ÖZET

BRUCELLA SAHA SUŞLARI ve AŞI SUŞLARININ KLİNİK ÖRNEKLERDEN DİREKT İDENTİFİKASYONU

Mevcut buluş, *Brucella* saha suşları ve aşı suşlarının klinik örneklerden direkt tanısı için bir metot sunmaktadır. Söz konusu metot; (a) bir veya daha fazla saha suşu veya aşı suşlarını içerdiği düşünülen klinik örnekten genomik DNA'nın ekstraksiyonu, (b) toplam reaksiyon karışım miktarının ağırlıkça en az %20 oranında olan söz konusu genomik DNA'nın bir multipleks PCR kullanarak en az 35 döngü ile bir amplifikasyon reaksiyonuna tabi tutulması, (c) elde edilen amplifikasyon fragmentlerinin analizi ve *Brucella* saha suşları ile aşı suşlarının identifikasyonu aşamalarını ihtiva eder.

İSTEMLER

1. *Brucella* saha suşları ve aşı suşlarının direkt olarak klinik örneklerden identifikasyonu için bir metot olup aşağıdaki adımları ihtiva eder;

a) bir veya daha fazla saha suşu veya aşı suşlarını içerdiği düşünülen klinik örnekten genomik DNA'nın ekstraksiyonu,

b) toplam reaksiyon karışım miktarının ağırlıkça en az %20'si oranında olacak şekilde, söz konusu genomik DNA'nın bir multipleks PCR kullanarak en az 35 döngü ile bir amplifikasyon reaksiyonuna tabi tutulması,

c) elde edilen amplifikasyon fragmentlerinin analizi ve *Brucella* saha suşları ile aşı suşlarının identifikasyonu.

2. İstem 1'e göre sunulan bir metot olup, **özelliği** söz konusu reaksiyon karışımının toplam reaksiyon karışım miktarının ağırlıkça en az %4 oranında dimetilsülfoksit (DMSO) ihtiva etmesidir.

3. İstem 1'e göre sunulan bir metot olup, **özelliği** amplifikasyonu yapılan gen bölgelerinin wboB-wboA, bp26, omp31, polisakkaritdeasetilaz, EryC, BR0953, rpsL, NirV, Bmispec grubundan seçilmiş olmasıdır.

4. İstem 1'e göre sunulan bir metot olup, **özelliği** söz konusu reaksiyon karışımının; oligonükleotid primer çiftleri: SEQ ID NO: 1 ve SEQ ID NO:2; SEQ ID NO: 3 ve SEQ ID NO:4; SEQ ID NO: 5 ve SEQ ID NO:6; SEQ ID NO: 7 ve SEQ ID NO:8; SEQ ID NO: 9 ve SEQ ID NO:10; SEQ ID NO: 11 ve SEQ ID NO:12; SEQ ID NO: 13 ve SEQ ID NO:14; SEQ ID NO: 15 ve SEQ ID NO:16; SEQ ID NO: 17 ve SEQ ID NO:18 ve bunların kombinasyonları oluşan bir gruptan seçilen bir oligonükleotid primer çifti ihtiva etmesidir.

5. İstem 1'e göre sunulan bir metot olup, **özelliği** identifikasyonu yapılan *Brucella* saha suşları ve aşı suşlarının*; B.abortus, B.melitensis, B.suis, B.ovis, B.canis, B.neotomae, B.inopinata, B.microti, B.pinnipedialis, B.ceti, B.abortus* S-19, *B.melitensis* Rev-1, *B.abortus* RB51 ve bunların kombinasyonlarından oluşan bir gruptan seçilmiş olmasıdır.

6. İstem 1'e göre sunulan bir metot olup, **özelliği** söz konusu klinik örneklerin; sıvı, veya dokular arasından seçilmiş olmasıdır.

7. İstem 6'ya göre sunulan bir metot olup, **özelliği** söz konusu klinik örneklerin ruminantlardan elde edilmiş olmasıdır.

8. İstem 6 veya 7'ye göre sunulan bir metot olup, **özelliği** söz konusu klinik örneklerin akciğer dokusu, karaciğer dokusu veya fetüs mide sıvısı olmasıdır.

Tarifname

BRUCELLA SAHA SUŞLARI ve AŞI SUŞLARININ KLİNİK ÖRNEKLERDEN DİREKT İDENTİFİKASYONU

Buluşun İlgili Olduğu Teknik Saha

Mevcut buluş *Brucella* cinsine ait saha ve aşı suşlarının direkt ruminant atıklarından moleküler yöntemler kullanılarak identifikasyonu metoduna ilişkindir. Mevcut buluş daha özelde söz konusu saha ve aşı suşlarının ruminant atıklarına ait klinik örneklerden direkt olarak tür düzeyinde m-PCR tekniği ile kolay ve kısa sürede identifikasyonunu yapabilen bir PCR metodunun (Modifiye Mayer-Scholl) geliştirilmesine ilişkindir.

Buluşun Arka Planı

Bruselloz, *Brucella* türlerinin uterus, meme, testis gibi genital organlara yerleşmesi sonucunda nekrotik yangısal reaksiyonlarla ortaya çıkan, evcil ve vahşi hayvanlarda yavru atmalara ya da infertiliteye neden olan bulaşıcı zoonoz bir hastalıktır. Tüm dünyada sıklıkla rastlanılan bu hastalık, yetiştiricilerin ekonomik kayıplarına neden olmasının yanında, sürdürülebilir hayvancılığı da olumsuz etkilemektedir. ~~Üstelik~~ Ekonomik kayıpların yanısıra, enfekte hayvanlardan elde edilen süt ve süt ürünlerinin veya bu hayvanların etlerinin tüketilmesi yoluyla hastalığın insanlara ~~da~~ bulaşma riski hastalığın önemini toplum sağlığı yönünden arttırmaktadır. Yılda yaklaşık 500.000 insanın brusellozdan etkilendiği bilinmektedir.

Bruselloz tanı metodları; hastalıkla mücadele stratejilerine uygun olarak ve artan ihtiyaçlara cevap verebilecek nitelikte geliştirilmektedir. Üstelik söz konusu tanı metotlarının güvenilir, düşük maliyetli ve spesifitelerinin yüksek olması tercih sebebidir. Ayrıca, biyolojik savaş ve tarım terörizmi açısından yeni bir döneme girilmesi tanıda oldukça hassas ve hızlı sonuç veren test ihtiyacını arttırmaktadır.

Brucella türlerinin tespiti ve net identifikasyonu hastalığın kontrolü ve ortadan kaldırılması mücadelesinde esas etkendir. Bruselloz tanısı için mevcut altın standart yöntem; kültürdeki bakterinin biyolojik ve biyokimyasal testler aracılığı ile karakterizasyonudur. Fakat bu yöntem için uzun zaman, yoğun emek, teknik altyapı

deneyimli personel gereksinimi vardır. Aşamalar karmaşıktır ve test süresi boyunca laboratuvar personeli zoonoz etkenin potansiyel riski altındadır.

