

## ÖZET

### NİCELİKSEL PCR İLE BİR İNSAN DIŞKISI NUMUNESİNDEN KOLOREKTAL KANSERİN TEŞHİS EDİLMESİNE YÖNELİK YÖNTEM

5

Bir insan dışkı numunesinden kolorektal kanserin teşhis edilmesine yönelik yöntem ve kit olup, (a) PCR vasıtasıyla, söz konusu insan dışkı numunesinde, seçilen primerler kullanılarak en az bir 16S rDNA bakteriyel sekansın konsantrasyonunun belirlenmesini, (b) sekansların konsantrasyonlarına ait oranlardan en az birinin belirlenmesini ve (c) adı (a)'daki sekanslardan en az birine ait konsantrasyondan ve/veya adı (b)'de elde edilen en az bir oran değerinden kolorektal kanserin teşhis edilmesini içermektedir. Buluş ayrıca PRC primerleri sağlamaktadır.

10

## İSTEMLER

1. Bir insan sujede kolorektal kanserin (CRC) gelişim riskinin belirlenmesine yönelik bir yöntem olup, aşağıdakileri içermektedir:

5

i. söz konusu sujeye ait bir dışkı numunesinden, SEKANS KİMLİK NUMARASI:1, SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10'dan oluşan listeden seçilen en az bir 16S rDNA bakteriyel sekansın nicemlenmesi;

10

ii. bir kontrol numunesindeki nicemleme seviyeleri ile (i)'deki suje numunesi nicemleme seviyelerinin kıyaslanması ve

iii. suje numunesi değerleri, söz konusu kontrol numunesindeki değerlerden sapmadığında, söz konusu insan sujede CRC gelişim riskinin belirlenmesi.

2. Bir insan sujede kolorektal kanserin (CRC) taranmasına yönelik bir yöntem olup, aşağıdakileri içermektedir:

15

i. söz konusu sujeye ait bir dışkı numunesinden, SEKANS KİMLİK NUMARASI:1, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4, SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10'dan oluşan listeden seçilen en az bir 16S rDNA bakteriyel sekansın nicemlenmesi;

20

ii. bir kontrol numunesindeki nicemleme seviyeleri ile (i)'deki suje numunesi nicemleme seviyelerinin kıyaslanması ve

25

iii. söz konusu insan sujede CRC'nin teşhisi, erken tespiti veya yinelenmesinin belirlenmesi veya suje numunesi değerlerinin söz konusu kontrol numunesindeki değerlerden sapmadığında söz konusu insan sujede bir kolonoskopinin gerçekleştirilmesinin gerektiğinin belirlenmesi.

3. Söz konusu yöntemin, adını (i)'de, söz konusu bakteriyel sekansların 2, 3 veya tamamını, tercihen tüm söz konusu bakteriyel sekansların nicemlenmesini içerdiği, istemler 1 veya 2'den herhangi birine göre yöntem.

30

4. Söz konusu bakteriyel sekanslardan en az ikisinin adını (i)'de nicemlendiği ve söz konusu sekanslara ait nicemleme seviyelerinin oranlarından en az birinin belirlendiği, ayrıca söz konusu sujedeki söz konusu oranlardan en az birinin, bir kontrol numunesindeki oran ile kıyaslanması içerdiği, söz konusu kontrol numunesinden bir oran sapmadığında, CRC'nin

35

göstergesi olduğu, istemler 1 ila 3'ten herhangi birine göre yöntem.

- 5 **5.** Söz konusu bakteriyel sekansların nicemlenmesinden önce, DNA'nın; herhangi bir şekilde numunenin fiziksel olarak bozulduğunu gösteren dışkı numunesinden özütlendiği ve DNA'nın silika membran kolonları üzerinde saflaştırıldığı, istemler 1 ila 4'ten herhangi birine göre yöntem.
- 10 **6.** Söz konusu bakteriyel sekansların nicemlenmesinin, niceliksel PCR ile gerçekleştirildiği, istemler 1 ila 5'ten herhangi birine göre yöntem.
- 10 **7.** Sekansların nicemeleme seviyelerinin, döngü eşik (Ct) değeri olarak ifade edildiği, istem 6'ya göre yöntem.
- 15 **8.** Söz konusu en az bir 16S rDNA nicemeleme seviyesinin, söz konusu insan dışkı numunesinden niceliksel PCR ile belirlendiği ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:1 nicemeleme seviyelerinin, sırasıyla SEKANS KİMLİK NUMARASI:2 ve 13 ile en az %90 özdeşliğe sahip primerler kullanılarak belirlendiği; SEKANS KİMLİK NUMARASI:4 nicemeleme seviyelerinin, sırasıyla SEKANS KİMLİK NUMARASI:5 ve 6 ile en az %90 özdeşliğe sahip primerler kullanılarak belirlendiği; SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 nicemeleme seviyelerinin, sırasıyla SEKANS KİMLİK NUMARASI:8 ve 9 ile en az %90 özdeşliğe sahip primerler kullanılarak belirlendiği; ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10 nicemeleme seviyelerinin ise, sırasıyla SEKANS KİMLİK NUMARASI:11 ve 12 ile en az %90 özdeşliğe sahip primerler kullanılarak belirlendiği, istemler 1 ila 7'den herhangi birine göre yöntem.
- 25 **9.** SEKANS KİMLİK NUMARASI:1 seviyelerinin, SEKANS KİMLİK NUMARASI:2 ve 13 sekansına sahip primerler kullanılarak belirlendiği, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4 seviyelerinin, SEKANS KİMLİK NUMARASI:5 ve 6 sekansına sahip primerler kullanılarak belirlendiği; SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 seviyelerinin, SEKANS KİMLİK NUMARASI:8 ve 9 sekansına sahip primerler kullanılarak belirlendiği; ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10 seviyelerinin ise SEKANS KİMLİK NUMARASI:11 ve 12 sekansına sahip primerler kullanılarak belirlendiği, istemler 1 ila 8'den herhangi birine göre yöntem.
- 30 **10.** Söz konusu yöntemin ayrıca, CRC'nin göstergesi olduğu bilinen bir veya daha fazla moleküler biyoişaretçinin tespit edilmesini ve/veya nicemlenmesini içerdiği, istemler 1 ila 35 **9'dan** herhangi birine göre yöntem.

**11.**Söz konusu yöntemin ayrıca, yöntem sonuçları, bilgisayarda okunabilir bir ortamda depolanması için istemler 1 ila 10'dan herhangi birine göre yöntem.

5 **12.**İstemler 1 ila 11'den herhangi birine ait yöntemlere göre, bir insan sujenin bir dışkı numunesinden, CRC'nin teşhis edilmesi, erkenden tespit edilmesi veya yinelenmesinin belirlenmesi, CRC gelişimi riskinin belirlenmesi veya bir kolonoskopinin gerçekleştirilmesine gerek olup olmadığı belirlenmesine yönelik bir kitin kullanılması olup, söz konusu kit aşağıdakileri içermektedir:

10

a. şunlardan oluşan gruptan seçilen bir tepken:

i. SEKANS KİMLİK NUMARASI:1, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4, SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10'dan oluşan listeden seçilen en az bir 16S rDNA sekansı ile spesifik olarak melezlenebilen nükleik asit problemleri veya

15

ii. SEKANS KİMLİK NUMARASI:1, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4, SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10'dan oluşan listeden seçilen en az bir 16S rDNA sekansı ile spesifik olarak çoğaltılabilen bir çift nükleik asit primeri; ve

20

b. bir insan dışkı numunesinden söz konusu sekansların bir veya daha fazlasına ait seviyelerin nicemlenmesine yönelik talimatlar.

25 **13.**(i)'deki söz konusu nükleik asit problemleri veya (ii)'deki nükleik asit primeri çiftinin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 9, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11, ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:12'den oluşan; veya bunlarla en az %90 özdeşliğe sahip olan gruptan seçildiği, istem 12'ye göre bir kitin kullanılması

30

## TARİFNAME

### NİCELİKSEL PCR İLE BİR İNSAN DIŞKISI NUMUNESİNDEN KOLOREKTAL KANSERİN TEŞHİS EDİLMESİNE YÖNELİK YÖNTEM

5

#### TEKNİK ALAN

Mevcut buluş, kolorektal kanserin (CRC) tespit edilmesi alanı ile ilgilidir. Spesifik olarak, dışkıdaki bir veya daha fazla 16S rDNA bakteriyel sekansının nicemlenmesine dayanarak bir insan sujude CRC'nin erken teşhisi, risk taraması ve izlenmesine yönelik yöntemler ile ilgilidir. Ayrıca, kolorektal kanserin biyoişaretçileri olarak söz konusu bakteriyel sekansları kullanımı ile ilgilidir.

15

#### ÖNCEKİ TEKNİK

Kolorektal kanser (CRC), Avrupa ve Birleşik Devletler'de ikinci en büyük kanser kaynağıdır. Ölüm sebebidir ve 2008 yılında 400,000'in üzerinde yeni vaka ve 200,000 ölüm ile birlikte Avrupa'da en sık teşhis konulan kanserdir. Bu veriler, önleyici önlemlerin alınması gerektiğini yansıtmaktadır.

20

CRC insidansı ve mortalitesinin azaltılmasına yönelik etkili ve ekonomik önlem, CRC riski tarama ve izleme testleridir. Tarama testleri, kanseri öncelikli olarak erkenden tespit edenler; ve kanseri erkenden tespit edebilenler ve ayrıca adenomatöz polipleri de tespit edebilenler olmak üzere gruplara ayrılmaktadır. Böylelikle polipektomi (yani, poliplerin çıkarılması) vasıtasıyla önlemeye yönelik daha büyük bir potansiyel sağlanmaktadır. (bakınız American Cancer Society (ACS) 2008 tarama ve gözetim kılavuzları, Levin ve meslektaşları (CA Cancer J Clinicians, 2008;58(3)130-160). Farklı tarama kılavuzları, ortalama riske sahip insanlarda ve artan riske veya yüksek riske sahip insanlarda uygulanmaktadır (http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/moreinformation/colonandrectumcancer/earlydetection/colorectal-cancer-early-detection-acr-recommendations).

