksiyon karışımı

\*\* Negatif kontrolde kullanılan numune steril deiyonize sudur.

Tablo 3. PCR’da kullanılan reaktifler ve final hacimleri.  
Table 3. PCR components and final volumes.

PCR içeriği	<i>M. bovis</i> pozitif kontrol	Negatif kontrol
Distile su	8µl	8µl
Buffer	2.5µl	2.5µl
BSA	2.5µl	2.5µl
DNTPler	2.5µl	2.5µl
DIG-11-dUTP	0.2µl	0.2µl
DRa	1µl	1µl
DRb	1µl	1µl
Taq pol.	0.3µl	0.3µl
Template	2µl	2µl
Toplam	20µl	20µl

Tablo 4. PCR reaksiyon içeriği.  
Table 4. PCR reaction components.

PCR reaksiyon içeriği	Final hacim
Su	26µl
Iontaq buffer (Mgsuz)	5µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5µl
DRa	2.5µl
DRb	2.5µl
DIG-işaretleme karışımı*	5µl
Iontaq polymerase	1µl
Myco DNA	3µl
Toplam	50µl

\*DIG-işaretleme karışımı: 2 mM dATP, dGTP, DCTP; 1.9 mM dTTP; 0.1 mM DIG-dUTP (alkali stabil veya alkali labil).

Amplifikasyon koşulları 95°C’de 15 s’lik ön denaturasyon, 95°C’de 0 s denaturasyon, 55°C’de 5 s bağlanma ve 72°C’de 10 s uzama’dan oluşan 30 sikluluk amplifikasyon ve 72°C’de 15 s’lik final uzama’dan oluştu.

*PCR-ELISA ve mezbaşa örnekleri ile deneme:* Optimize edilmiş real-time PCR (LightCycler PCR) parametreleri kullanılarak, kapiller air thermal cycler’da standart *M. bovis* suşu’ndan amplikonlar elde edildi. PCR ürününün (amplikon) saptanması, ELISA ile streptavidin-kaplı pleytlerde (Boehringer Mannheim) yapılacağı için, PCR’da DRb primeri biotin-işaretli olarak kullanıldı. Buna ek olarak, pleytlerdeki son reaksiyon anti-digoxigenin antikorlarıyla ortaya konacağından dolayı, PCR reaksiyonuna dNTP’lerin yanısıra digoxigenin-11-dUTP da eklendi (Tablo 3). Her PCR denemesinde negatif kontrol olarak DNA template yerine PCR grade su kullanıldı.

Amplifikasyon sonrası, 10µl amplikon 90µl PBS’ye eklendi. Toplam 100µl sulandırılmış amplikon streptavidin-kaplı pleyt çukurlarına inoküle edilerek 37°C’de 60 dk inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda, çukur içindeki karışım atıldı ve çukurlar 100 µl Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS) ilave edilerek 4 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra, her çukura 100 µl 1:2000 oranında sulandırılmış anti-digoxigenin antikoruna eklendi ve pleyt 60 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ABTS (SIGMA) renk substratı içeren solüsyon eklendi ve 30 dk 37°C’de inkübe edildi. Sonuçlar gözle değerlendirildi. Yeşil-mavi renk pozitif, reksiz kuyucuklar ise negatif olarak belirlendi.

Optimize edilmiş olan PCR-ELISA işlemi ile 36 adet lezyonlu lenf yumrusu ve kan örneğinden izole edilen DNA örnekleri içinde *M. bovis* spesifik DR bölgesi arandı.

### Genotiplendirme (Spoligotyping)

Bu işlem Kamerbeek ve ark. (8)’nin membranla yaptıkları hybridizasyon işlemi Mikro titre pleytlere (MTP) uyarlanarak gerçekleştirildi. Bu yöntemde Xenobind karboksi-modifiye pleytler (Xenobind covalent) kullanıldı. Bu pleytlerin özelliği, kuyucuklarında serbest karboksil kökü içermeleridir. *Spoligotiplendirme amacıyla* amino-modifiye (yani 3’ ucunda NH<sub>4</sub> kökü olan) 43 adet prob sentezlendi. Öncelikle amino-modifiye probu pleytlerdeki kuyucuklara serbest karboksil köklerine kovalent olarak bağlandı. Nonspesifik bağlanmaları engelleyici yıkamalardan sonra, kuyucuğa denature edilmiş DIG-işaretli spesifik PCR ürününü eklendi. Belli süreli inkübasyonlar ve yıkamalardan sonra, bağlı kalan hibritler anti-DIG peroksidaz konjugatı ve kolorimetrik substrat TMB (Sigma) kullanılarak arandı.

