

DEĞİŞİK COĞRAFİK BÖLGELERDEN İZOLE EDİLEN ANTI-MİKOBAKTERİYEL AJANLARA DUYARLI VE DİRENÇLİ MİKOBAKTERİ SUŞLARININ SDS-PAGE İLE İNCELENMESİ*

Seyyal ROTA¹, Işın AKYAR², Gülelendam BOZDAYI¹, Feyzullah GÜMÜŞLÜ³,
İsmail CEYHAN³

ÖZET

Bu çalışmada *Mycobacterium tuberculosis*'in tüm hücre proteinleri sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezde yürütülmüş ve saptanan protein kalıplarının bölgesel antibiyotik duyarlılık paternleri ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamına 99 klinik izolat ve *Mycobacterium tuberculosis* ATCC H37Rv suşu alınmıştır. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezde yürütülen suşlar gümüşleme yöntemi ile boyanmış ve jel dansitometri cihazı kullanılarak protein bantları incelenmiştir. İzoniyazid, rifampisin, streptomisin ve eritromisin kullanılarak proporsiyon yöntemine göre antibiyogramı yapılmıştır. İstatistik için Mod (Tepe noktası), medyan (Ortalama) ve range (Aralık) değerleri kullanılmıştır.

Sonuç olarak elde edilen protein bant kalıplarının antibiyotik duyarlılık paternleri ile bir ilişkisi bulunmamıştır.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis*, SDS-PAGE, antibiyotik duyarlılığı

SUMMARY

SDS-PAGE investigation of sensitive and resistant Mycobacterium species isolated in different geographic areas to antimycobacterial agents.

The whole cell proteins of *M.tuberculosis* were run by SDS-PAGE and it was aimed to investigate the correlation between protein band patterns and antibiotic susceptibility patterns. Ninety nine clinical isolates and *Mycobacterium tuberculosis* ATCC H37Rv strains were included in the study. Samples from SDS-PAGE were colored with silver stain and protein bands were analysed by gel densitometer device. Antibigrams were performed for isoniazid, rifampin, streptomycin and erythromycin according to proportion method. Mod, median and range values were used for statistics.

In conclusion, no correlation was found between protein band patterns and antibiotic susceptibility patterns.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, SDS-PAGE, antibiotic susceptibility

GİRİŞ

Mikobakteri infeksiyonları tüm dünyada yaygın olarak bulunan, insan mortalite ve morbiditesine doğrudan etkili infeksiyonlardır. Son yıllarda hem dünyada hem de ülkemizde tüberküloz tekrar eski önemini kazanmış ve ikincil ilaç direncinde artışlar saptanmıştır (5,4).

Mycobacterium tuberculosis'in klinik örneklerdeki kesin tanısı günümüzde mikrobiyoloji laboratuvarlarında çeşit-

li yöntemler ile konulmaktadır (6,19,20). Yapılan çalışmalar sonucunda, son yıllarda tüberküloz klinik ve epidemiyolojisinin değişiklikler gösterdiği, çoklu ilaç direncinin tedavide kullanılan rejimlerin etkinliğini altüst ettiği gösterilmiştir. Moleküler biyolojideki yenilikler, tüberküloz olgularının tanısı ve epidemiyolojik araştırmalarda yeni ufuklar açmıştır (17). High pressure liquid chromatography (HPLC), spoli-

* Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: SBAG-1443), 1- Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Beşevler, Ankara, 2- Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, 3- Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi, Tüberküloz Referans Laboratuvarı, Ankara.

gotyping, restriction fragment length polymorphism (RFLP) gibi yeni moleküler tekniklerin kullanılmasıyla elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucu tüberkülozla ilgili coğrafik dağılım haritaları yapılmaya başlanmıştır. Bu durum, hastalığın kontrolü, hangi farklı suşların bulunduğu, bunların

ilaçlara direnç durumu ve ne şekilde önlemler alınabileceği konusunda bilgi verebilmektedir (2,9,12,14).