30

Günümüzde, birincil olarak CRC'yi tespit eden testler dışkı testleridir, bunlar, yandakileri kapsamaktadır i) dışkı kan testleri: dışkı gizli kan testi ("FOBT") ve dışkı immünokimya testi ("FIT"); ve ii) gaita DNA ("sDNA") testi (bakınız http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/moreinformation/colonandrectumcancer

35

rearlydetection/colorectal-cancer-early-detection-screening-tests-used).

### i) Dışkıda Kan Testleri

5 Hem FOBT hem de FIT, dışkı numunesindeki kan miktarını tespit ederek CRC'ye yönelik tarama yapmaktadır. Testler, neoplastik dokunun, özellikle malignan dokunun, tipik mukozadan daha fazla kanadığı, kanama miktarının polip boyutu ve kanser aşamasıyla birlikte arttığı önermesine dayanmaktadır. Aralıklı kanamadan dolayı çoklu test önerilmektedir. Dışkı kan testleri, alt kolonda erken aşama tümörlerinden bazıları tespit edebilmekteyken, (i) üst kolonda CRC'yi tespit edememektedir, zira herhangi bir kan metabolize edilecektir ve/veya ii) daha küçük adenomatöz polipleri tespit edememektedir, böylelikle yanlış negatifler üretmektedir. Hemoroid, fisür, infalatuvar rahatsızlıklar (ülseratif kolit, Crohn hastalığı) bulaşıcı hastalıklar, hatta uzun mesafe koşusundan bile kaynaklı olan hehrangi bri gastro-intestinal kanama, yanlış pozitifler üretecektir (Beg ve meslektaşları J Indian AcadClin Med, 2002;3(2)153-158). Mevcut ACS kılavuzları (Levin ve meslektaşları CA Cancer J Clinicians, 2008;58(3)130-160), gayak-bazlı dışkı gizli kan testi (gFOBT) kullanılarak, 50 yaşındaki veya daha yaşlı olan ortalama riske sahip erişkinlere yönelik senelik tarama önermektedir. FOBT, Avrupa Birliği'nde önerilen tek testtir (Segnan N. ve meslektaşları 2010, European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities). Her iki kılavuz da, herhangi bir pozitif FOBT testini kolonoskopinin takip etmesini önermektedir.

### ii) Gaita DNA ("sDNA") Testi

25 sDNA testi, bir gaita numunesinden çeşitli DNA işaretçilerini ölçmektedir. Exact Sciences Corp. (Madison, WI)'da mevcut olan sDNA testi Cologuard™, K-ras, APC, ve P53 genlerinde ayrıhokta mutasyonları BAT-26'ya yönelik bir probu; DNA bütünlüğüne (DIA) yönelik bir işaretçiyi; ve vimentin geninin metilasyonunu içeren bir çoklu işaretçi panelini ölçmektedir (Levin ve meslektaşları CA Cancer J Clinicians, 2008;58(3)130-160). Bazı kılavuzlar sDNA testini önerirken, diğer kılavuzlar ise daha muhafazakardır ve bunu önermemektedir. Bir çalışmada, sDNA testinin bir versiyonu FOBT'den üstündü, ancak ilerlemiş adenomaların yalnızca %15'ini tespit etmişti (Imperiale ve meslektaşları N Engl J Med, 2004;351:2704-2714).

35

Adenomatöz polipleri ve kanseri tespit edebildiği ACS kılavuzlarında belirtilen testler, şunları içeren yapısal testlerdir: (i) kolonoskopi, (ii) esnek sigmoidoskopi ("FSIG"), (iii) çift-kontrastlı baryum lavmanı ("DCBE") ve (iv) CT kolonografi ("CTC", sanal kolonoskopi). Tüm bu yöntemler, hastanın bağırsaklarının temizlenmesini ve görselleştirmeye yardımcı olması için kolon içerisinde hava pompalanmasını gerektirmektedir. Mevcut kılavuzlar; kaynakların mevcut olması ve hastaların bir invaziv teste girmeye istekli olmaları durumunda, hem erken kanseri ve hem de adenomatöz polipleri tespit etmesi için tasarlanan testlerin kullanımını teşvik etmektedir.

10 Bir kolonoskopi, tüm mukozal ekstraksiyon biyopsilerinin doğrudan incelenmesini ve tek seferde kolon ve rektum poliplerinin rezeksiyonunu mümkün kılın bir invaziv tekniktir. Bu, kolorektal kanserin prognozunu geliştirmekle kalmamakta, aynı zamanda hastalığının da önlemektedir. Ancak bu teknik ile ilişkilendirilen ana dezavantajlar şunlardır: eğitimli personel gerektirdiği için yüksek maliyet, anestezi ile ilişkili ölüm riski ve intestinal perforasyon riski  
15 (Garborg K. ve meslektaşları, Ann Oncol., 2013;24(8):1963-72).

Deneyimli bir profesyonelin gerçekleştirdiği kolonoskopi %100 hassastır ve %100 spesifiktir, ancak kolonoskopinin riski ve maliyetinden dolayı kolonoskopiden önce, yukarıda bahsedildiği üzere, önemli sayıda yanlı pozitif sonuca, dolayısıyla eşit sayıda gereksiz kolonoskopiye yol açan, dışkıda kan tespitine yönelik yukarıda bahsi geçen dışkı testleri, yani gFOBT veya FIT gibi invaziv olmayan testler kullanılarak, bir risk popülasyonu taramasının gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu, etkili bir noninvaziv CRC tarama aletine yönelik ihtiyaç yansımaktadır. Etkili bir CRC tarama aletinin bu eksikliği, kolonoskopiye yönelik uzun bekleme listeleri (> 6 hafta) ve yanlı yönlendirilen kolonoskopilere ayrılan yüksek miktardaki ekonomik kaynaklar ile sonuçlanmaktadır. Bu durum, hem kamu sağlığı hem de özel sağlık için ciddi bir harcamaya işaret etmektedir ve sistemin satürasyonu ile sonuçlanmaktadır (Allison J. ve meslektaşları, Practical Gastroenterology, 2007, 3: 21-32).

Dolayısıyla, CRC'nin ve/veya adenomatöz poliplerin erken tespitine ve izlenmesine yönelik gerçek yöntemlerin hassas, invaziv ve/veya uygun maliyetli olması bakımından bir geliştirmeye ihtiyaç vardır.

CRC'lerin %5'inden azını kalıtsal olması ve çoğunluğunun ise sporadik olması, kolonik neoplazma dair hiçbir kişisel veya aile geçmişi olmayan hastalarda teşhis edilmesi göz önüne  
35 alındığında CRC'nin genetik temeli ve doğal geçmişi iyi tanımlanmıştır. Bu hastalığın etiyojisi

hala bilinmemektedir, ancak tümör gelişimine endojen ve eksojen faktörlerin aktif olarak dahil olduğu bir çok faktörlü kaynaktan şüphelenilmektedir. Bu faktörler şunlardır yaş, tütün, inflamatuvar bağırsak hastalığına dair kişisel geçmiş, beslenme, yaşam tarzı ve mikrobiyota.

5

Son zamanlarda, CRC hastalarındaki kolonik mukozadaki bakteriyel komunitelerin sağlıklı bireylerden farklı olduğu gösterilmiştir ve intestinal mikrobiyotanın, CRC'nin aşamaları boyunca gelişimi ve ilerlemesinde belirleyici bir ajan olarak öne sürülmüştür (Chen W ve meslektaşları PLoS One, 2012;7(6):e39743; Zhu Q ve meslektaşları Tumour Biol., 2013;34(3):1285-300; Ahn J ve meslektaşları J Natl Cancer Inst., 2013;105(24):1907-11; Na wu ve meslektaşları Microbial ecology, 2013;66(2):462-470).

WO2012/170478 numaralı doküman, bir bakteriyel imza kullanarak adenomlar ve kolorektal kanserin tespit edilmesine yönelik yöntemler ile ilgilidir. Mukozal biyopsilerden yapılan bakteriyel komunitelerin karakterize edilmesi için 16rRNA geni pirosekanslaması gerçekleştirilmiştir. Adenoma ve adenoma olmayan subjeler arasındaki göreceli bolluklar hesaplanmıştır olup, adenomaların elişiminin, bağırsak mukozasında mevcut olan çeşitli bakteriyel taksonların göreceli bolluğundaki değişimler ile ilişkili olduğu çıkarılmıştır. Spesifik olarak, 16S rRNA geninin (16sDNA) qPCR nicemlemesi vasıtasıyla adenomlara sahip veya bunlara sahip olmayan subjelerin normal rektal mukozasında *Fusobacteriumnucleatum* bolluğu belirlenmiş olup, bolluğun, kontrollere kıyasla adenoma vakalarında daha yüksek olduğu çıkarılmıştır. Söz konusu verilere göre, kolorektal karsinogenezin biyoişaretçisi olarak *F.nucleatum* kullanılması önerilmektedir.

25 Aşamaları boyunca CRC'nin gelişimi ve evriminde bir ajan olarak bağırsak mikrobiyotasının önemi, ayrıca, mukozal biyopsi numunelerinde buluş sahiplerinden biri tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada doğrulanmıştır olup, bu, kolorektal kansere sahip hastalarda firmikütler, aktinobakteriler ve *Escherichia coli* nin ve sağlıklı subjelerde *Faecalibacterium prausnitzii* nin bolluğunun ilişkisini göstermektedir (Mas de Xaxars T., 2012, Dipòsit legal: GI. 30 1664-2012, <http://hdl.han-dle.net/10803/94513>).