Günümüzde, *Brucella* türlerinin tespiti ve net identifikasyonu için multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (m-PCR) tekniklerini içeren moleküler yöntemler de kullanılmaktadır. Söz konusu PCR teknikleri ilk olarak kültürden izole edilen bakteriler için geliştirilmiştir. ~~olsa da~~ Klinik örneklerden direkt DNA tespiti için kullanabilirliği üzerine araştırmalar mevcuttur. Ancak şu ana kadar tanı açısından klinik örneklerden alınan en iyi sonuçlar, kültür ve kütürden izole edilen etkene uygulanan PCR yöntemlerinin (Bruce-Ladder ve Mayer-Scholl yöntemi) kombine edilerek kullanılması ile elde edilebilmektedir.

Bruce-Ladder testi; *Brucella* DNA'larının tek basamakta identifikasyonu için geliştirilen bir yöntemdir (WO 2006/097347). Bu testin önceki m-PCR testlerine kıyasla en büyük avantajı, çoğu *Brucella* türünü ve aşı suşlarını tek basamakta tür düzeyinde tanımlaması ve ayırt edebilmesidir. Fakat yöntemin dezavantajı öncelikle bakteriyel kültür çalışması gerektirmesidir.

Mayer-Scholl ve ark. (*Mayer-Scholl, A., Draeger, A., Göllner, C., Scholz, H.C., Nöckler, K., 2010. Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described Brucella species. J. Microbio. Methods. 80, 112-114*), yine m-PCR yöntemi ile referans suşlar ve saha izolatları olmak üzere toplam 81 *Brucella* suşunu doğru olarak identifiye etmeyi başarmışlardır. Fakat bu yöntem de Bruce-Ladder testine benzerlik göstererek identifikasyon öncesi bir kültür çalışması gerektirir.

Bunun dışında m-PCR ile direkt klinik örneklerden tür düzeyinde tanı için yapılan herhangi bir test henüz önerilmemiştir. Dolayısıyla tekniğin bilinen durumu değerlendirildiğinde direkt klinik örneklerden tür düzeyinde birden fazla *Brucella* saha ve aşı suşlarının tanısının yapılabildiği bir yöntemin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Buluşun Kısa Açıklaması

Mevcut buluş, tekniğin bilinen durumunda var olan problemlere çözüm olarak *Brucella* saha suşları ve aşı suşlarının klinik örneklerden direkt identifikasyonu için bir metot sunmaktadır. Söz konusu metot aşağıdaki adımları ihtiva eder.

a) bir veya daha fazla saha suşu veya aşı suşlarını içerdiği düşünülen klinik örnekten genomik DNA'nın ekstraksiyonu,

b) toplam reaksiyon karışım miktarının ağırlıkça en az %20 oranında olan söz konusu genomik DNA'nın bir multipleks PCR kullanarak en az 35 döngü ile bir amplifikasyon reaksiyonuna tabi tutulması,

c) elde edilen amplifikasyon fragmentlerinin analizi ve *Brucella* saha suşları ile aşı suşlarının identifikasyonu.

Buluşa ait metotta ayrıca reaksiyon karışımı; toplam reaksiyon karışım miktarının ağırlıkça en az %4 oranında olan dimetilsülfoksit (DMSO) ihtiva eder.

Buluşa ait metotta ayrıca söz konusu reaksiyon karışımı; oligonükleotid primer çiftleri: SEQ ID NO: 1 ve SEQ ID NO:2; SEQ ID NO: 3 ve SEQ ID NO:4; SEQ ID NO: 5 ve SEQ ID NO:6; SEQ ID NO: 7 ve SEQ ID NO:8; SEQ ID NO: 9 ve SEQ ID NO:10; SEQ ID NO: 11 ve SEQ ID NO:12; SEQ ID NO: 13 ve SEQ ID NO:14; SEQ ID NO: 15 ve SEQ ID NO:16; SEQ ID NO: 17 ve SEQ ID NO:18 ve bunların kombinasyonları oluşan bir gruptan seçilen bir oligonükleotid primer çifti ihtiva eder.

Buluşa ait metotta identifikasyonu yapılan *Brucella* saha suşları ve aşı suşları*; B.abortus, B.melitensis, B.suis, B.ovis, B.canis, B.neotomae, B.inopinata, B.microti, B.pinnipedialis, B.ceti, B.abortus* S-19, *B.melitensis* Rev-1, *B.abortus* RB51 ve bunların kombinasyonlarından oluşan bir gruptan seçilmiştir.

Buluşa ait metotta söz konusu klinik örnekler; sıvı, ~~irin~~ veya doku olarak tercih edilmiştir.

Ayrıca buluşa ait metotta söz konusu klinik örneklerin ruminantlardan elde edilmesi tercih edilmiştir. Bu husus da söz konusu klinik örnekler akciğer dokusu, karaciğer dokusu veya fetüs mide sıvısı olabilir.

Şekillerin Açıklaması

Şekil 1, klinik örneklerden ekstrakte edilen 5 µl DNA ile 25 döngülü direkt m-PCR uygulamasına ait görüntü örneğidir;

1- 72A, 2- 72K, 3- 73A, 4- 73K, 5- 74A, 6- 74K, 7- 74FMS, 8- 51A, 9- 57K, 10- 76A, 11- 76K, 12- 77A, 13- 77K, 14-78A, 15- 78K, 16- 78FMS, 17- 79A, 18- 79K, 19- Pozitif Kontrol (*B. melitensis* 16M) , 20- Negatif Kontrol

(A: Akciğer; K: Karaciğer; FMS: Fetüs Mide Sıvısı)

Şekil 2, klinik örneklerden ekstrakte edilen 5 µl DNA ile 30 döngülü direkt m-PCR uygulamasına ait görüntü örneğidir;

M- Marker 2000Bp, 1- 72A, 2- 72K, 3- 73K, 4- 74K, 5- 74FMS, 6- 76K, 7- 77K, 8- 78K, 9- 78FMS, 10- 79K, 11- Pozitif Kontrol (*B. melitensis* 16M), 12- Negatif Kontrol, 13- 81A, 14- 81K, 15- 82A, 16- 82K, 17- 83A, 18- 83K, 19- 84A

(A: Akciğer; K: Karaciğer; FMS: Fetüs Mide Sıvısı)

Şekil 3, klinik örneklerden ekstrakte edilen 5 µl DNA ile 35 döngülü direkt m-PCR uygulamasına ait görüntü örneğidir;