Amacımız direnç fenotipinin SDS-PAGE yöntemiyle belirlenmesi ve bölgelere göre anlamlı bir farklılık bulunup bulunmadığının incelenmesidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örnekler: Çalışmaya Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Tüberküloz Referans Laboratuvarı'nda kültürü ve proporsiyon yöntemine göre antibiyogramı yapılmış olan 99 *M.tuberculosis* suşu ve *M.tuberculosis* ATCC suşu olan H37 Rv referans suşu dahil edilmiştir.

Löwenstein-Jensen besiyerinde üretilmiş suşların tüm hücre proteinlerinin izolasyonu hedeflenmiştir. Üreme olan besiyerlerine steril serum fizyolojik konularak bir gece bekletilmiştir. Yumuşamış olan koloniler özeyle steril konik santirifüj tüplerine alınmıştır. 80°C'de 1 saat tutularak ısıyla inaktivasyonu sağlanmıştır (3). Daha sonra örnek tüplerinin içerisine cam boncuklar eklenmiştir. Sonik banyoda 15 dakika sonikasyon, 15 dakika dinlenme tarzında 40 kez sonikasyon uygulanmıştır. Örnekler -196°C'deki tanktan alınan sıvı azotta 20'şer kez dondurulup çözdürülmüştür (1). Bu işlemden sonra % 4 son konsantrasyon olacak şekilde sodyum dodesil sülfat (SDS) eklenen örnekler bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün örnekler 5'er dakika kaynatılmış ve mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış, 40 dakika +4°C'de 13,000 rpm'de santirifüj edilmiştir. Örneklerde yeterli miktarda protein olup ol-

madığını anlamak amacıyla Lowry yöntemiyle protein ölçümleri yapılmıştır. Son olarak mikrosantrifüj tüpüne eşit miktarda protein örneği ve örnek tampon çözeltisi konularak % 0.3'lük brom fenol mavisi eklenmiş ve örnek daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda -35°C'de saklanmıştır (14).

Örneklerin SDS-PAGE yöntemiyle yürütülmesi ve görüntülenmesi: Derin dondurucudan çıkarılan örnekler 5-10 dakika 100°C'de kaynatıldıktan sonra, Laemmli'nin yöntemine göre hazırlanan % 10'luk (akrilamid/bisakrilamid oranı) ayırma ve % 4'lük yükleme jeline yüklenmiş ve 30 mA'de 5 saat yürütüldükten sonra gümüş boyama yöntemi ile boyanmıştır (18).

Densitometrede örneklerin molekül ağırlıklarının incelenmesi: Bunun için Microsoft Windows uyumlu GS365W Electrophoresis Data system kullanılmıştır.

İstatistik: Proteinlerin moleküler ağırlıklarının antibiyotik duyarlılık kalıplarıyla bir bağlantısı olup olmadığının araştırılmasında da Mod (Tepe noktası), Medyan (Ortalama) ve Range (Aralık) değerleri kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışılan örneklerin jeldeki görüntüsü fotoğrafta, jellerin densitometri ile değerlendirilmesi ise grafikte gösterilmiştir.

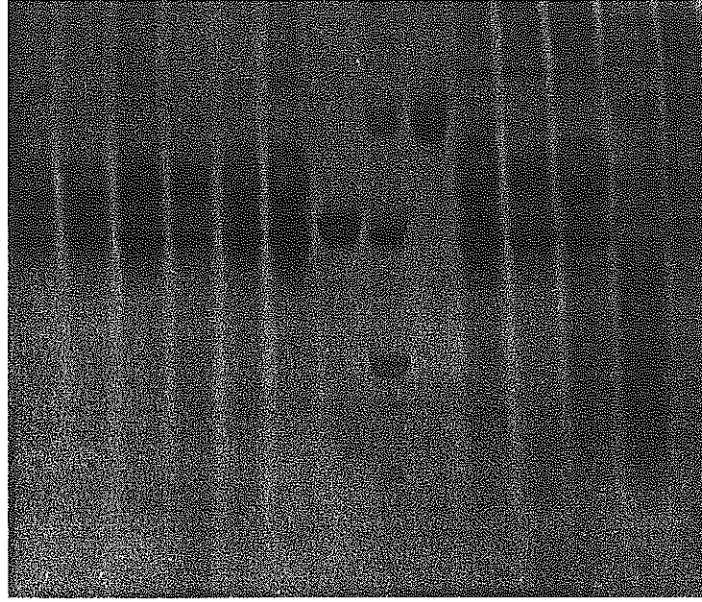
Mod, medyan ve range değerleri kullanılarak elde edilen protein bantlarının molekül ağırlıkları ile antibiyotik direnci ve bölgesel farklılık olasılığı araştırılmış, elde edilen

sonuçlara göre mod ve medyan değerleri tüm bölgelerde 28-65 kDa olarak bulunmuştur. Range değerlendirmesi ise bölgelere göre tabloda gösterilmiştir.