Bununla birlikte, mukozal biyopsilerde ve dışkı numunelerinde mikrobiyota bileşimi arasında farklılıklar olduğu da teknikte iyi bilinmektedir. Lepage ve meslektaşları (Inflamm Bowel Dis., 2005;11(5):473-80), belirli bir bireyde, dominant türlerin, mukoza ile ilişkili ve dışkı mikrobiyotası arasında farklılıklar gösterdiğini sergilemektedir. Benzer şekilde, Eckburg ve

meslektaşlar (Science, 2005;308(5728): 1635-1638), mukozal ve dışkı numunelerinde bulunan filogenetik soylar arasında istatistik olarak anlamlı farklılıklar rapor etmekte olup, dışkı mikrobiyotasında, dökülen mukozal bakteriler ve ayrı yapışkan olmayan luminal popülasyonun bir kombinasyonunu temsil ettiğini varsaymaktadır

5

Nechvatal ve meslektaşlar (J Microbiol Methods., 2008;72(2):124-32), dışkı DNA'sında, intestinal bakterilerin ve insan kanser işaretçilerinin epidemiyolojik olarak çalışılmasını bakımından bir kaynak olarak kullanılabildiğini göstermişlerdir. Özellikle, insan dışkılarından DNA özümlerindeki bakteriyel ve insan sekansları gerçek-zamanlı niceliksel PCR vasıtasıyla nicemlenmesini açıklamaktadır Balamurugan ve meslektaşlar (J Gastroenterol Hepatol., 2008;23:1298-303), kolorektal aknsere sahip hastaların dışkılarında, koruyucu etkiye sahip oldukları (yani bütirat-üreten bakteriler olan *Eubacterium rectale* ve *Faecalibacterium prausnitzii*) veya toksik veya karsinojenik oldukları (yani *Desulfovibrio* (sülfaindirgeyici bakteriler) ve *Enterococcus faecalis* (hücre dışı süperoksit üreten) metabolizma ürünleri ile spesifik bakterilerin gerçek-zamanlı niceliksel PCR vasıtasıyla nicemlenmesini açıklamaktadır

10

15

Bununla birlikte, ikisi de, CRC'ye yönelik biyoişaretçiler olarak bu tür bakteriyel sekansları teşhis veya tahmin değerinin belirlenmesi bakımından sessizdir.

US2014/0024036 numaralı dokümanda, Wang ve meslektaşlar CRC tespitine yönelik bir yöntem açıklamakta olup, bu, CRC hastaları ve kontrollerin insan dışkılarından qPCR vasıtasıyla *F.nucleatum* (FNN)'nin nusG geninin nicemlenmesini, %57 değerindeki bir duyarlılık ve %89.5 değerindeki bir özgüllük ile birlikte CRC'nin tespit edilmesini içermektedir.

20

Hassan Brim ve meslektaşlar (PLoS ONE, 8(12), e81352), 16S rRNA geni mikrodizi teknolojisi ve pirosekanslama kullanılarak, kolon poliplerine sahip hastalar ve sağlıklı bireylere ait dışkı numunelerinde bakteriyel sekansları taksonomik olarak profillenmesine işaret etmektedir. Kolon poliplerinin mevcudiyetinin, malignant ilerlemenin %10'u ile ilişkili olduğu söylenmektedir. İki grup arasında, cins seviyesinde, mikrobiyota bileşiminde hiçbir fark rapor edilmemiştir. Alt-cins seviyesinde, Bakteroidler grubundan bakterilerin, polip hastaların numunelerinde dominant olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, metagenomik analiz; analiz ve kıyaslamalar mevcut olan Bakteroid genomları ile karşılaştırıldığında bile, iki grup arasında bakteriyel gen prevalans bollukları arasında önemli farklılıklar açığa çıkarılmamıştır

25

30

Dışkılarda CRC'ye yönelik DNA biyoişaretçilerinin tespitine ve/veya nicemlenmesine yönelik yöntemler açıklanmış olsa da, dışkı numunelerinden, bir insan dujude, CRC'nin erken teşhisi,

35

risk taraması ve hasta izlemesine yönelik güvenilir yöntemlere hala ihtiyaç vardır. Bu tür bir yöntemin kullanılabilirliği, erken tespit vasıtasıyla CRC'nin etkili bir şekilde önlenmesini ve günümüzde, CRC tespitine yönelik mevcut standart tarama yöntemleri olan FOBT ve FIT testlerinin düşük doğruluğundan dolayı, CRC'si olduğundan şüphelenilen bireylerde gerektiğinden fazla gerçekleştirilen, kolonoskopiler gibi gereksiz yapısal inceleme testlerinin sayısını azaltılmasına mümkün klabilmektedir.

## **BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI**

10 Buluşun birinci yönü, bir insan sujude kolorektal kanseri (CRC) gelişimi riskinin belirlenmesine yönelik bir yöntem ile ilgili olup, bu, aşağıdakileri içermektedir:

- 15 i. söz konusu sujeye ait bir dışkı numunesinden, SEKANS KİMLİK NUMARASI:1, SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10'dan oluşan listeden seçilen en az bir 16S rDNA bakteriyel sekansın nicemlenmesi;
- ii. bir kontrol numunesindeki nicemleme seviyeleri ile (i)'deki suje numunesi nicemleme seviyelerinin kıyaslanması ve
- iii. suje numunesi değerleri, söz konusu kontrol numunesindeki değerlerden saptığında, söz konusu insan sujude CRC gelişim riskinin belirlenmesi.

20

Bir ikinci yönde, buluş, bir insan sujude kolorektal kanserin (CRC) taranmasına yönelik bir yöntem ile ilgili olup, bu, aşağıdakileri içermektedir:

- 25 i. söz konusu sujeye ait bir dışkı numunesinden, SEKANS KİMLİK NUMARASI:1, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4, SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10'dan oluşan listeden seçilen en az bir 16S rDNA bakteriyel sekansın nicemlenmesi;
- ii. bir kontrol numunesindeki nicemleme seviyeleri ile (i)'deki suje numunesi nicemleme seviyelerinin kıyaslanması ve
- 30 iii. söz konusu insan sujude CRC'nin teşhisi, erken tespiti veya yinelenmesinin belirlenmesi veya suje numunesi değerlerinin söz konusu kontrol numunesindeki değerlerden sağması durumunda söz konusu insan sujude bir kolonoskopinin gerçekleştirilmesi gerekliliğinin belirlenmesi.

35 Bir üçüncü yönde, buluş, İstemler 1 ila 11'den herhangi birine ait yöntemle göre, bir insan

5 sujenin bir d[isk]umunesinden, CRC'nin te[shis] edilmesi, erkenden tespit edilmesi veya yinelenmesinin belirlenmesi, CRC gelişimi riskinin belirlenmesi veya CRC için tahminde bulunması veya bir kolonoskopinin gerçekleştirilmesine gerek olup olmadığının belirlenmesine yönelik bir kitin kullanımı ile ilgili olup, söz konusu kit aşağıdakileri içermektedir:

a. şunlardan oluşan gruptan seçilen bir tepken:

10 i. SEKANS KİMLİK NUMARASI:1, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4, SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10'dan oluşan listeden seçilen en az bir 16S rDNA Sekansı ile spesifik olarak melezlenebilen nükleik asit problemleri veya

15 ii. SEKANS KİMLİK NUMARASI:1, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4, SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10'dan oluşan listeden seçilen en az bir 16S rDNA sekansı ile spesifik olarak çoğaltılabilen bir çift nükleik asit primeri; ve

b. bir insan d[isk]umunesinden söz konusu sekanslara bir veya daha fazlasına ait seviyelerin nicemlenmesine yönelik talimatlar.

## 20 ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

Aşağıdaki semboller, aşağıdaki anlamlara gelecek şekilde şekiller 1 ile 7'de kullanılmaktadır

- \* istatistik anlamlıdır  $p = 0.05$  olduğu anlamına gelmektedir
- 25 - \*\* istatistik anlamlıdır  $p = 0.01$  olduğu anlamına gelmektedir
- \*\*\* istatistik anlamlıdır  $p = 0.005$  olduğu anlamına gelmektedir
- Şekiller 8 ile 26'da, istatistik anlamlı \* ile gösterilmektedir ve p-değeri ilgili tablolarda bulunmaktadır

30 Şekil 1. 2 sekansa yönelik Ct değerlerinin oranı SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4. CRC, kolorektal kanseri hastalarına ait d[isk]umunelerinden elde edilen değerleri temsil etmektedir ve C ise, sağlıklı hastalardan elde edilen kontrol değerlerini temsil etmektedir.

35 Şekil 2. 2 sekansa yönelik Ct değerlerinin oranı SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7/SEKANS

KİMLİK NUMARASI: 4. CRC, kolorektal kanseri hastalarına ait dışkı numunelerinden elde edilen değerleri temsil etmektedir ve C ise, sağlıklı hastalardan elde edilen kontrol değerlerini temsil etmektedir.

5 Şekil 3. 2 sekansa yönelik Ct değerlerinin oranı SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1. CRC, kolorektal kanseri hastalarına ait dışkı numunelerinden elde edilen değerleri temsil etmektedir ve C ise, sağlıklı hastalardan elde edilen kontrol değerlerini temsil etmektedir.

10 Şekil 4. SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 sekansa yönelik mutlak Ct değerleri. CRC, kolorektal kanseri hastalarına ait dışkı numunelerinden elde edilen değerleri temsil etmektedir ve C ise, sağlıklı hastalardan elde edilen kontrol değerlerini temsil etmektedir.

15 Şekil 5. SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 sekansa yönelik mutlak Ct değerleri. CRC, kolorektal kanseri hastalarına ait dışkı numunelerinden elde edilen değerleri temsil etmektedir ve C ise, sağlıklı hastalardan elde edilen kontrol değerlerini temsil etmektedir.

20 Şekil 6. 2 sekansa yönelik Ct değerlerinin oranı SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4/ SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1. CRC, kolorektal kanserine ait dışkı numunesinden elde edilen değerleri temsil etmektedir, Yüksek Risk, son kolonoskopisinde polipleri olan ve kolorektal kanser gelişimine yönelik artan bir riske sahip, Lynch sendromu olan bireylerden elde edilen değerleri temsil etmektedir, Düşük Risk, son kolonoskopisinde polipi olmayan, Lynch sendromuna sahip bireylerden elde edilen değerleri temsil etmektedir.