M- Marker 2000Bp, 1- 85A (*B. melitensis*), 2- 85K (*B. melitensis*), 3- 86A (*B. melitensis*), 4- 86K (*B. melitensis*), 5- 87A (*B. melitensis*), 6- 87K (*B. melitensis*), 7- 88A (*B. melitensis*), 8- 88K (*B. melitensis*), 9- 89A (*B. melitensis*), 10- 89K (*B. melitensis*), 11- 126A (*B. melitensis* Rev-1), 12- 8A (*B. melitensis*), 13- 45A (*B. abortus* S-19), 14- Negatif Kontrol

(A: Akciğer; K: Karaciğer)

Şekil 4, klinik örneklerden ekstrakte edilen 5 µl DNA ile 35 döngülü direkt m-PCR uygulamasına ait diğer bir görüntü örneğidir;

M-Marker 2000Bp, 1- 107A (*B. melitensis*), 2- 107K (*B. melitensis*), 3- 108A (*B. melitensis*), 4- 108K (*B. melitensis*), 5- 109A (*B. abortus*), 6- 109K (Negatif), 7- 110FMS (*B. abortus*), 8- 111FMS (*B. abortus*), 9- 112FMS (*B. abortus*), 10- 113FMS (*B. abortus*), 11- 114ĞFMS (*B. abortus*), 12- Pozitif Kontrol (*B. abortus* Tulya), 13- 115FMS (*B. abortus*), 14- 117A (*B. abortus*)

(A: Akciğer; K: Karaciğer; FMS: Fetüs Mide Sıvısı)

Buluşun Detaylı Açıklaması

Mevcut buluş ile klinik örneklerden direkt olarak *Brucella* bakteri türlerinin tek basamakta tanısını sağlayan bir metot sunulmaktadır. Buluş kapsamında sunulan metot ile *Brucella* cinsine ait bilinen çoğu türün identifikasyonunun yüksek hızda ve verimde yapılabilmesi amaçlanmıştır.

Buluş sahipleri, öncelikle; metot ile amplifiye edilecek kalıp DNA'nın ekstrakte edileceği klinik örnekleri belirlemişlerdir. Muhtemel enfeksiyon bölgesinden alınan ve bir veya daha fazla *Brucella* saha suşu veya aşı suşlarını içerdiği düşünülen klinik örnekler, ~~insan ve~~ ruminant kaynaklı olarak tercih edilebilir. Kaynak organizmadan ~~irin~~, sıvı ve dokular alınması ile örnekler hazırlanabilir. Mevcut buluşun bir yapılanmasında; ruminant atıklara ait akciğer dokuları, karaciğer dokuları ve fetüs mide sıvıları klinik örnek olarak tercih edilmiştir. Klinik örneklerden DNA ekstraksiyonu aşaması için ticari olarak elde edilebilen konvansiyonel herhangi bir kit kullanılabilir.

Mevcut buluşun tercih edilen bir yapılanmasında; DNA ekstraksiyonu aşaması ile elde edilen kalıp DNA'nın amplifiye edilmesi için multipleks PCR (m-PCR) tercih edilmiştir. Buluş sahipleri m-PCR'ın hassasiyetini ve spesifitesini ayarlamak için reaksiyon

karışımında kullanılacak DNA kalıbı miktarını reaksiyon karışım miktarının ağırlıkça %4 ile %20 aralığında olacak seviyede arttırarak denemişlerdir. Aynı zamanda arttırılan DNA miktarı oranında reaksiyon karışımındaki su miktarı azaltılmış ve 25 ile 45 aralığında döngü sayılarında dama tahtası yöntemi ile kalıp DNA miktarındaki değişimlerin reaksiyon sonuçlarına olan etkileri gözlemlenmiştir.

Buluş sahipleri uygulanan dama tahtası yöntemi sonucunda, toplam reaksiyon karışımının ağırlıkça %20'nin altında bir oranda kalıp DNA miktarları ile yapılan reaksiyonların hiçbirinin identifikasyon için uygun olmadığını sürpriz bir şekilde bulmuşlardır. Dolayısıyla klinik örneklerden elde edilen DNA'lara direkt m-PCR uygulayabilmek için reaksiyon karışımının en az %20 veya bunun üzerinde bir oranda kalıp DNA miktarı ihtiva etmesi gerektiği ortaya çıkmıştır. Diğer bir açıdan, değiştirilen döngü sayılarına bakıldığında sadece 25, 30 ve 35 sayıdaki döngü sayılarının identifikasyona olanak verdiği de buluş sahipleri tarafından gözlemlenmiştir. Bu bağlamda örnek bir uygulamada, kalıp DNA miktarı toplam reaksiyon karışımının %20'si oranında kullanılmış ve döngü sayısı 25 olarak ayarlanmıştır. Fakat m-PCR sonucunda elde edilen görüntü profilindeki bantlar oldukça silik ve zayıf olarak izlendiğinden bu parametrelerin identifikasyon için uygun olmadığı görülmüştür(Şekil 1). İkinci bir denemede kalıp DNA miktarı aynı oranda tutularak döngü sayısı 30 olarak ayarlanmıştır. Bu reaksiyon sonucunda, bant profillerinin 25 döngü sayılı reaksiyona göre daha belirgin olduğu görülmüştür. Fakat profilde, çok belirgin bantlarla eşlik eden belirgin olmayan, silik ve zayıf yapılar da olduğu dolayısıyla homojen bir görüntü sağlanamadığı için 30 döngü sayısının identifikasyonda kullanım için istenen seviyede olmadığı görülmüştür (Şekil 2). Buluş sahipleri daha sonrasında kalıp DNA miktarını yine toplam reaksiyon karışımının %20 oranında kullanmış fakat döngü sayısını 35 olarak ayarlamışlardır. Analiz edilecek bant profilleri elde edildiğinde şaşırtıcı bir şekilde profillerin identifikasyon için oldukça uygun belirginlikte olduğu görülmüştür (Şekil 3, Şekil 4).

Ayrıca mevcut buluşun tercih edilen bir yapılanmasında amplifikasyon sonrasındaki analiz görüntüsündeki spesifik olmayan bant oluşumlarının engellenmesi amacıyla toplam reaksiyon karışımının ağırlıkça %4'ü oranında dimetilsülfoksit (DMSO) (Merck, 802912) kullanımının oldukça avantajlı olduğu görülmüştür.

m-PCR'da kullanılan reaksiyon karışımına ilişkin önemli bir diğer husus da kalıp DNA'nın amplifiye edilmesinde kullanılacak oligonükleotid primerlerin seçimidir. Özellikle

Brucella türleri arasında bulunan yüksek genomik homoloji yüzdesi göz önüne alındığında reaksiyonda kullanılacak primerlerin seçiminin önemi daha da artmaktadır.