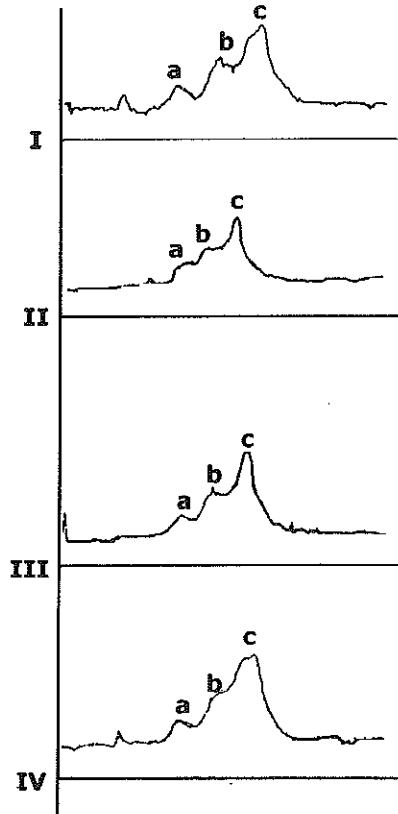
Tüm hücre proteinlerinin moleküler ağırlıkları göz önüne alındığında, ilaç duyarlılığı veya bölgelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark taşımadığı gösterilmiştir.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

45 kDa —



Fotoğraf. 1,2,3,4,5,6,10,11,12,14 sıralarında 45 kDa molekül ağırlığında örneklerimize ait *M.tuberculosis* protein bantları görülmektedir. 7. sırada 45 kDa'luk moleküler ağırlık belirleyici (yumurta albümini), 8. sırada 116 kDa β -galaktozidaz, 66 kDa sığır albümini, 45 kDa yumurta albümini, 29 kDa karbonik anhidrazdan oluşan karışık moleküler ağırlık belirleyici, 9. sırada 66 kDa'luk sığır albümini ve 13. sırada karşılaştırmak amacıyla konulan bir başka bakterinin (*Aeromonas*) protein bant kalıpları görülmektedir.



Grafik. Jellerin densitometrik olarak değerlendirilmesi: a-28 kDa, b-45 kDa, c-65 kDa.

Tablo. *M.tuberculosis* tüm hücre protein bant kalıplarının coğrafik bölgelere göre istatistiksel incelenmesi.

Bölge	Range (Aralık değeri)
İç Anadolu	45-58 kDa
Marmara	45-58 kDa
Karadeniz	28-65 kDa
Ege	28-65 kDa
Güneydoğu Anadolu	28-65 kDa
Doğu Anadolu	45-58 kDa
Akdeniz	45-58 kDa