25 Şekil 7. SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 sekansa yönelik mutlak Ct değerleri. CRC, kolorektal kanserine ait dışkı numunesinden elde edilen değerleri temsil etmektedir, Yüksek Risk, son kolonoskopisinde polipleri olan ve kolorektal kanser gelişimine yönelik artan bir riske sahip, Lynch sendromu olan bireylerden elde edilen değerleri temsil etmektedir, Düşük Risk, son kolonoskopisinde polipi olmayan, Lynch sendromuna sahip  
30 bireylerden elde edilen değerleri temsil etmektedir.

Şekil 8. B3 çoğaltmasına yönelik primerlerin doğrulanması Çoğaltma grafikleri (8a) ve ayrıştırma eğrisi (8b).

35 Şekil 9. B10 çoğaltmasına yönelik primerlerin doğrulanması Çoğaltma grafikleri (9a) ve

ayrıştırma eğrisi (9b).

Şekil 10. B41 çoğaltmasında yönelik primerlerin doğrulanması Çoğaltma grafikleri (10a) ve ayrıştırma eğrisi (10b).

5

Şekil 11. B46 çoğaltmasında yönelik primerlerin doğrulanması Çoğaltma grafikleri (11a) ve ayrıştırma eğrisi (11b).

Şekil 12. B48 çoğaltmasında yönelik primerlerin doğrulanması Çoğaltma grafikleri (12a) ve ayrıştırma eğrisi (12b).

10

Şekil 13. B50 çoğaltmasında yönelik primerlerin doğrulanması Çoğaltma grafikleri (13a) ve ayrıştırma eğrisi (13b).

15

Şekil 14. CRC ve C gruplarında B3'e yönelik mutlak Ct değerleri.

Şekil 15. CRC ve C gruplarında B48'e yönelik mutlak Ct değerleri.

Şekil 16. CRC ve C gruplarında B10'a yönelik mutlak Ct değerleri.

20

Şekil 17. CRC ve C gruplarında B46'ya yönelik mutlak Ct değerleri.

Şekil 18. CRC, L ve C gruplarında B3'e yönelik mutlak Ct değerleri:

25

Şekil 19. CRC, L ve C gruplarında B48'e yönelik mutlak Ct değerleri:

Şekil 20. CRC, L ve C gruplarında B10'a yönelik mutlak Ct değerleri:

Şekil 21. CRC, L ve C gruplarında B46'ya yönelik mutlak Ct değerleri:

30

Şekil 22. CRC+L'ye karşı C'de B3, B10, B46 ve B48' yönelik mutlak Ct değerleri.

Şekil 23: CRC, Yüksek Risk L, Düşük Risk L ve C gruplarında mutlak Ct değerlerinin B48/B10 oranı

35

Şekil 24: CRC, Yüksek Risk L, Düşük Risk L ve C gruplarında mutlak Ct değerlerinin B3/B10 oranı

5 Şekil 25: CRC, Yüksek Risk L, Düşük Risk L ve C gruplarında mutlak Ct değerlerinin B46/B10 oranı

Şekil 26: CRC, Yüksek Risk L, Düşük Risk L ve C gruplarında mutlak Ct değerlerinin B3/B48 oranı

10 Şekil 27: Sağlıklıya karşı CRC analizinde B3, B10, B46 ve B48'e yönelik ROC eğrileri.

Şekil 28: Sağlıklıya karşı Lynch analizinde B3, B10, B46 ve B48'e yönelik ROC eğrileri.

15 Şekil 29: Sağlıklıya karşı CRC + Lynch analizinde B3, B10, B46 ve B48'e yönelik ROC eğrileri. Şekil 30: CRC'ye karşı Lynch analizinde B3, B10, B46 ve B48'e yönelik ROC eğrileri.

## AYRINTILI AÇIKLAMA

20 Mevcut buluşta, CRC ve/veya adenomatöz polipler teşhisi, erken tespiti, risk taraması ve izlenmesi ile ilişkilendirilen spesifik bakteriyel sekanslar tanımlanmıştır

Buluşun birinci yönü, bir insan sujude kolorektal kanserin (CRC) ve/veya adenomatöz poliplerin taranmasına yönelik bir yöntem ile ilgili olup, bu, aşağıdakileri içermektedir:

25

i. söz konusu sujeye ait bir dışkı numunesinden, SEKANS KİMLİK NUMARASI:1, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4, SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10 veya bunun bir tamamlayıcı rRNA sekansından oluşan listeden seçilen en az bir 16S rDNA bakteriyel sekansın nicemlenmesi; ve

30

ii. bir insan sujude CRC ve/veya poliplere yönelik teşhis, erken tespit, yineleme belirlemesi, gelişim riski belirlemesi veya tahmin; veya söz konusu insan sujude kolonoskopinin gerçekleştiriliği gerçekleştirilmeyeceğinin belirlenmesi; veya prognozun belirlenmesi, burada söz konusu insan suje, CRC ve/veya polip teşhisi koyulan bir hastadır veya söz konusu sekanslardan en az birinin nicemleme seviyelerinden, CRC

35 ve/veya poliplere sahip bir hastada bir terapinin yönlendirilmesi.

Mevcut başvuruda, SEKANS KİMLİK NUMARASI:1 ile tanımlanan sekans ayrıca "B3" olarak tanımlanmaktadır. Benzer şekilde, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4, ayrıca "B10" olarak tanımlanmaktadır. SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 ayrıca "B46" olarak tanımlanmaktadır ve  
5 SEKANS KİMLİK NUMARASI:10 ise ayrıca "B48" olarak tanımlanmaktadır. Bu isimler değişimli olarak kullanılmaktadır. B3, B10, B46 ve B48, mevcut buluşa ulaşılması için yapılan tüm deneylerin gerçekleştirilmesi sırasında sekansların tanımlanması için mevcut başvurunun sahipleri tarafından kullanılan isimlerdir. SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1, 4, 7 ve 10 ile  
10 tanımlanan sekanslar, yandaki erişim numaraları altında, EMBL-EBI kamusal sekans veri tabanında mevcuttur: GQ411111.1 (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1), GQ411118.1 (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4), GQ411150.1 (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7), GQ411152.1 (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10).

B3, B10, B46 ve B48 sekansları önceden, kültürsüz bakteri izolatlarından izole edilen denatüran gradyan jel elektroforez (DGGE) jel bantlarına karşı gelmektedir. BLAST analizleri, karşılaşılan bakteriyel türlerin tanımlanması amacıyla gerçekleştirilmiştir:

B3 16S rDNA için en iyi eşleşen BLAST: *Collinsella aerofaciens*;  
B10 16S rDNA için en iyi eşleşen BLAST: *Faecalibacterium prausnitzii*;  
20 B46 16S rDNA için en iyi eşleşen BLAST: *Faecalibacterium prausnitzii*, *Subdoligranulum variabilis*;  
B48 16S rDNA için en iyi eşleşen BLAST: *Ruminococcus*, *Roseburia*, *Coprococcus*.

25 Burada kullanılan üzere, "kolorektal kanser" veya "CCR" veya "CRC" terimi, kolonda veya rektumda başlayan kanser için kullanılmaktadır. Bu kanserler, nerede başladığına bağlı olarak, ayrı ayrı kolon kanseri veya rektal kanser olarak da adlandırılabilmektedir. Kolon kanseri veya rektal kanser ortak birçok özelliğe sahiptir.

30 ACS'ye göre, çeşitli kanser tipleri, kolonda veya rektumda başlayabilmektedir. Kolorektal kanserlerin %95'inden fazlası adenokarsinomlar olarak bilinen kanser tipidir. Bu kanserler, kolonun veya rektumun içerisinde mukusun kaymasıyla başlayan bezler oluşturan hücrelerde başlamaktadır. Tümörlerin diğer, daha az yaygın olan tipleri ayrıca kolonda veya rektumda da başlayabilmektedir. Bunlar yandakileri kapsamaktadır: karsinoid tümörler, gastrointestinal  
35 stromal tümörler (GIST'ler), lenfomalar ve sarkomalar.

Kanser taramalarının amacı, ileri seviyedeki hastalığın insidansındaki azalma ile ölümlülüğün azaltılmasıdır. Bu amaçla, modern CRC taramaları erken-aşama adenokarsinomaların tespit edilmesi ve adenomatöz poliplerin tespit edilmesi ve çıkarılması vasıtasıyla bu amaca ulaşabilmekte olup, sonraki, genel olarak zorunlu olmayan öncül lezyonlar olarak kabul edilmektedir.

Bir "adenomatöz polip", kolon gibi bir organın iç zarında anormal bezel hücrelerin kanserli olmayan şekilde büyümesidir. Örneğin, kolonda büyüeyebilen üç tip adenomatöz polip, borumsu, vilöz, ve tüberovilöz adenomlardır. Adenomatöz polipler, 50 yaş üzerindeki yetişkinlerde yaygındır ancak poliplerin çoğu, adenokarsinoma dönüşmemektedir; histoloji ve biyopsi, bunların klinik önemini belirlemektedir.

ACS'ye göre, hem polipleri hem de kanseri bulma şansının iyi olan testler tercih edilmektedir, poliplerinin bulunması ve alınması ise bazı insanlar için kolorektal kansere yakalanmaktan kurtarmaktadır. Tercihen, buluşa ait yöntem, CRC ve adenomatöz poliplerin taranmasına yönelik bir yöntemdir.