Mevcut buluş kapsamında sunulan metot ile identifikasyonu yapılması amaçlanan *Brucella* saha suşları ve aşı suşları tercihen; *B.abortus, B.melitensis, B.suis, B.ovis, B.canis, B.neotomae, B.inopinata, B.microti, B.pinnipedialis, B.ceti, B.abortus* S-19, *B.melitensis* Rev-1, *B.abortus* RB51 ve bunların kombinasyonlarından oluşan bir gruptan seçilmiştir. Klasik *Brucella* taksonomisi; konak seçilimlerine göre karakterize olan *B.melitensis, B.abortus, B.suis, B.neotomae, B.ovis* ve *B.canis* olmak üzere altı türe dayanmaktadır. DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları sayesinde gözlemlenen yüksek homoloji sonrasında çoğu taksonomist tek bir monospesifik sistemi kullanmayı yeğlemiştir. Dolayısıyla bahsi geçen bu altı türün hepsini *B.melitensis* terimi altında toplamışlardır. Fakat *Brucella* Taksonomi alt komitesi, herhangi bir karışıklığa mahal vermemek adına eski sınıflandırmanın kullanımını kabul etmiştir. Detaylı biyokimyasal ve genetik çalışmalar da tür sisteminin kullanımının daha güvenli olduğunu desteklemektedirler.

Brucella genomu iki kromozomdan oluşur. Bunlarda ilki çoğunlukla metabolizma ile ilişkili genleri kodlarken ikinci kromozom (daha küçük olan) patojenezite ile ilişkili birkaç geni içerir. Günümüzde birçok *Brucella* türünün genom dizilimi yapılmıştır ve tipik olarak bu genomlar 3200 ila 3500 açık okuma çerçevesi (ORF) kodlarlar. Dolayısıyla amplifiye edilmesi hedeflenen DNA bölgeleri bu tip dizilerden seçilebilir.

Mevcut buluşun tercih edilen bir yapılanmasında; identifikasyonu yapılması amaçlanan *Brucella* saha ve aşı suşları için hedef markerlar olarak kullanılabilecek 9 farklı *Brucella*genomik bölgesi (hedef bölge) seçilmiştir. Söz konusu genomik bölgeler; örneğin; wboB-wboA, bp26, omp31, polisakkaritdeasetilaz, EryC, BR0953, rpsL, NirV, Bmispec olarak tercih edilebilir.

"wboB-wboA" terimi; monosil-transferaz (BMEI0997, GenBank AE009540) ve glikosiltransferaz (BMEI0998, GenBank AE009540) proteinlerini kodlayan *Brucella*genomik DNA bölgesini ifade eder.

"bp26" terimi; omp28 olarak da bilinen bp26 proteinini (BMEI0536, GenBank AE009496) kodlayan ve BMEI0535 geninin de ayrımını yapan *Brucella*genomik DNA bölgesini ifade eder.

“omp31” terimi; membran proteini omp31’i (BMEII0844, GenBank AE009718) kodlayan *Brucella*genomik DNA bölgesini ifade eder.

“polisakkaritdeasetilaz” terimi; polisakkaritdeasetilazı (BMEI1435, GenBank AE009580) kodlayan *Brucella*genomik DNA bölgesini ifade eder.

“EryC” terimi; eritruloz fosfat dehidrojenaz (BMEII0428, GenBank AE009679)kodlayan*Brucella*genomik DNA bölgesini ifade eder.

“BR0953” terimi; bir ABC -tip transport proteini olan BR0953 proteinini (GenBank AE014291) kodlayan *Brucella*genomik DNA bölgesini ifade eder.

“rpsL” terimi; S12 ribozomal protein rpsL’yi (BMEI0752, GenBank AE009518) kodlayan *Brucella*genomik DNA bölgesini ifade eder.

“NirV” terimi; NirV öncü proteinini (BMEII0987, GenBank AE009731) kodlayan *Brucella*genomik DNA bölgesini ifade eder.

“Bmispec” terimi; 510 bp uzunluğundaki (GenBankAM943815) *Brucella*genomik DNA bölgesini ifade eder.

Mevcut buluşun tercih edilen bir yapılanmasında, bahsi geçen gen bölgelerinin amplifikasyonu için kullanılacak oligonükleotid primer çiftleri: SEQ ID NO: 1 ve SEQ ID NO:2; SEQ ID NO: 3 ve SEQ ID NO:4; SEQ ID NO: 5 ve SEQ ID NO:6; SEQ ID NO: 7 ve SEQ ID NO:8; SEQ ID NO: 9 ve SEQ ID NO:10; SEQ ID NO: 11 ve SEQ ID NO:12; SEQ ID NO: 13 ve SEQ ID NO:14; SEQ ID NO: 15 ve SEQ ID NO:16; SEQ ID NO: 17 ve SEQ ID NO:18 ve bunların kombinasyonları oluşan bir gruptan seçilmiştir.Tercih edilen bir yapılanmada kullanılan primer çiftleri ve karşılık gelen identifikasyonu yapılacak *Brucella* türleri Tablo 1’de açıklanmıştır.

Tablo 1 Hedef türlerin saptanmasında tür spesifik multipleks PCR primerleri*

Sıra No	Hedef Türler	Primer Adı	Primer dizilimi (5′ - 3′)	Amplikon Büyüklüğü (bp)
1	1-3, 5-13	BMEI0998f	ATC-CTA-TTG-CCC-CGA-TAA-GG	1682[1]
		BMEI0997r	GCT-TCG-CAT-TTT-CAC-TGT-AGC	
2	1-13	BMEI0535f	GCG-CAT-TCT-TCG-GTT-ATG-AA	450[2]
		BMEI0536r	CGC-AGG-CGA-AAA-CAG-CTA-TAA	
3	2- 10 ve 13	BMEII0843f	TTT-ACA-CAG-GCA-ATC-CAG-CA	1071

		BMEII0844r	GCG-TCC-AGT-TGT-TGT-TGA-TG	
4	1- 4, 6- 13	BMEI1436f	ACG-CAG-ACG-ACC-TTC-GGT-AT	794
		BMEI1435r	TTT-ATC-CAT-CGC-CCT-GTC-AC	
5	1-10, 12-13	BMEII0428f	GCC-GCT-ATT-ATG-TGG-ACT-GG	587
		BMEII0428r	AAT-GAC-TTC-ACG-GTC-GTT-CG	
6	3 ve 5-8	BR0953f	GGA-ACA-CTA-CGC-CAC-CTT-GT	272
		BR0953r	GAT-GGA-GCA-AAC-GCT-GAA-G	
7	13	BMEI0752f	CAG-GCA-AAC-CCT-CAG-AAG-C	218
		BMEI0752r	GAT-GTG-GTA-ACG-CAC-ACC-AA	
8	1-5, 7-13	BMEII0987f	CGC-AGA-CAG-TGA-CCA-TCA-AA	152
		BMEII0987r	GTA-TTC-AGC-CCC-CGT-TAC-CT	
9	8	Bmispec_f	AGA-TAC-TGG-AAC-ATA-GCC-CG	510
		Bmispec_r	ATA-CTC-AGG-CAG-GAT-ACC-GC	

1- *Brucella abortus* **2-** *Brucella melitensis* **3-** *Brucella suis* **4-** *Brucella ovis* **5-** *Brucella canis* **6-** *Brucella neotomae* **7-** *Brucella inopinata* **8-** *Brucella microti* **9-** *Brucella pinnipedialis* **10-** *Brucella ceti* **11-** *Brucella abortus* S-19 **12-** *Brucella abortus* RB51 **13-** *Brucella melitensis* Rev-1

[1] *B. abortus* RB-51 için amplikon büyüklüğü 2524 bp dir.