**DIG-işaretli *M. bovis* spesifik PCR ürünü hazırlama:** Yapılan işlem PCR-ELISA'daki ile aynıdır. Kısaca, *M. bovis* DNAsı, DRa, DRb, DIG-dUTP (alkali stabil veya labil) kullanılarak ve Mastercycler (Ependorf) parametreleri, 95°C'de 5 dk'lık ön denaturasyonu takiben, 35 Siklus: 95 °C'de 45 s, 55 °C'de 45 s, ve 72 °C'de 45 s olacak şekilde PCR yapıldı (Tablo 4).

***M. bovis* spoligotiplendirme problemlerinin mikroplyet üzerine sabitlenmesi:** Stok konsantrasyonu 95 pmol/µl olarak belirlenen spoligotiplendirme problemlerinden 25 µl toplam hacimde 20 pmol/µl olacak şekilde uygun Mikroplyet kuyucuklarına eklendi. Üzerine 75 µl 100 mM EDC(1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide HCl), 10 mM MES (2-N-morpholinethanesulfonic acid) (pH 5.4) içindeki çözeltisinden eklendi ve 22°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Daha sonra her bir kuyucuk PBS (pH 7.5) ile 4 defa ve non-kovalent olarak oluşan bağları koparmak için, 0.4 N NaOH ile (37°C'de, 1 saat) yıkandı. İnkübasyon sonrasında, PBS ile yıkama işlemi tekrar edildi. Pleytler hemen kullanılmadığında +4°C'de üzerleri sarılarak bekletildi. Bu işlem sırasında problemler 1 no'lu probdan 43 no'lu proba kadar pleytin A.1 kuyucuğundan itibaren sırasıyla A.1-A.12, B.1-B.12, C.1-C12, D-1-D.7 yönü ve düzeninde yapılandırıldı.

**Hibridizasyon:** Spoligotiplendirme problemlerinin bağlı olduğu kuyucuklara 100 µl pre-hibridizasyon solüsyonu (6 x SSC, 0.1% SDS, 1% BSA) eklendi ve 37°C'de 10 dk bekletildi. Bu süre içerisinde DIG-işaretli 60 µl *M. bovis* PCR ürünü denatüre edildi. PCR sırasında alkali labil DIG-dUTP kullanıldığında 95°C'de 5 dk inkübasyon; alkali stabil DIG-dUTP kullanıldığında 60 µl 0.4N NaOH ile 22°C'de 5 dk inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonunda prehibridizasyon solüsyonu döküldü. Spoligotiplendirme problemlerinin bağlı olduğu kuyucuklara 100 µl hibridizasyon solüsyonu (6 x SSC, 0.1% SDS, 1% BSA ve *M. bovis* PCR ürünü) eklendi ve 37°C'de 1 saat bekletildi ve solüsyon döküldü. Her bir kuyucuk 100 µl 2 x SSC ile 4 kez yıkandı. Kuyucuklara 200 µl Anti-DIG-POD (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl içinde =Tris NaCl) kullanma solüsyonu (150U/ml) eklendi ve 37°C'de 30 dk karanlıkta bekletildikten sonra 4 kez 100 µl Tris NaCl solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra aynı kuyucuklar 100 µl 100mM sodyum sitrat (pH 5.0) ile yıkandı ve 0.1 mg TMB, %0.003 hidrojen peroksit içeren 100 mM sodyum sitrat (pH 5.0) solüsyonu kuyucuklara eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk karanlıkta bekletildi. Kuyucuklarda mavi renk oluşumu pozitif olarak, renk oluşmaması negatif olarak değerlendirildi. Okuma işlemi pleytlerin A.1 kuyucuğundan başlanarak sağa doğru (A.1-A.12, B.1-B.12, C.1-C12, D-1-D.7) devamlı yapılandırılmış 43 prob yönünde gerçekleştirildi

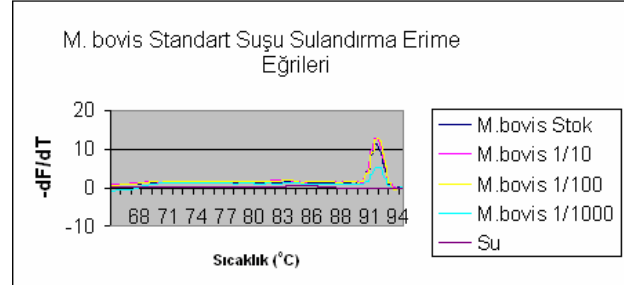
Standart *M. bovis* AN5 suşu ile optimize edilen spoligotiplendirme işlemi mezbahe örneklerinden elde edilen PCR ürünlerine tamamına uygulandı.