Belirli bir yapılandırılmada, buluşa ait yöntem, CRC ve/veya adenomatöz poliplerin teşhisine veya tespitine yönelik, tercihen CRC ve/veya adenomatöz poliplerin erken tespitine yönelik bir tarama yöntemidir. "Erken tespit" ifadesi, klinik göstergelerin mevcudiyetinden önceki tespiti işaret etmektedir. "Tespit" ve "teşhis" terimleri, mevcut tarifnamede değişimli olarak kullanılmaktadır. Buluşa ait yöntemin, bir erken aşama hastalığın teşhisi ile kolorektal kanserin önlenmesi için etkili bir araç olduğu bulunmuştur.

Belirli bir yapılandırılmada, buluşa ait tarama yöntemi, 50 yaşındaki veya daha yaşlı kişilerde gerçekleştirilmektedir. 50 yaşındaki veya daha yaşlı olan ortalama riske sahip kadınlar ve erkekler, kolorektal kanseri tarama testlerini takip etmeleri için desteklenmektedir (bakınız Levin ve meslektaşları, CA Cancer J Clinicians, 2008;58(3)130-160 referansındaki Tablo 2).

Bir başka yapılandırılmada, buluşa ait tarama yöntemi, artan riske ve/veya yüksek riske sahip kişilerde gerçekleştirilmektedir. Spesifik kılavuzlar, artan riske veya yüksek riske sahip hastalara yöneliktir.

ACS'ye göre (bakınız Levin ve meslektaşları, CA Cancer J Clinicians, 2008;58(3)130-160

referansındaki Tablo 3, artan riske veya yüksek riske sahip sujeler aşağıdakileri kapsamaktadır

#### Artan risk

5

- önceki kolonoskopide polip geçmişine sahip olan sujeler;
- kolorektal kanser geçmişine sahip olan sujeler; ve
- kolorektal kanser veya adenomatöz poliplere yönelik aile geçmişi olan sujeler.

#### 10 Yüksek risk

- genetik testler ile teşhis edilen ailevi adenomatöz polipozise (FAP) veya genetik test olmaksızın şüphelenilen FAP'a sahip sujeler;
- genetik test olmadan aile geçmişi dayanarak, kalıtsal, polipozis olmayan kolon kanserine sahip (HNPCC veya Lynch sendromu) veya artan HNPCC riskine sahip sujeler; ve
- kronik ülseratif kolit veya Crohn hastalığı gibi, İnflamatuvar bağırsak hastalığına sahip sujeler.

20 Mevcut buluşun bir amaçlı bir ön-teşhis aracı olarak sağlanması. Spesifik olarak, mevcut buluş, eğilimi olan veya CRC ve/veya adenomatöz polip geliştirme riski olan sujelerin tanımlanmasıyla, klinik göstergelere sahip olmadan önce kolorektal kanserin teşhis edilmesine yönelik bir yöntem sağlamaktadır

25 Belirli bir yapılandırılmada, mevcut buluşa ait tarama yöntemi, bir insan sujede CRC ve/veya adenomatöz poliplerin gelişim riskinin belirlenmesine yönelik bir yöntem olup, aşağıdakileri içermektedir:

- i. söz konusu sujeye ait bir dışkı numunesinden, SEKANS KİMLİK NUMARASI:1, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4, SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10 veya bunun bir tamamlayıcı 16S rRNA sekansından oluşan listeden seçilen en az bir 16S rDNA bakteriyel sekansının nicemlenmesi; ve
- ii. söz konusu sekansların en az birine ait nicemeleme seviyelerinden CRC ve/veya adenomatöz polip gelişim riskinin belirlenmesi.

35

Tercih edilen bir yapılandırılmada, mevcut buluşa ait tarama yöntemi, artan riskli ve/veya yüksek riskli sujelere, tercihe Lynch sendromu taşıyıcılarında CRC ve/veya adenomatöz polip gelişimi riskinin belirlenmesine yönelik bir yöntemdir.

5 "Lynch sendromu" terimi, kolorektal kanserin yanı sıra, uterus zarı kanseri (endometriyal kanser), over kanseri ve diğer bazı kanserlere yönelik riski kişilerde fazlaca artıran bir riski durum olan, kalıtsal, polipozis olmayan kolorektal kansere veya HNPCC'ye işaret etmektedir. Bu duruma sahip insanlar, genelde ilk olarak çoklu poliplere sahip olmadan, genç yaşta kanser geliştirmektedir.

10 Mevcut buluşa ait tarama yöntemi, polipleri olan (yüksek riskli popülasyon) ve polipleri olmayan (düşük riskli popülasyon) Lynch sendromu hastaları arasında istatistik olarak anlamlı bir şekilde ayrım yapabilme yetisini, Örnek 4'te (Tablolar 3 ve 4) göstermiştir. SEKANS KİMLİK NUMARASI:4'ün (B10) nicemlemesi ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 (B46) /  
15 SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 (B10) oranının belirlenmesi, Örnek 4'teki sonuçlara göre iyi göstergeler olarak görülmektedir. Bu bağlamda, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 (B10) ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 (B46) / SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 (B10) oranı poliplerin mevcudiyetinin taranmasına yönelik buluşa ait yöntemte kullanılan için tercih edilen biyoişaretçilerdir.

20 Önceki kolonoskopide polip geçmişi olan veya kanser rezeksiyonundan sonra kolorektal kanser geçmesine sahip olan sujelere, izleme veya gözetim amaçlarıyla, yani söz konusu insan sujelerde kanser ve/veya adenomatöz polip yinelenmesinin tespit edilmesi için tarama testleri gerçekleştirilmektedir.

25 Bir diğer belirli yapılandırılmada, mevcut buluşa ait tarama yöntemi, poliplere veya kolorektal kansere dair bir geçmişi olan bir insan sujede kolorektal kanserin (CRC) ve/veya adenomatöz poliplerin tespit edilmesine yönelik bir izleme yöntemi olup, aşağıdakileri içermektedir:

30 i. söz konusu sujeye ait bir dışkı numunesinden, SEKANS KİMLİK NUMARASI:1, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4, SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10 veya bunun bir tamamlayıcı 16S rRNA sekansından oluşan listeden seçilen en az bir 16S rDNA bakteriyel sekansının nicemlenmesi; ve

35 ii. söz konusu sekansların en az birine ait nicemeleme seviyelerinden, CRC ve/veya adenomatöz poliplerin yinelenmesinin belirlenmesi.

Mevcut buluşa ait tarama yöntemi, CRC'ye dair bir geçmişi olan ve son kolonoskopisinde polipleri olan Lynch hastalar (yüksek riskli popülasyon) ve CRC'ye dair bir geçmişi olmayan ve son kolonoskopisinde polipleri olmayan (düşük riskli popülasyon) Lynch hastalar arasında istatistik olarak anlamlı bir şekilde ayrım yapabilme yetisini, Örnek 8'de (Tablo 8) göstermiştir. Özellikle önemli sonuçlar, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1/ SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 (B3/B10), SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4/ SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 (B10/B46), SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1/ SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10 (B3/B48) ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10/ SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 (B48/B10) oranları nicemlenmesi ile elde edilmektedir.

Bu bağlamda, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1/ SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 (B3/B10), SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4/ SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 (B10/B46), SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1/ SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10 (B3/B48) ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10/ SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 (B48/B10) oranları tercihen, CRC geçmişine sahip Lynch hastalar gibi, artan riskteki veya yüksek riskteki hastalarda polip mevcudiyetinin taranması için buluşa ait yöntemde kullanılan için tercih edilen biyoişaretçilerdir.

Belirli bir diğer yapılandırılmada, mevcut buluşa ait tarama yöntemi, bir insan sujede kolonoskopinin gerçekleştirilip gerçekleştirilmeyeceğinin belirlenmesine yönelik bir yöntem olup, aşağıdakileri içermektedir:

- i. söz konusu sujeye ait bir dışkı numunesinden, SEKANS KİMLİK NUMARASI:1, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4, SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10 veya bunun bir tamamlayıcı 16S rRNA sekansından oluşan listeden seçilen en az bir 16S rDNA bakteriyel sekansları nicemlenmesi; ve
- ii. söz konusu sekansların en az birine ait nicemleme seviyelerinden, söz konusu insan sujede kolonoskopinin gerçekleştirilip gerçekleştirilmeyeceğinin belirlenmesi.

Teknikte orta derecede uzman bir kişi, buluşa ait bakteriyel işaretçilerin nicemlenmesine ve analizine yönelik çeşitli yöntemleri ve cihazları bilmektedir. "Nicemleme" terimi, bir numunede bir spesifik nükleik asit sekans miktarını nicemlenebilmesine işaret etmektedir. Hedef nükleik asit sekanslarının niceliklerinin ölçülmesine yönelik moleküler biyoloji yöntemleri teknikte iyi bilinmektedir. Bu yöntemler, bunlarla sınırlı olmamak üzere, uç nokta PCR,

kompetitif PCR, revers transkriptaz-PCR (RT-PCR), niceliksel PCR (qPCR), revers transkriptaz qPCR (RT-qPCR), PCR-ELISA, DNA mikro tahlilleri, dot-blot veya Floresan In Situ Melezleme tahlili (FISH) gibi in situ melezleme tahlilleri, dallanmış DNA (Nolte, Adv. Clin. Chem., 1998,33:201-235) ve söz konusu yöntemlerin multipleks versiyonları kapsamaktadır (örneğin bakınız Andoh ve meslektaşları, Current Pharmaceutical Design, 2009; 15,2066-2073). Tercih edilen primerler ve/veya problemler, tipik olarak, bakteriyel nükleik asit sekansları artan miktarlarda doğrudan veya lineer bir yansıtarak, tahmin edilebilir şekilde reaksiyon göstermektedir. Uygun standartların hazırlanmasıyla ve bunlara kıyasla, bir numunede belirli bir nükleik asit sekansın miktarı kolayca nicemlenebilmektedir.

10

Tercihen, söz konusu nükleik asit sekansı SEKANS KİMLİK NUMARASI:1, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4, SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10'dan oluşan listeden seçilen bir 16S rDNA sekansıdır.