[2] Deniz memelileri izolatı *Brucella* suşları için amplikon büyüklüğü 1320 bp dir.

*Örnek olarak, *Brucella abortus* saha suşları için 1, 2, 4, 5 ve 8 no'lu primer çiftlerinin oluşturduğu farklı ağırlıklardaki bantlar birlikte izlenmelidir.

Mevcut buluşun tercih edilen bir yapılanmasında klinik örneklerden DNA ekstraksiyonu ve akabinde ekstrakte edilen kalıp DNA'nın m-PCR ile çoğaltılmasından sonra elde edilen fragmentler görüntülenmiş ve analizleri yapılmıştır. Söz konusu analiz aşamasında görüntüleme aracı olarak jel elektroforez tekniği tercih edilmiştir.

Buluş sahipleri, mevcut buluş kapsamında sağlanan metot ile direkt klinik materyalden uygulanan m-PCR'ın geçerliliğinin ölçümlenmesi için bir dizi istatiksel ve karşılaştırmalı analiz yapmışlardır. Bu analizlerde konvansiyonel yöntemle yapılan ve altın standart olarak da kabul gören kültürden bakteri izolasyonu ve identifikasyonu referans standart olarak kabul edilmiş ve analizde mevcut buluşa konu olan metodun sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Analiz sonucu elde edilen verilere göre mevcut buluşa konu olan metodun tanısal gücü yüksek bir test olduğu bulunmuştur.

Mevcut buluşun tercih edilen bir yapılanmasında; istatiksel analiz sonucunda; atık düzeyinde (n=166) değerlendirildiğinde, uygulanan m-PCR'nin sensitivite ve spesifite sonuçları, sırasıyla %94,11 ve %98,76, inceleme örnekleri organlar düzeyinde ise (n=326) sırasıyla %85,38 ve %98,06 olarak hesaplanmıştır (bkz. Örnek 2). Derham (2015), hesaplanan test sensitivite ve spesifiteleri beraber değerlendirildiğinde

sensitivite ve spesifite toplamı 170 üstü değerde olan bir testin klinik olarak yararlı bir test, toplamları 190 üstü olan bir testin ise tanısal gücü yüksek bir test olarak değerlendirilebileceğini bildirmiştir. Bu sebeple klinik materyallerden direkt PCR çalışılması durumunda elde edilen verilerle, m-PCR yönteminin sensitivite ve spesifitesinin yüksek oranda ve birbirine yakın değerlerde olduğu ve direkt inceleme örneklerine uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlara göre, atık düzeyinde değerlendirildiğinde m-PCR'nin tanısal gücü yüksek, bir hayvana ait organ örneklerinin herbirine göre de, klinik olarak yararlı bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Aşağıdaki örnekler, mevcut buluşa konu olan metodu daha detaylı bir şekilde açıklamak amacı ile verilmiştir. Dolayısıyla verilen örnekler, mevcut buluşun kapsamını sınırlayacak nitelikte değerlendirilmemelidir.

Örnek 1

Klinik örneklerden tür düzeyinde direkt Brucella saha ve aşı suşlarının identifikasyonu

1.Klinik örnekten DNA ekstraksiyonu

166 ruminant (114 koyun, 28 keçi, 23 sığır, 1 manda) atığına ait akciğer, karaciğer ve fetüs mide sıvıları klinik örnek olarak kullanıldı. 166 atığın 114'ünde akciğer ve karaciğer örneği, 23'ünde akciğer, karaciğer, fetüs mide sıvısı ve 29'unda sadece fetüs mide sıvısı bulunmaktaydı. Toplamda 166 atığa ait 326 örnek ekstraksiyon için kullanıldı.

Direkt klinik örneklerden DNA ekstraksiyonu için DNeasy Blood & Tissue Ekstraksiyon Kiti (69506, Qiagen, Almanya) kullanıldı. Elde edilen DNA kontrolü, Purelink Genomik DNA Mini Ekstraksiyon Kiti (K1820-01, Invitrogen, ABD) ile yapıldı. Kit içerikleri aşağıda listelenmiştir.

DNeasy Blood & Tissue Ekstraksiyon Kiti; Proteinaz K, ATL Solüsyonu (Doku Eritme Tampon Solüsyonu), AL Solüsyonu (Eritme Tampon Solüsyonu), AW1 Solüsyonu (Yıkama Tampon Solüsyonu 1), AW2 Solüsyonu (Yıkama Tampon Solüsyonu 2), AE Solüsyonu (Ayırma Tampon Solüsyonu), Spin Kolon Tüpleri ve Toplama Tüplerini içerir.

Purelink Genomik DNA Mini Ekstraksiyon Kiti; Proteinaz K, Eritme/Yapıştırma Tampon Solüsyonu, Parçalama Tampon Solüsyonu, Yıkama Tampon Solüsyonu 1 ve 2, Ayırma Tampon Solüsyonu, Spin Kolon Tüpleri ve Toplama Tüplerini içerir.

1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınmış olan 25 µg doku ve 150 µl mide sıvısı örneği üzerine, 20 µl proteinaz K ve 180 µl ATL solüsyonu ilave edildi. 56 ºC'de doku tamamen eriyene kadar inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda 15 saniye vorteks ile karıştırıldı. Üzerine 200 µl AL solüsyonu ilave edildi ve karıştırıldı. 200 µl etanol (%96) (Merck, 100971) ilave edildi ve tekrar karıştırıldı. Karışım, 2 ml'lik toplama tüpünün içindeki DNeasy mini spin kolon içine aktarıldı ve bir dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi. DNeasy mini spin kolon, tüpün içinden çıkarılarak yeni 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi, 500 µl AW1 solüsyonu ilave edildi, 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi. DNeasy mini spin kolon tekrar yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne konuldu ve 500 µl AW2 solüsyonu ilave edildi. DNeasy membranını kurutmak için 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. DNeasy mini spin kolon, 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi ve AE solüsyonu DNeasy membranın üzerine 200 µl miktarında ilave edildi. Oda ısısında bir dakika süreyle inkübe edildi ve 8000 rpm'de bir dakika santrifüj edildi. Süpernatant steril bir tüpe aktarıldı ve son işlem bir daha tekrar edildi. Elde edilen toplam süpernatant, amplifikasyon işleminde kullanılmak üzere -20 ºC'de saklandı.