TARTIŞMA

Çalışmamızda *M.tuberculosis* suşlarının protein bant kalıplarını kullanarak ayrılması planlanmış ve Millership ve Want (13)'in bu konuda yaptıkları bir çalışma esas alınmıştır. Bu yöntemle suş ayırımı yapıldığı belirtildiğinden ve ekonomik olduğundan uygulanabilirliğinin araştırılması planlanmıştır. Çalışmamızda Türkiye'nin değişik coğrafik bölgelerinden gönderilen balgam örneklerinin 3 haftalık subkültürleri kullanılmıştır. Örnekler kültürlerden elde edilen tüm hücre proteinlerinden hazırlanmış ve *M. tuberculosis*'e ait önemli proteinlerden bazılarını göstermek için SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır. Bunlar içerisinde 65 kDa, 58 kDa, 45 kDa, 28 kDa'luk proteinler yer almakta olup immüno-dominant özellik taşıyan ve aşı çalışmalarında kullanılan proteinlerdir. Bu yöntemin kullanılmasının amacı elde ettiğimiz protein bantlarının düzenli bir şekilde saptanabilmesidir. SDS-PAGE yöntemi ile yapılan çalışmalarda mikobakteriler tiplendirilebilmiştir (1,3,14). Ayrıca, yine SDS-PAGE kullanılarak koruyucu immünitede rol oynayan birçok protein tanımlanmış ve aşı çalışmalarında kullanılmıştır (7,8,22). Yapılan çalışmaların bir kısmında bu proteinler HPLC ile saflaştırılarak elde edilmiş, bir kısmında da Western Blot yöntemi uygulanmıştır. Özellikle saflaştırma yönteminin kullanılması ile SDS-PAGE uygulanması sırasında ortaya çıkan bir takım sorunların önüne geçilmiştir (8,15,16). Çalışmamızda bu tip saflaştırma yöntemleri kullanma olanağına sahip olmadığımız için yalnızca SDS-PAGE yöntemi kullanılarak elde edebildiğimiz bantları ve densitometreye göre verileri değerlendirebildik. Elde ettiğimiz protein bantlarında bir miktar lipid bulunduğunu da gözledik. Jellerde görüntü sağlamak amacıyla kullandığımız gümüş boyama yöntemi yüksek duyarlılığa sahiptir ve jelde bulunan nanogram düzeyindeki proteinleri bile

gösterebilmektedir (11,18). Gümüş boyama uygulanan jeller GS365 W software densitometre programı ile bilgisayarda değerlendirilmiştir. Bu yöntem tek başına moleküler ağırlık belirleyicisi kullanılmasına göre daha duyarlı sonuç alınması nedeniyle seçilmiştir (10). Hassas bir yöntem olan densitometrik inceleme ile de moleküler ağırlık markerları ile birlikte incelediğimizde oluşan bantların immün dominant proteinlerine ait olduğu (28-65 kDa) saptanmıştır. Bant pozisyonu, şekli ve dansitelerinde bazı farklılıklar saptamakla birlikte bunların istatistiksel anlamı olmadığı görülmüştür. Millership ve Want (13) izolatların birbirinden bu teknikte ayırabildiğini belirtmelerine rağmen biz dirençli ve duyarlı suşları bu teknikte birbirinden ayırt edemedik. Ancak Yung ve Garbe (18) SDS-PAGE tekniğini kullanarak *M.tuberculosis* kompleksine ait olan bütün suşlarda benzer bant profilleri elde edildiğini, bu nedenle bu suşların bahsedilen yöntemle birbirlerinden ayırt edilemediğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada elde edilen bant profillerinin türlere özgül farklılıklar gösterdiği belirtilmiştir. Sonuçlarımız da bu çalışmayla paralellik göstermiştir. SDS-PAGE yöntemiyle *M.tuberculosis*'de antibiyotik duyarlılık ve direnci yapılmış coğrafik farklılıkları inceleyen başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle diğer çalışmalarla karşılaştırma olanağımız da olmamıştır. Çalışmamızda dirençli ve duyarlı suşlar arasında protein farklılığı görülmemiştir. Ancak genotipik değişikliğin fenotipik bir değişikliğe neden olma ihtimali düşünülebilir (21).

Sonuç olarak kolay uygulanabilen ve maliyeti az olan SDS-PAGE yöntemi ile *M.tuberculosis*'in duyarlı ve dirençli suşlarının ayırdedilemediği ve bu nedenle başka teknikleri uygulamanın gerekliliği anlaşılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1- Aydoğan H: Respiratuar örneklerden izole edilen Mycobacterium tuberculosis suşlarında rifampisin direncinin konvansiyonel ve moleküler yöntemler kullanılarak araştırılması, *Doktora tezi*, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Ankara (1998).
- 2- Baird PN, Hall LM, Coates ARM: Cloning and sequence analysis of the 10 kDa antigen gene of *M.tuberculosis*, *J Gen Microbiol* 135: 931 (1989).