15

Özellikle tercih edilen bir niceme yöntemi FISH olup, bu, bireysel bakteriyel sekansları doğrudan nicemlenmesi için, prob melezleme ile floresan mikroskopisini, konfokal lazer mikroskopisini veya akış sitometrisini birleştirmektedir. FISH metodolojisine dair incelemeler için, bakınız örneğin Harmsen ve meslektaşları, Appl Environ Microbiol, 2002;68 2982-2990, Kalliomaki ve meslektaşları, J Allerg Clin Immunol, 2001;107 129-134; Tkachuk ve meslektaşları, Genet. Anal. Tech. Appl., 1991;8:67-74; Trask ve meslektaşları, Trends Genet., 1991;7 (5): 149-154; ve Weier ve meslektaşları, Expert Rev. Mol. Diagn., 2002,2(2):109-119; ve U.S. Pat. No: 6,174,681.

20

25

Özellikle tercih edilen bir başka niceme yöntemi ise, ayrıca gerçek-zamanlı PCR olarak da bilinen niceliksel PCR'dir (qPCR). PCR prosesi teknikte iyi bilinmektedir ve dolayısıyla burada ayrıntı olarak açıklanmamaktadır. Q-PCR teknolojisine dair genel değerlendirme ve protokoller, SYBR Green qPCR uygulamaları üzerine Sigma-Aldrich gibi satıcılarda mevcuttur, bakınız örneğin <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/sybr-green-qpcr.html> veya <http://www.sig-maaldrich.com/life-science/molecular-biology/pcr/quantitative-pcr/qpcr-technical-guide.html>. Bakteriyel gen işaretçilerinin bolluğu ve ekspresyonunun nicemlenmesine yönelik qPCR yöntemlerine dair bir inceleme için, bakınız örneğin Smith CJ ve Osborn AM., FEMS Microbiol Ecol., 2009;67(1):6-20.

30

35

"Niceme seviyeleri" terimi, konsantrasyon (hacim birimi başına DNA miktarı) hücre sayısına başına DNA miktarı döngü eşik değeri (Ct değeri) veya bunun herhangi bir matematiksel

dönümünü olabilmektedir. Tercih edilen bir yapılandırılmada, söz konusu bakteriyel sekansların nicemlemesi qPCR ile gerçekleştirilmektedir. Daha çok tercih edilen bir yapılandırılmada, söz konusu bakteriyel sekansların nicemlemesi, qPCR ile gerçekleştirilmektedir ve niceme seviyeleri ise Ct değerleridir. Ct (döngü eşiği) değeri, floresan sinyalin eşiğin geçmesi için gereken qPCR döngüsü sayıları olarak tanımlanmaktadır. Ct seviyeleri, numunedeki hedef nükleik asit sayısına ters orantılıdır (yani, Ct seviyesi düştükçe numunedeki hedef nükleik asit miktarı artmaktadır).

Bir dışı numunesindeki bir hedef nükleik sit sekansının (örneğin SEKANS KİMLİK NUMARASI:1) bolluğunun nicemlemesi, mutlak veya göreceli olabilmektedir. Göreceli niceme, evrensel primerler kullanılarak toplam bakterilerin (Öbakteriler) belirlenmesi ve Öbakterilerin bir yüzdesi olarak hedef nükleik asit sekansının bolluğunun ifade edilmesi (örneğin SEKANS KİMLİK NUMARASI:1/Öbakteri oranı) gibi, bir veya daha fazla iç referans gene, yani referans suşlardan 16S rRNA genlerine dayanmaktadır. Mutlak niceme, DNA standartları ile kıyaslama vasıtasıyla hedef moleküllerin kesin sayısını vermektedir.

Belirli bir yapılandırılmada, buluşa ait yöntem ayrıda, adım i)'den sonra, sujenin numune seviyelerinin, bir kontrol numunesindeki seviyeler ile kıyaslanması içermektedir, burada kontrol numunesindeki ilgili sekansların seviyelerinden, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10'dan oluşan listeden seçilen bir veya daha fazla sekansa ait seviyeler saptığında (tercihen, istatistik olarak anlamlı bir sapma), bu, CRC ve/veya adenomatöz poliplerin göstergesidir. Örneğin, niceme seviyeleri, art(+) /eksi(-) ortalama (kesik) değerden bir sapma sergilediğinde, bir kontrol numunesinde ölçülen ilgili değerlerin standart sapması, CRC ve/veya adenomatöz polipin göstergesidir.

Söz konusu suje numunesindeki söz konusu sekansların bir veya daha fazlasına ait konsantrasyon seviyelerinin, eksi ortalama (kesik) değerden daha düşük olduğu tercih edilen bir yapılandırılmada, bir kontrol numunesinde ölçülen ilgili sekansların seviyelerindeki standart sapma, CRC ve/veya adenomatöz poliplerin göstergesidir. Söz konusu suje numunesinde söz konusu sekanslardan bir veya daha fazlasına ait Ct seviyelerinin, ortalama (kesik) değerinden daha yüksek olduğu tercih edilen bir başka yapılandırılmada, bir kontrol numunesinde ölçülen ilgili sekansların seviyelerine ait standart sapma, CRC ve/veya adenomatöz poliplerin göstergesidir.

“Kontrol numunesi” terimi, referans popülasyonuna ait toplanmış kontrol numunelerine işaret edebilmektedir, örneğin kontrol numuneleri, sağlıklı sujelere ait, adenomatöz poliplere sahip olmayan sujelere ait, geçmişte adenomatöz poliplere ve/veya kolorektal kansere ve bunların kombinasyonlarına sahip olmayan sujelere ait numuneler olabilmektedir.

5

İnsan sujelerin, yukarıda bahsi geçen referans popülasyonlarından biri altında sınıflandırılması bir kolonoskopi araştırması ile gerçekleştirilmektedir. Örneğin, “sağlıklı sujeler”, önceden gerçekleştirilen bir kolonoskopide, adenomatöz polip veya kolorektal kanser sergilememiş olan sujelerdir.

10

Tercihen, buluşa ait yöntem, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10’dan oluşan listeden seçilen 2, 3 veya 4 sekansın, tercihen 4 sekansın tümünün nicemlenmesini içermektedir.

15

Belirli bir yapılandırılmada, buluşa ait yöntem, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10’dan oluşan listeden seçilen en az iki sekansın nicemlenmesini ve söz konusu sekanslardan en az ikisi arasındaki ilişkinin belirlenmesini içermektedir. Tercihen, söz konusu sekanslardan ikisi, üçü veya dördü arasındaki ilişki (örneğin oran, çok-varyantlı analiz, vb.) belirlenmektedir.

20

Tercih edilen bir yapılandırılmada, bu en az iki sekans arasındaki oran, bir birinci sekansın niceme seviyelerinin, bir ikinci sekansın niceme seviyelerine bölünmesi ile elde edilmektedir. Örneğin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 sekanslarının konsantrasyon oranı SEKANS KİMLİK NUMARASI:10 sekansının konsantrasyonunun, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4 sekansının konsantrasyonuna bölünmesi ile elde edilmektedir. SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 oranı ayrıca, SEKANS KİMLİK NUMARASI:10 olarak tanımlanan sekansın Ct değerinin, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4 olarak tanımlanan sekansın Ct değerine bölünmesi ile de elde edilebilmektedir.

30

Buluşa ait yöntemin bir başka yapılandırılmada, söz konusu bakteriyel sekanslardan en az biri adını i)de nicemlenmektedir ve suje numunesindeki söz konusu sekans seviyelerinin en az bir oranı belirlenmektedir, yöntem ayrıca, bir kontrol numunesindeki ilgili oranlar ile söz konusu sujedeki söz konusu oranlardan en az birinin kıyaslanması içermektedir, burada söz konusu kontrol numunesindeki orandan bir sapma (tercihen istatistik olarak anlamlı bir

35

sapma) CRC ve/veya adenomatöz poliplerin göstergesidir. Örneğin, söz konusu oranlardan biri veya daha fazlasının, art(+) /eksi(-) ortalama (kesik) değerden bir sapma sergilediğinde, bir kontrol numunesinde ölçülen ilgili oranların standart sapmasız CRC ve/veya adenomatöz poliplerin göstergesidir.

5

“İstatistik olarak anlamlı terimi, test numunesi ve kontrol numunesi arasındaki farklara işaret edilirken, uygun istatistik analizin kullanılması durumunda, aynı olan grupların olasılığının %5’ten az olması (örneğin  $p < 0.05$  olması) durumu ile ilgilidir. Bir başka ifadeyle, tamamen rastgele şekilde aynı sonuçların elde edilmesi olasılığı, 100 girişimden 5’inden daha azdır. Teknikte uzman bir kişi, uygun istatistik analizi nasıl seçeceğini bilecektir. Tipik olarak, uygun istatistik analiz; örneğin Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak, çalışmadaki değişkenin normal bir dağılıma sahip olup olmadığına bağlı olarak belirlenmektedir. Tercihen, normal bir dağılım olduğu durumlarda, t-testi veya ANOVA testi gibi bir parametrik model kullanılabilmektedir; ve normal bir dağılım olmadığı durumlarda ise, Mann-Whitney U testi veya Kruskal-Wallis testi gibi parametrik olmayan bir model kullanılabilmektedir.

10

15

Belirli bir yapılandırılmada, duyarlılık, özgüllük, doğruluk, ROC analizi sonuçları veya bunların bir kombinasyonu, buluşa ait tarama yönteminin açıklanması için kullanılmaktadır. Özellikle, bunlar, yöntemin ne kadar iyi ve güvenilir olduğunun nicemlenmesi için kullanılmaktadır.