2.Tür Spesifik Multipleks DNA Amplifikasyonu (m-PCR)

Klinik örneklerden ekstraksiyon sonucu elde edilen DNA'lara uygulanmıştır. Amplifikasyonda gerekli optimal ortam için;

1-Enzim, dNTP, $MgCl_2$, gerekli tampon solüsyonlar ve su içeren hazır multipleks PCR kiti (Qiagen, 206143) kullanıldı (Mayer-Scholl ve ark. 2010). Ayrıca DMSO (Dimetilsülfoksit) (Merck, 802912) kullanıldı.

2-*Brucella* türlerinin (*B.abortus*, *B.melitensis*, *B.suis*, *B.canis*, *B.ovis*, *B.neotomae*, *B.inopinata*, *B.pinnipedialis* ve *B.ceti) ve* aşı suşlarının (*B.abortus* S-19, *B.melitensis* Rev-1 ve *B.abortus* RB51) ayrımını tek basamakta yapabilen, *Brucella* cinsindeki bakterilerin farklı gen bölgelerinden büyüklüğü 152 ile 2524 bp arasında değişen parçaları amplifiye eden 8 çift tür spesifik primere (Garcia-Yoldi ve ark. 2006; Lopez-Goni ve ark. 2008; OIE Böl. 2.4.3. 2015), *B.microti* primerleri de eklenerek 9 çift primer kullanıldı (Tablo 1).

Primer karışımı;

Liyofilize pelet olarak gelen 9 çift primer, 100 µM konsantrasyonda (100 pmol/µl) olacak şekilde steril ve nükleazdan arındırılmış PCR suyu ile sulandırılarak stok konsantrasyonlar hazırlandı. Primer stok konsantrasyonlarından gerekli miktarlar

alınarak her bir primer için son konsantrasyonu 2 µM (2 pmol/µl) olacak şekilde son primer karışımı oluşturuldu ve PCR'lerde kullanıldı.

Sonuç itibari ile amplifikasyon işlemi 200 µl'lik ısıya dayanıklı nükleazdan arındırılmış özel PCR tüplerinde; 12,5 µl 2X m-PCR kit master karışımı (Qiagen, 206143), 2,5 µl primer karışımı (her bir primer 2 pmol/ µl), 1 µl DMSO (Merck, 802912), 4 µl nükleazdan arındırılmış PCR suyu ve 5 µl kalıp DNA örneği içeren 25 µl PCR reaksiyon karışımı ile yapılmıştır. DNA amplifikasyonu; 95 ºC'da 15 dakika başlangıç denatürasyon işleminden sonra, 94 ºC'da 30 saniye (denatürasyon), 58 ºC'da 90 saniye (annealing), 72 ºC'da 3 dakika (ilk sentez) ve döngülerin sonunda 72 ºC'da 10 dakika (son sentez) tutularak tamamlanır. Isı döngü sayısı 35 olarak ayarlanmıştır.

3. Amplifikasyon fragmentlerini jelde yürütme

Elde edilen PCR ürünününe elektroforez işlemi uygulanarak, agaroz jel üzerinden bant oluşumu ve bu bantların ağırlıklarına göre sıralanması sağlanır. 10 X TAE (Tris Asetat EDTA) solüsyonu (Lonza, BE50844), distile su ile sulandırılarak 1X oranında kullanılır.

Agaroz jel, %1,5 oranında hazırlanır. Bunun için Agaroz (Sigma, A5093) 1,5 gr tartılır ve 1X TAE solüsyonu ile 100 ml'ye tamamlandıktan sonra, homojenizasyon sağlanana kadar eritilir. Biraz soğuduktan sonra 2µl, %1'lik etidyum bromür (Applichem, A1152) eklenir. Taraklar uygun olarak yerleştirildikten sonra jel, kalıp tepsisinin üzerine dökülür. Oda sıcaklığında bekletilerek jelin katılaşması sağlanır ve taraklar çıkarılır. Jel kalıbı elektroforez tankına yerleştirilerek yürütme işlemi tamamlanır. Yükleme boyası olarak 6X DNA yükleme boyası (NewEngland Biolabs, F70215), DNA marker olarak 2000 Bp'lik ladder (Qiagen Gel Pilot Mid Range) kullanılır.

4. Görüntüleme ve değerlendirme

Agaroz jelde yürütülen bantlar, agaroz jele ilave edilen ethidyum bromid kimyasalı yada benzeri kimyasallar ile UV ışığı altında görünür hale getirilir. Pozitif olan her jel sütununda türlere özgü sayılarda ve ağırlıklarda olmak üzere bantlar izlenir. Böylece her türe özgü bant profilleri değerlendirilerek tanı koyulmuş olur.

Örnek 2

İstatiksel analiz sonuçları

Konvansiyonel yöntemle yapılan bakteri izolasyonu ve identifikasyonu, standart test metodu olarak kabul edildi. Direkt klinik materyallere uygulanan multipleks PCR'nin sensitivite, spesifite, pozitif tahmini değer, negatif tahmini değer ve test geçerliliği, 2x2 tablosu kullanılarak hesaplandı *(Shaikh, S.A. (2011). Measures derived from a 2x2 table for an accuracy of a diagnostic test. Journal of Biometrics and biostatistics, 2:128.doi:10.4172/2055-6180.1000128).*

Tablo 2 -2x2 tablosu ve veri analizi

	AltınStandart Test **PozitifNegatif**		**TOPLAM**
TanıTestiPozitif	A (GP)	B (YP)	A+B (GP+YP)
TanıTestiNegatif	C (YN)	D (GN)	C+D (YN+GN)
TOPLAM	A+C (GP+YN)	B+D (YP+GN)	A+B+C+D (GP+YP+YN+GN)

GP: Gerçek Pozitif :Altın standart test ve tanı testi beraber pozitif olanlar.
YP: Yalancı Pozitif : Altın standart test negatif iken tanı testi pozitif olanlar.
GN: Gerçek Negatif: Altın standart test ve tanı testi beraber negatif olanlar.
YN: Yalancı Negatif: Altın standart test pozitif iken tanı testi negatif olanlar.

Duyarlılık(Sensitivite): Tanı testinin gerçek pozitifleri bulabilme yeteneği, A / (A + C) X 100 = % olarak ifade edildi.

Özgüllük(Spesifite): Tanı testinin gerçek negatifleri bulabilme yeteneği, D / (B + D) X 100 = % olarak ifade edildi.