## Bulgular

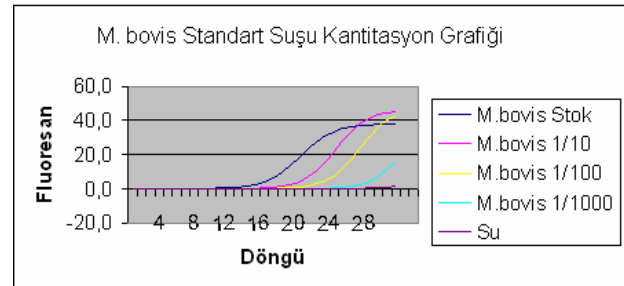
### PCR optimizasyonu

PCR, Light Cycler (Real-Time Fluorescent deteksiyon yapan) sisteminde optimize edildi. Tüm PCR süresi toplam 40 dk olarak belirlendi. PCR ürünlerinin spesifikliğini belirlemek için "erime eğrisi analizleri" (Melting curve analysis; Tm) yapıldı ve Şekil-1'de görüldüğü gibi, standart *M. bovis* suşu ile "erime eğrisi analizleri" ile değerlendirildi. Şekilde ampliconlara ait DNA çift sarmalın 92.176°C'de tamamen ayrıldığı, diğer bir deyişle, floresan yoğunluklarını kaybettikleri görülmektedir. Bu nokta (erime noktası) kullanılan primerlerin (DRa ve DRb) amplifiye ettiği bölgeye spesifik olarak belirlendi.

Gerek saf kültürler ve gerekse yapay infekte kan ve lenf yumrusu örnekleri ile yapılan PCR'de duyarlılıkların aynı olduğu saptandı. Standart *M. bovis* suşu sulandırılmaları ile yapılan LC-PCR'ye ait floresan artışı (amplicon artışı) ve bu ampliconlara ait erime eğrisi (Tm, temperature of melting) Şekil 1 ve Şekil 2'de gösterildi. PCR sensitivitesi 6 cfu/2 µl = 3 cfu/µl olarak belirlendi.



Şekil 1. *M. bovis* standart suşu sulandırılmaları ve erime eğrileri.  
Figure 1. *M. bovis* standard strain dilutions and melting curves.



Şekil 2. *M. bovis* standart suşu kantitasyon grafiği.  
Figure 2. *M. bovis* standard strain quantitation graphic.

### *M. bovis* PCR-ELISA ve mezbahe örnekleri sonuçları

Çalışmada PCR-ELISA yönteminin işlerliği standart *M. bovis* AN5 suşu DNA'sı ile yapılan denemelerle gözlemlendi (Şekil 3).



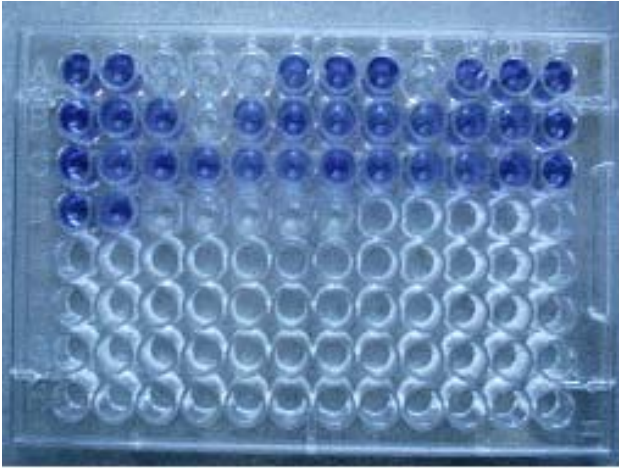


### Genotiplendirme (spoligotiplendirme)

PCR ELISA sonuçları pozitif çıkan 9 Mezbaha örneğinin DNA'ları spoligotiplendirme'e (hibridizasyon paneline) tabi tutuldu. Elde edilen 3 farklı spoligotip Ank-1, Ank-2 ve Ank-3 olarak adlandırıldı. PCR ile amplifiye edilen DNA'ların spoligotiplere göre dağılımı Ank-1 spoligotipine ait 4 (%45), Ank-2'de 4 (%45) ve Ank-3'te 1 (%10) adet şeklindedir. *M. bovis* DNA amplifikasyon ürününe ait şekillerde (Şekil 4 ve 5-8'de) verilmektedir.