20

Duyarlılık, özgüllük ve doğruluk açıklamasıyla birlikte yaygın olarak kullanılan çeşitli terimler mevcuttur. Bunlar, gerçek pozitif (TP), gerçek negatif (TN), yanlış negatif (FN) ve yanlış pozitif (FP). Bir hastada bir hastalığın mevcut olduğu kanımlandığında, verilen tarama testi ayrıca hastalığın mevcudiyetini göstermekte olup, testin sonucu gerçek pozitif olarak değerlendirilmektedir. Benzer şekilde, bir hastada bir hastalığın mevcut olmadığı kanımlandığında, tarama testi aynı zamanda hastalığın mevcut olmadığını göstermekte olup, test sonucu gerçek negatiftir (TN). Hem gerçek pozitif hem de gerçek negatif, tarama testi ve kanılanan durum arasında tutarlı bir sonucu göstermektedir (ayrıca gerçeklik standardı olarak adlandırılmaktadır). Bununla birlikte hiçbir medikal test kusursuz değildir. Tarama testinin, aslında hiçbir hastalığı olmayan bir hastada, hastalığın mevcut olduğunu göstermesi durumunda, test sonucu yanlış pozitifdir (FP). Benzer şekilde, tarama testi sonucunun, kesinlikle hastalığı olan bir hasta için hastalığın mevcut olmadığını göstermesi durumunda ise test sonucu yanlış negatiftir (FN). Hem yanlış pozitif hem de yanlış negatif, test sonuçlarının gerçek durumun tersi olduğunu göstermektedir.

35

Duyarluluk, özgüllük ve doğruluk, TP, TN, FN ve FP bakımından açıklanmaktadır

$$\text{Duyarluluk} = \text{TP}/(\text{TP} + \text{FN}) = (\text{Gerçek pozitif değerlendirme sayıları})/(\text{Tüm pozitif değerlendirmelerin sayıları})$$

5

$$\text{Özgüllük} = \text{TN}/(\text{TN} + \text{FP}) = (\text{Gerçek negatif değerlendirme sayıları})/(\text{Tüm negatif değerlendirmelerin sayıları})$$

10

$$\text{Doğruluk} = (\text{TN} + \text{TP})/(\text{TN} + \text{TP} + \text{FN} + \text{FP}) = (\text{Doğru değerlendirmelerin sayıları})/(\text{Tüm değerlendirmelerin sayıları})$$

15

Tercih edilen bir yapılandırılmada, mevcut buluşa ait tarama yöntemi, bir insan sujede CRC ve/veya polipleri teşhis etmekte, erkenden tespit etmekte, yinelenmeyi belilemekte, gelişim riskini belirlemekte veya buna yönelik tahmin gerçekleştirmektedir; veya kolonoskopinin söz konusu insan sujede gerçekleştirilip gerçekleştirilmeyeceğini belirlemektedir; veya prognozu belirlemektedir, burada söz konusu suje, CRC ve/veya polip teşhisi konulan bir hastadır veya söz konusu yöntem, en az %60, en az %65, en az %70 en az %75, en az %80, en az %85, en az %90, en az %95 veya tercihen %100 değerinde bir duyarlılık ve/veya özgüllük ile birlikte istatistik olarak anlamlı bir şekilde CRC ve/veya poliplere sahip bir hastada bir terapiyi yönlendirmektedir.

20

25

Yukarıdaki denklemler ile gösterildiği üzere, burada kullanılan şekilde "duyarlılık" terimi, bir tarama testi ile doğru şekilde tanımlanan gerçek pozitiflerin oranına işaret etmektedir. Bu, bir hastalığın tespit edilmesinde testin ne kadar iyi olduğunu göstermektedir. Duyarluluk ("duy."), 0 (%0) < duy. < 1 (%100) aralığında olabilmektedir ve ideal olarak, yanlış negatifliklerin sayıları eşitlenmektedir veya eşitlenmeye yakındır ve duyarlılık bire eşitlenmektedir (%100) veya bire eşitlenmeye yakındır (%100). Tercihen, %70 ila %90, %75 ila %95, %80 ila %95, %85 ila %100 veya %90 ila %100 değerinde bir duyarlılığa sahiptir. Daha tercihen, buluşa ait yöntem, en az %85, örneğin yaklaşık % 86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 veya %100 duyarlılık değerlerine sahiptir.

30

Burada kullanılan şekilde "özgüllük" terimi, bir tarama testi ile doğru şekilde tanımlanan gerçek negatiflerin oranına işaret etmektedir. Bu, normal (negatif) durumun tanımlanmasında testin ne kadar iyi olduğunu göstermektedir. Özgüllük ("özg."), 0 (%0)

<özg.< 1 (%100) aralığında olabilmektedir ve ideal olarak, yanlış pozitiflerin sayısını eşitlenmektedir veya sınırlı eşitlenmeye yakındır ve özgüllük bire eşitlenmektedir (%100) veya bire eşitlenmeye yakındır (%100). Tercihen, %70 ila %90, %75 ila %95, %80 ila %95, %85 ila %100 veya %90 ila %100 değerinde bir özgüllüğe sahiptir. Daha tercihen, buluşa ait yöntem, en az %85, örneğin yaklaşık %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 veya %100 özgüllük değerlerine sahiptir.

Burada kullanılan üzere "doğruluk" terimi, bir popülasyonda, gerçek pozitif veya gerçek negatif olmak üzere gerçek sonuçların oranıdır. Bir durum üzerinde bir tarama testinin doğruluk derecesini, yani belirli bir durumun belirlenmesinin ve dışlanması ne kadar doğru olduğunu ölçmektedir. Doğruluk ("doğr."), 0 (%0) <doğr.< 1 (%100) aralığında olabilmektedir ve ideal olarak, yanlış pozitiflerin sayısını eşitlenmektedir veya sınırlı eşitlenmeye yakındır ve doğruluk bire eşitlenmektedir (%100) veya bire eşitlenmeye yakındır (%100). Tercihen, buluşa ait yöntemin doğruluğu, en az %60, en az %65, en az %70, en az %75, en az %80, en az %85, en az %90, en az %95 veya tercihen %100'dür. . Tercih edilen bir yapılandırmada, %70 ila %90, %75 ila %95, %80 ila %95, %85 ila %100 veya %90 ila %100 değerinde bir doğruluğa sahiptir. Tercihen, buluşa ait yöntem, en az %85, örneğin yaklaşık %86, %87, %88, %89, %90, %91, %92, %93, %94, %95, %96, %97, %98, %99 veya %100 doğruluk değerlerine sahiptir..

"ROC eğrisi", hem duyarlılık hem de özgüllük arasındaki ilişkinin bir grafik sunumudur ve tarama testine yönelik en iyi eşiğin (optimal kesme noktası) belirlenmesi vasıtasıyla optimal modelin kararlaştırılmasına yardımcı olmaktadır. ROC eğrisi altındaki alan (AUC), bir tarama testinin doğruluğunun ölçülmesi için bir yol sunmaktadır. Tercihen, buluşa ait yöntemin AUC aralığı değerleri, 0.6 ila 1, daha tercihen 0.7 ila 1'dir, daha tercih edilen değerler ise 0.8 ila 1, tercihen 0.9 ila 1 aralığındadır. Belirli bir yapılandırmada, AUC, 0.6 ila 0.8, örneğin 0.6 ila 0.75 veya 0.65 ila 0.75'tir.

Dahası duyarlılık, özgüllük ve doğruluk oranları dolayısıyla ilgili güven aralıkları teknikte iyi bilinen, oranlara yönelik standart yöntemler kullanılarak hesaplanabilmektedir. İki tip %95 güven aralığı, genel olarak oranların etrafında tanımlanmaktadır. Kesin güven aralığı, kesin bir tahmine ulaşmak için iki terimli dağılım kullanılarak tanımlanmaktadır. Asimptotik güven aralığı, numune dağılımının normal bir yaklaşımla varsayılmasıyla hesaplanmaktadır. Teknikte uzman bir kişi, uygun güven aralığına karar verebilecektir. Bir veya bir başka tipteki güven aralığı seçimi, tipik olarak, numune oranının, normal bir dağılıma yönelik

iyi bir yaklaşım olup olmadığına bağlı olacaktır

Buluşa ait belirli bir yapılandırılmada, söz konusu bakteriyel sekansların nicetlenmesinden önce, DNA, dışkı numunesinden özütlenmektedir. Dışkı numunelerinden DNA özütlemeye yönelik çeşitli yöntemler bilinmektedir, bu yöntemlerin tümü, kimyasal veya mekanik parçalama, deterjan kullanılmaya lizis veya bu yaklaşımların bir kombinasyonuna dayanmaktadır (Kennedy A. ve meslektaşları, PLoS One, 2014;9(2):e88982). Dışkı numunelerindeki bakteriyel DNA'nın özütlenmesine yönelik yöntemler, örneğin M Corist ve meslektaşları, Journal of Microbiological Methods, 2002; 50(2):131-139, Whitney D ve meslektaşları, Journal of Molecular Diagnostics, American Society for Investigative Pathology, 2004;6(4):386-395 ve WO2003/068788 numaralı dokümandan bilinmektedir.

Tercih edilen yöntemler, yüksek hızla boncuk dövmeli özütleme gibi mekanik parçalama, kimyasal lizis ve tercihen piyasada mevcut DNA özütleme kitleri "MobioPowerSoil® DNA extraction procedure" (Mo-Bio Laboratories Inc.), toprak prosedürüne yönelik FastDNA® SPIN Kiti (MP biomedical) ve NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG)'de bulunanlar gibi bir silika membran kolonunun kullanıldığı bir nihai saflaştırma adımları bir kombinasyonunu kullanmaktadır. Bilirubinler, safra tuzları ve kompleks karbonhidratlar gibi, dışkı numunelerinden DNA özütlerinde PCR inhibitörlerinin mevcudiyeti, dışkıdan DNA özütlerindeki DNA biyoişaretöilerinin belirlenmesine yönelik karşılaşılan zorluklardan biridir (Fleckna ve meslektaşları, Mol Cell Probes, 2007;21(4):282-7). Tercih edilen DNA özütleme yöntemleri, örneğin %5'ten az, tercihen %2'den az, daha tercihen %1'den az, daha da tercihen %0.5'ten az, örneğin %0.25, %0.1, %0.05 veya %0.01'den az olmak üzere, dışkı özütlerine düşük miktarda PCR inhibitörleri sağlayan yöntemlerdir.