Pozitif Tahmini Değer: Gerçek pozitif olanların, tanı testi ile bulunan toplam pozitif olanlar içindeki yüzdesi, A / (A + B) X 100 = % olarak ifade edildi.

Negatif Tahmini Değer: Gerçek negatif olanların, tanı testi ile bulunan toplam negatif olanlar içindeki yüzdesi, D / (C + D) X 100 = % olarak ifade edildi.

Testin Geçerliliği: Tanı testinin doğru tanı koyabilme yeteneğinin göstergesi, (A + D) / (A + B + C + D) X 100 = % olarak ifade edildi.

Testler, duyarlılık ve özgüllüğün toplamı > 170 ise, klinik olarak yararlı bir test, duyarlılık ve özgüllüğün toplamı > 190 ise, tanısal gücü yüksek bir test olarak tanımlandı *(Derhem, B. (2015). Tanı testlerinin kullanımı ve değerlendirilmesi. Erişim: 10.10.2016. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi:*

http://www.ailehekimi.medicine.ankara.edu.tr/files/2015/02/Tanı-Testlerinin-Kullanımı-ve-Değerlendirilmesi.pdf)

Uygulanan istatiksel analiz sonucunda;

1-Tüm atıklar için (n=166), sensitivite (S_e) %94,11, spesifite (S_p) %98,76, pozitif tahmini değer %98,76, negatif tahmini değer %94,11 ve test geçerliliği ise %96,38 bulundu (Tablo 3).

Tablo 3 - Atıklar için Modifiye Mayer-Scholl m-PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar

Tüm atıklardan direkt m-PCR testi	**Bakteriyel identifikasyon testi (Referans Test)**		**Toplam**
	Pozitif (+)	**Negatif (-)**	
Test Pozitif	80(GP)	1(YP)	81
Test Negatif	5(YN)	80(GN)	85
Toplam	85	81	166

Sensitivite(Duyarlılık)= (80/(80+5))x100= %94,11

Spesifite(Özgüllük)= (80/(80+1))x100= %98,76

S_e (94,11) + S_p (98,76) = 192,87 > 190, tanısal gücü yüksek bir test.

Pozitif tahmini değer= (80/(80+1))X100= %98,76

Negatif tahmini değer= (80/(80+5))x100= %94,11

Test geçerliliği= (80+80)/(80+80+5+1)x100= %96,38

2-Tüm organlar için (n=326), sensitivite %85,38, spesifite %98,06, pozitif tahmini değer %97,98, negatif tahmini değer %85,87 ve testin geçerliliği ise %91,41 bulundu (Tablo 4).

TabloHata! Belgede belirtilen stilde metne rastlanmadı.–Organlar için Modifiye Mayer-Scholl m-PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar

Tüm inceleme örneklerinden direkt m-PCR testi	**Bakteriyel identifikasyon testi (Referans Test)**		**Toplam**
	Pozitif (+)	**Negatif (-)**	
Test Pozitif	146(GP)	3(YP)	149
Test Negatif	25(YN)	152(GN)	177
Toplam	171	155	326

Sensitivite(Duyarlılık)= (146 / (146+25)) x 100 = %85,38

Spesifite(Özgüllük)= (152 / (152+3)) x 100 = %98,06

S_e (85,38) + S_p (98,06) = 183,44 > 170, klinik olarak yararlı bir test.

Pozitif tahmini değer= (146 / (146+3)) x 100 = %97,98

Negatif tahmini değer= (152 / (152+25)) x100 = %85,87

Testin geçerliliği= (146+152) / (146+152+3+25) x100 = %91,41

Sekans Listesi

<110> İstanbul Üniversitesi; Seyyal Ak, Ahmet Murat Saytekin

<120> BRUCELLA SAHA SUŞLARI ve AŞI SUŞLARININ KLİNİK ÖRNEKLERDEN DİREKT İDENTİFİKASYONU

<130> 06-17689-A

<160> 18

<170>PatentInversion3.5

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213>Brucella

<400> 1
atcctattgccccgataagg 20

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213>Brucella

<400> 2
gcttcgcattttcactgtag c 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213>Brucella

<400> 3

gcgcattcttcggttatgaa 20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213>Brucella

<400> 4

cgcaggcgaaaacagctata a 21

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213>Brucella

<400> 5

tttacacaggcaatccagca 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213>Brucella

<400> 6

gcgtccagttgttgttgatg 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213>Brucella

<400> 7
acgcagacgaccttcggtat 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213>Brucella

<400> 8
tttatccatcgccctgtcac 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213>Brucella

<400> 9
gccgctattatgtggactgg 20

<210> 10
<211> 20

<212> DNA

<213>Brucella

<400> 10

aatgacttcacggtcgttcg 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213>Brucella

<400> 11

ggaacactacgccaccttgt 20

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213>Brucella

<400> 12

gatggagcaaacgctgaag 19

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213>Brucella

<400> 13

caggcaaaccctcagaagc 19

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213>Brucella

<400> 14

gatgtggtaacgcacaccaa 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213>Brucella

<400> 15

cgcagacagtgaccatcaaa 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213>Brucella

<400> 16

gtattcagcccccgttacct 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213>Brucella