Resim 7. Ank-2 spoligotipi.  
Figure 7. Ank-2 spoligotype.



Resim 8. Ank-3 spoligotipi.  
Figure 8. Ank-3 spoligotype.

### Tartışma

Sunulan çalışmada optimizasyon çalışmaları sırasında elde edilen başarının mezbaha materyallerinde gerçekleşmemesi değişik nedenlere bağlanabilir. Öncelikle, sığır tüberkülozunun patolojisi nedeni ile etkene hastalığın herhangi bir zamanında rastlayabilmek çok zordur. Sığır tüberkülozlu dokular çok az etken içerirler ve bu nedenle PCR'da duyarlı ekstraksiyon sistemine gereksinim duyarlar. Etken kazeifiye olmuş

lenf yumruları ya da daha ileri durumlarda akciğer ya da diğer organlarda kazeifiye ya da kalsifiye bir tabaka ile kontrol altında tutulmaktadır (12). Optimizasyon çalışmaları sırasında sağlıklı hayvandan alınan lenf yumrularının bakterilerle karıştırılarak yapay örneklerin hazırlandığı da göz önüne alınacak olursa bu farklılarda hastalıklı lenf yumrularında bulunan yangıya bağlı unsurlarında (kazeifikasyon, kalsifikasyon, yangı hücrelerinin artışı, vs) rol oynadığı gözden uzak tutulmamalıdır. Sunulan çalışmada sağlıklı lenf yumrusu homojenatı yapay örneği ile aldığımız başarılı sonucu lezyonlu lenf düğümleri ile alamamamızın bir önemli nedeni de kullandığımız ekstraksiyon yönteminin yukarıda açıklanan olumsuzlukları giderememesi olabilir. Taylor ve ark. (11) sunulan çalışmaya çok benzer bir LC-PCR yöntemi uygulamasına rağmen daha farklı ekstraksiyon sistemi uygulamışlardır. Aynı şekilde Roring ve ark. (10), klinik örneklerde DRa ve DRb primerleri ile çalışmış olmasına karşın elde ettikleri pozitiflik sunulan çalışmaya göre daha yüksektir.

Sunulan çalışmada PCR ile lenf düğümlerinden amplifiye edilen 9 *M. bovis* DNA'sının spoligotiplendirilmesi sonucunda 3 farklı DNA profili ortaya konmuştur. Ank-1 spoligotipinde 4 (% 45) , Ank-2 spoligotipinde 4 (%45) ve Ank-3 spoligotipinde 1(%10) DNA profili mevcuttur. Sığır tüberkülozu ile çalışan araştırmacılar genellikle çok sayıda saha izolatu ile çalışmışlardır. Araştırmacıların hepsi birden fazla DNA profili elde etmişlerdir (3, 8, 9). Çalışmamızda elde edilen *M. bovis* AN5 kontrol suşuna ait spoligotiplendirme sonucu diğer araştırmacılar ile aynı profili verirken (9), Ank-1, Ank-2 ve Ank-3 spoligotiplerinin de diğer araştırmacıların çalışmalarında saptandığı görülmektedir. (3, 8, 9). Sunulan çalışmada elde edilen spoligotiplerin görülme sıklığı üzerinde yorum yapmak sayısının azlığı nedeni ile zor olsa da, eldeki verilere göre diğer araştırmacılar farklı bir sıklık gösterdiği söylenebilir. Örneğin Aranaz ve ark. (3)'nın 129 *M. bovis* suşunda en fazla bulunduğu spoligotip olan Spb7 (59 izolat, %46) ve daha az sayıdaki Spb8 (14 izolat, %3) sunulan çalışmada en fazla rastlanan spoligotipler olmuştur. Ank-1 Spb8 ve Ank-2 Spb 7'nin karşılığıdır. Ank-3 spoligotipi, Aranaz ve ark.(3)'nın çalışmasında üçüncü en fazla rastlanan Spb13 spoligotipine benzemektedir. Ancak, sunulan çalışmada spoligotiplendirilen *M. bovis* DNA sayısı böyle bir karşılaştırma için istatistiksel olarak yeterli değildir.