- 3- Barnes FB, Barrows SA: Tuberculosis in the 1990s, *Ann Intern Med* 119: 400 (1993).
- 4- Bilgehan H: Mycobacteriaceae, *Klinik Mikrobiyoloji: Özel Bakterioloji ve Bakteri Enfeksiyonları*, s. 343, Fakülteler Kitabevi, İzmir (1993).
- 5- Casabona NM, Mimo DX, Gonzales T, Rosello J, Arcalis L: Rapid method for testing susceptibility of *M.tuberculosis* by using DNA probs, *J Clin Microbiol* 35:2521 (1997).
- 6- Casper C, Singh SP, Rane S, Daley CL, Schechter G, Riley LW, Kreiswirth BN, Small PM: The transcontinental transmission of tuberculosis: A molecular epidemiological assesment, *Am J Public Health* 86:551 (1996).
- 7- Chaisson RE, Schechter GF, Theuer CP, Rutherford GW, Echenberg DF, Hopewell PC: Tuberculosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome, *Am Rev Respir Dis* 136:570 (1987).
- 8- Coates ARM, Nicolai H, Pallen MJ, Guy A, Chaparas SD, Mitchison DA: The 45 kDa molecule of *M.tuberculosis* identified by immunoblotting and monoclonal antibodies as antigenic in patients with tuberculosis, *Br J Exp Path* 70:215 (1989).
- 9- Davidow AL, Marmor M, Alcabas P: Geographic diversity in tuberculosis trends and directly observed therapy, New York City, 1991 to 1994, *Am J Respir Crit Care Med* 156:1495 (1997).
- 10- De Jong A, Hoentjen AH, Van der Zenden AGM: A rapid method for identification of *Mycobacterium* species by polyacrylamid gel electrophoresis of soluble cell proteins, *J Med Microbiol* 34:1 (1991).
- 11- Giulian GG, Moss RL, Greaser M: Improved methodology for analysis and quantitation of proteins on one-dimensional silver-stained slab gels, *Analytical Biochemistry* 129: 277 (1983).
- 12- Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfert CM: *Mycobacterium*, *Zinsser Microbiology*, 9th ed, p. 423, Appleton and Lange, Connecticut, (1989).
- 13- Millership SE, Want SV: Whole cell protein electrophoresis for typing *M.tuberculosis*, *J Clin Microbiol* 30:2784 (1992).
- 14- Parekh BS, Mehta HB, West MD, Montelaro RC: Preparative elution of proteins from nitrocellulose membranes after separation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *Anal Biochem* 148:87 (1985).
- 15- Pessolani MCV, Rumjanek FD, Marques MM, Melo F, Sorno N: Serological response of patients with leprosy to a 28 to 30 kDa protein doublet from early cultures of *M. bovis* BCG, *J Clin Microbiol* 27:2184 (1989).
- 16- Scorpio A, Collins D, Whipple D, Cave D, Bates J, Zhang Y: Rapid differentiation of bovine and human tubercle bacilli based on a characteristic mutation in the bovine pyrazinamidase gene, *J Clin Microbiol* 35:106 (1997).
- 17- Shinnic TM: The 65 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, *J Bacteriol* 169:1080 (1987).
- 18- Yung DB, Garbe TR: Heat shock proteins and antigens of *M.tuberculosis*, *Infect Immun* 59:3086 (1991).
- 19- Yüce A: *Mycobacterium tuberculosis*'te antibiyotik direnç mekanizmaları, *ANKEM Derg* 8:203 (1994).
- 20- Tahaoglu K, Kizgin Ö, Karagöz T, Tor M, Partal M, Şadoğlu T: High initial and acquired drug resistance in pulmonary tuberculosis in Turkey, *Tuber, Lung Dis* 75:324 (1994).
- 21- Van Soolingen D, Arbeit RD: Dealing with variation in molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis*: low-intensity bands and other challenges, *J Med Microbiol* 50:749 (2001).
- 22- Verbon A, Kuijper S, Jansen HM, Speelman P, Kołk AHJ: Antigens in culture supernatant of *M.tuberculosis*: epitopes defined by monoclonal and human antibodies, *J Gen Microbiol* 136:955 (1990).