<400> 17

agatactggaacatagcccg 20

<210> 18

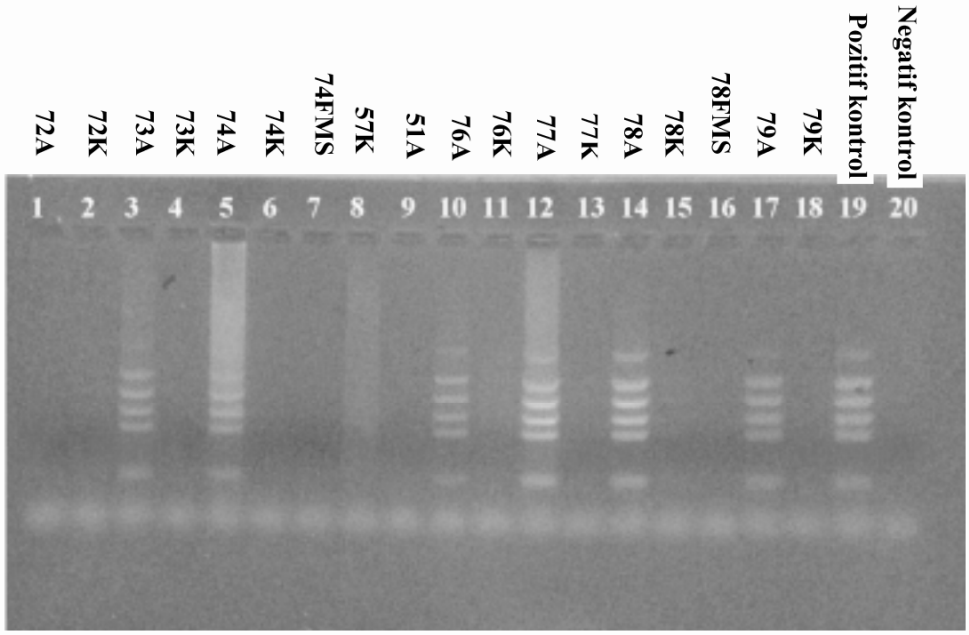
<211> 20

<212> DNA

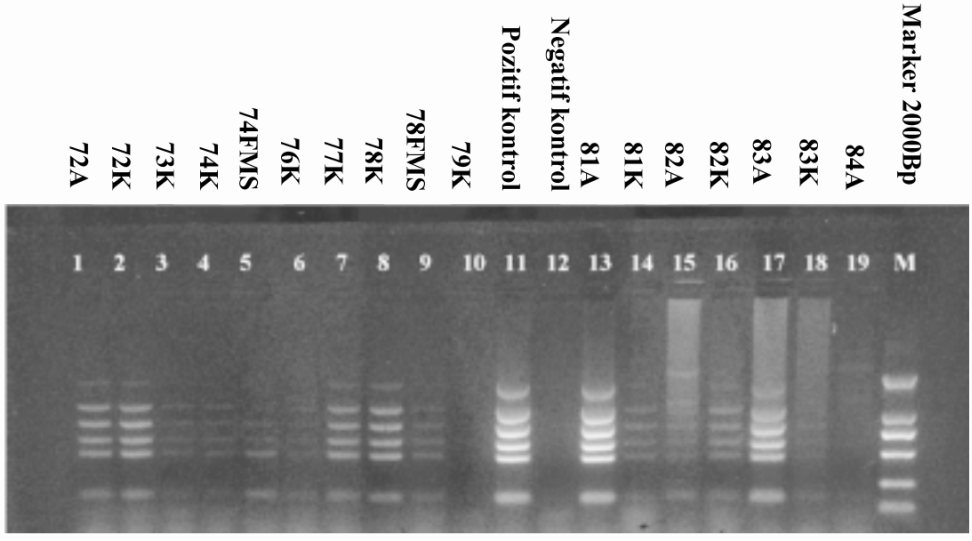
<213>Brucella

<400> 18

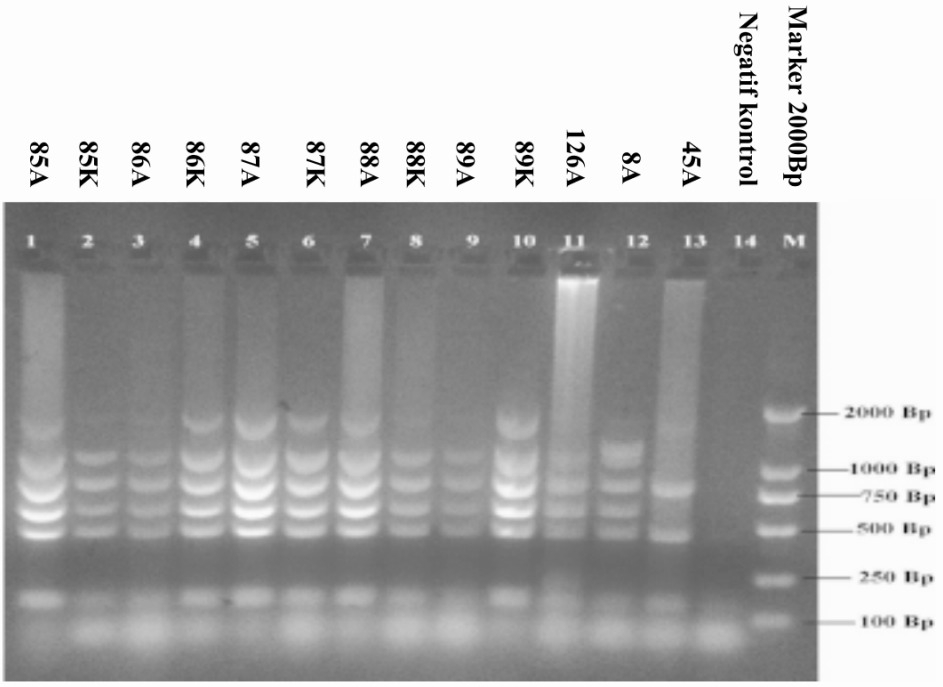
atactcaggcaggataccgc 20



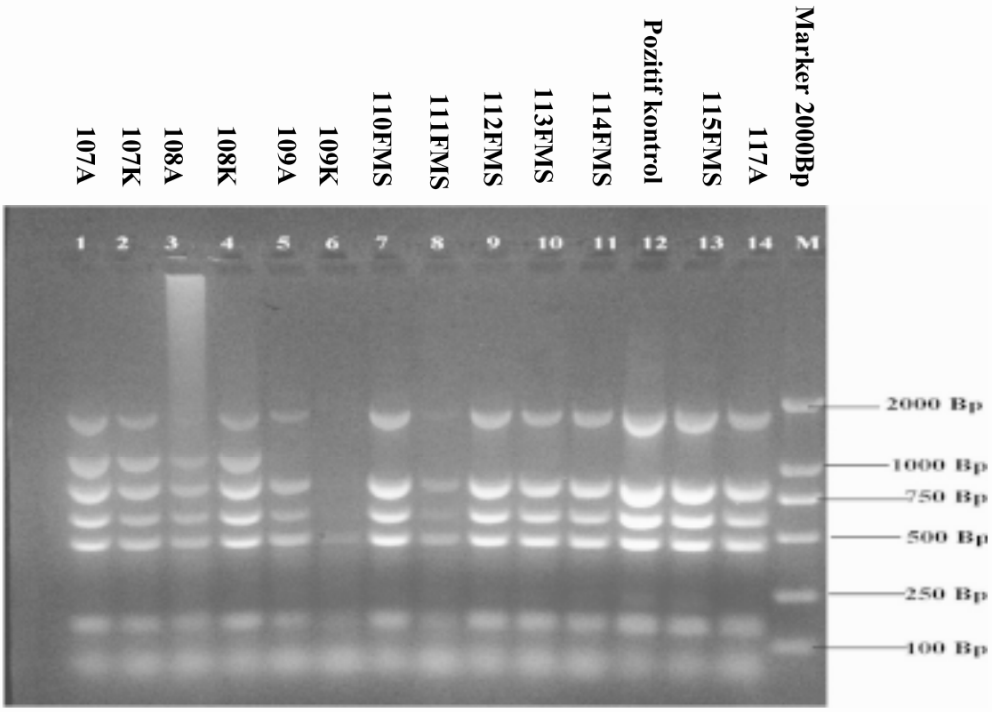
ŞEKİL 1



ŞEKİL 2



ŞEKİL 3



ŞEKİL 4