Bu çalışmada Spoligotiplendirme ilk kez mikrop-leytlerde yapılmıştır. Membran yerine hibridizasyon Xenobind kovalent bağlanan özel mikrop-leytlerde gerçekleştirilmiştir. Spoligotiplendirme metodunun mikrop-leytlere aktarılması spoligotiplendirmede herhangi bir farklılık oluşturmamıştır. Bu da diğer araştırmacıların (8, 9)

kontrol suşu olan AN5 ve saha izolatlarının spoligotipleri ile doğrulanmıştır.

Sonuç olarak, sunulan çalışmayla, sığır tüberkülozunun etkeni olan *M. bovis* ile ilgili bir PCR-ELISA tekniği optimize edilerek, mezbaha örneklerinden yapılan denemelerde bu teknikle 36 sığıra ait 72 örnekten (36 kan ve 36 lezyonlu lenf yumrusu) DRa ve DRb primerleri ile 9 adet *M. bovis* DNA'sı çoğaltıldı ve son olarak bu DNA'lar spoligotiplendirme yöntemi ile tiplendirilerek 3 farklı spoligotip elde edildi.

### Kaynaklar

1. **Anonim** (1995): *3285 Sayılı Hayvan Sağlığı ve Zabıtası Kanunu*. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara.
2. **Anonim** (1978): *Sığır Tüberkülozu Yönetmeliği*. T.C.Gıda-Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Veteriner İşleri Genel Müdürlüğü, Yönetmelik sayısı 12, Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü Deneme Çiftl. Md. Basım Servisi, Ankara.
3. **Aranaz A, Liebana E, Mateos A, Dominguez L, Vidal D, Domingo M, Gonzolez O, Rodriguez-Ferri EF, Bunschoten AE, van Embden JDA, Cousins D.** (1996): *Spacer oligonucleotide typing of Mycobacterium bovis strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis*. J Clin Microbiol, **36**, 2734-2740.
4. **Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker KS** (1997): *Özel Mikrobiyoloji*, 180, 4. baskı, Medisan Yayın Serisi No: 26, Ankara.
5. **Bustin SA** (2004): *A-Z of Quantitative PCR*. International University Line Biotechnology Series, California.
6. **De La Salmoniere YOG, Li HM, Torrea G, Bunschoten A, Van Embden JDA, Gieguel B** (1997): *Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, **35**, 2210-2214.
7. **Hayward AC, Watson JM** (1998): *Typing of mycobacteria using spoligotyping*. Thorax, **53**, 329-330.
8. **Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, Van Embden JDA** (1997): *Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology*. J Clin Microbiol, **35**, 907-14.
9. **Milian-Suazo F, Banda-Ruiz V, Ramirez-Csillas C, Arriaga-Diaz C** (2002): *Genotyping of Mycobacterium bovis by geographic location within Mexico*. Preventive Vet Med, **55**, 255-264.
10. **Roring S, Hughes MS, Skuce RA, Neill SD** (2000): *Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium bovis directly from bovine tissue specimens by spoligotyping*. Vet Microbiol, **74**, 227-236.
11. **Taylor, MJ, Hughes MS, Skuce RA, Neill SD** (2001): *Detection of Mycobacterium bovis in bovine clinical specimens using real-time fluorescence and fluorescence resonance energy transfer probe rapid-cycle PCR*. J Clin Microbiol, **39**, 1272-1278.
12. **Wards BJ, Collins DM, de Lisle GW** (1995): *Detection of Mycobacterium bovis in tissues by polymerase chain reaction*. Vet Microbiol, **43**, 227-240.
13. **Zumarraga MJ, Martin C, Samper S, Alito A, Latini O, Bigi F, Roxo E, Cicuta ME, Errico F, Ramos MC, Cataldi A, Van Soolingen D, Romano MI** (1999): *Usefulness of spoligotyping in molecular epidemiology of Mycobacterium bovis-related infections in South America*. J Clin Microbiol, **37**, 296-303.
14. **Schanke J, Watson J** (1998): *Epicentre forum*. Erişim adresi: [www.epibio.com](http://www.epibio.com) Erişim tarihi: 24.01.2007

Geliş tarihi: 13.11.2006 / Kabul tarihi: 21.02.2007

### Yazışma adresi

Prof. Dr. Hakan Yardımcı  
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Mikrobiyoloji A.B.D. 06110, Dışkapı-Ankara.  
e-mail: [yardimci@veterinary.ankara.edu.tr](mailto:yardimci@veterinary.ankara.edu.tr)