25

Belirli bir yapılandırılmada, buluşa ait yöntem aşağıdakileri içermektedir:

(a) SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10'dan oluşan gruptan seçilen en az bir 16S rDNA bakteriyel sekanslarının, söz konusu insan dışkı numunesinden, niceliksel PCR ile belirlenmesi, burada SEKANS KİMLİK NUMARASI:1 seviyeleri, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2-13'e göre en az %90 özdeşliğe sahip primerlerin kullanılmasıyla belirlenmektedir, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4 seviyeleri, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5-6'ya göre en az %90 özdeşliğe sahip primerlerin kullanılmasıyla belirlenmektedir, SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 seviyeleri, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8-9'a göre en az

35

%90 özdeşliğe sahip primerlerin kullanılmasıyla belirlenmektedir ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10 seviyeleri ise SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11-12'ye göre en az %90 özdeşliğe sahip primerlerin kullanılmasıyla belirlenmektedir; ve/veya

(b) adında a)'da bahsi geçtiği üzere, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10'dan oluşan gruptan seçilen en az iki 16S rDNA bakteriyel sekansları seviyelerinin, söz konusu insan dışkı numunesinden, niceliksel PCR kullanılarak belirlenmesi ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1; SEKANS KİMLİK NUMARASI:7/SEKANS KİMLİK NUMARASI:10 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10/SEQ ID 1'den oluşan gruptan seçilen oranlardan en az birinin belirlenmesi.

Tercih edilen bir yapılandırılarda, buluşa ait bir insan dışkı numunesinden, CRC ve/veya adenomatöz poliplere yönelik tarama yöntemi aşağıdakileri içermektedir:

(a) SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10'dan oluşan gruptan seçilen en az bir 16S rDNA bakteriyel sekansları konsantrasyonunun, söz konusu insan dışkı numunesinden, niceliksel PCR ile belirlenmesi, burada SEKANS KİMLİK NUMARASI:1 konsantrasyonu, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2-13'e göre en az %90 özdeşliğe sahip primerlerin kullanılmasıyla belirlenmektedir, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4 konsantrasyonu SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5-6'ya göre en az %90 özdeşliğe sahip primerlerin kullanılmasıyla belirlenmektedir, SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 konsantrasyonu, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8-9'a göre en az %90 özdeşliğe sahip primerlerin kullanılmasıyla belirlenmektedir ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10 konsantrasyonu ise SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11-12'ye göre en az %90 özdeşliğe sahip primerlerin kullanılmasıyla belirlenmektedir,

(b)opsiyonel olarak, adında a)'da bahsi geçtiği üzere, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10'dan oluşan gruptan seçilen en az iki 16S rDNA bakteriyel sekansları seviyelerinin, söz konusu insan dışkı numunesinden, niceliksel PCR kullanılarak belirlenmesi ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7/SEKANS KİMLİK

NUMARASI: 1; SEKANS KİMLİK NUMARASI:7/SEKANS KİMLİK NUMARASI:10 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10/SEKANS KİMLİK NUMARASI 1'den oluşan gruptan seçilen konsantrasyon oranlardan en az birinin belirlenmesi ve

5 (c) adındaki (a)'ya ait sekanslardan en az birinin konsantrasyonundan ve/veya adındaki (b)'de elde edilen en az bir oranındaki değerinden, CRC ve/veya adenomatöz poliplerin teşhis edilmesi, riskinin belirlenmesi veya yinelenmesinin belirlenmesi.

Buluşa ait yöntemin bir başka yapılandırılmasında, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2-13'ye göre en az %90 özdeşliğe sahip söz konusu primerler, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2-13'ye göre  
10 en az %95 özdeşliğe sahip primerlerdir, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5-6'ya göre en az %90 özdeşliğe sahip söz konusu primerler, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5-6'ya göre en az %95 özdeşliğe sahip primerlerdir, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8-9'ya göre en az %90 özdeşliğe sahip söz konusu primerler, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8-9'a göre en az %95 özdeşliğe sahip primerlerdir ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11-12'ya göre en az %90 özdeşliğe sahip  
15 primerler ise SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11-12'ye göre en az %95 özdeşliğe sahip primerlerdir.

Özellikle tercih edilen bir yapılandırılmada, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2-13'ye göre en az %95 özdeşliğe sahip söz konusu primerler, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2-13 ile tanımlanan  
20 primerlerdir, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5-6'ya göre en az %95 özdeşliğe sahip söz konusu primerler, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5-6 ile tanımlanan primerlerdir, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8-9'a göre en az %95 özdeşliğe sahip söz konusu primerler, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8-9 ile tanımlanan primerlerdir ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11-12'ye göre en az %95 özdeşliğe sahip söz konusu primerler ise SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11-12 ile  
25 tanımlanan primerlerdir.

Mevcut başvuruda, problem sekansındaki kalıntılardaki %95'inin, belirlenen sekansındaki kalıntılarda özdeş olması durumunda, bir problem sekansındaki belirlenen bir sekansa göre %95 özdeşliğe sahiptir.

30 Tercih edilen bir yapılandırılmada, mevcut buluşa ait yöntem, kolorektal kanserin teşhisine yönelik bir yöntemdir ve kolorektal kanser; SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1'e ait Ct değerinin, 37.2'lik kesim Ct eşik değerinin üzerinde olması durumunda veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4'e ait Ct değerinin, 16.56'lik eşik Ct değerinin üzerinde olması durumunda veya  
35 SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7'ye ait Ct değerinin, 22.97'lik eşik Ct değerinin üzerinde olması

durumunda veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10'a ait Ct değerinin, 19.24'lük eşik Ct değerinin üzerinde olması durumunda veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 oranında ait değer, 1.16'lük eşik değerinin altında olması durumunda veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 oranında ait değer, 1.40'lük eşik değerinin altında olması durumunda veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1 oranında ait değer, 0.44'lük eşik değerinin üzerinde olması durumunda veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1 oranında ait değer, 0.62'lik eşik değerinin üzerinde olması durumunda veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10/SEQ ID: 1 oranında ait değer, 0.52'lik eşik değerinin üzerinde olması durumunda veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10/SEQ ID: 7 oranında ait değer, 1.2'lik eşik değeri üzerinde olması durumunda, adlı (c)'de teşhis edilmektedir.

Tercih edilen bir başka yapılandırılarda, mevcut buluşa ait yöntem, kolorektal kanserin gelişimine yönelik riskin teşhisine yönelik bir yöntemdir, burada kolorektal kanserin gelişimine yönelik bir sisk; SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1'e ait Ct değerinin, 36.45'lik kesim Ct eşik değerinin üzerinde olması durumunda veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4'e ait Ct değerinin, 14.02'lik eşik Ct değerinin üzerinde olması durumunda veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7'ye ait Ct değerinin, 24.76'lük eşik Ct değerinin üzerinde olması durumunda veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10'a ait Ct değerinin, 21.42'lik eşik Ct değerinin üzerinde olması durumunda veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 oranında ait değer, 1.56'lük eşik değerinin altında olması durumunda veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 oranında ait değer, 1.78'lik eşik değerinin altında olması durumunda veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1 oranında ait değer, 0.38'lik eşik değerinin üzerinde olması durumunda veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1 oranında ait değer, 0.68'lik eşik değerinin üzerinde olması durumunda veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1 oranında ait değer, 0.59'lük eşik değerinin üzerinde olması durumunda veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 oranında ait değer, 1.16'lük eşik değeri üzerinde olması durumunda, adlı (c)'de teşhis edilmektedir.

Bir başka yapılandırılarda, mevcut buluşa ait yöntem, ayrıca, CRC'nin göstergesi olduğu bilinen bir veya daha fazla moleküler biyoişaretçinin tespit edilmesini ve/veya nicemlenmesini içermektedir. Tercihen bir çoklu işaretçi paneli kullanılmaktadır. Söz konusu çoklu işaretçi paneli, şu genlerden biri veya daha fazlasında mevcut olan nokta mutasyonları belirlenmesini içerebilmektedir: APC, K-ras, BRAF, p53, NRAS, PIK3CA, CDK8, CMYC, CCNE1,

CTNNB1, NEU (HER2), MYB, FBXW7, PTEN, SMAD4, SMAD2, SMAD3, TGF $\beta$ IIR, TCF7L2, ACVR2 ve BAX (Fearon, E. R., Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis., 2011;6:479-507). Belirlenebilen, bilinen diğer CRC işaretçileri, CpG adas $\square$ metilsayonu, gaita ağırlığıbirimi başına insan DNA'sının miktarıve gaita ağırlığıbirimi başına toplam DNA'nın miktarıdır

5

Bir başka yapılandırılmada, mevcut buluşa ait yöntem ayrıca bilgisayarda okunabilir bir ortamda, belirleme sonuçlarının saklanmasıiçermektedir. Burada kullanılanğıüzere, "bilgisayarda okunabilir bir ortam", buluşa ait belirleme sonuçlarını kapsayabilen, saklayabilen, iletebilen, yayabilen veya aktarabilen herhangi bir aparat olabilmektedir. Ortam, bir elektronik, manyetik, optik, elektromanyetik, kızıltesi veya yarıiletken sistem (veya aparat veya cihaz) veya bir yayma ortamıolabilmektedir.

10

Bir ikinci yönde, buluş, bir insan sujede CRC ve/veya poliplerin teşhis edilmesi, erkenden tespit edilmesi, yinelenmesinin belirlenmesi, gelişim riskinin belirlenmesi veya tahminde bulunulmasıveya söz konusu insan sujede bir kolonoskopinin gerçekleştirilmesinin gerekip gerekmediğinin belirlenmesi; veya veya prognozun belirlenmesi, burada söz konusu insan sujenin CRC ve/veya polip teşhisi koyulan bir hsata olmasıveya CRC ve/veya polipleri olan bir hastada bir terapinin yönlendirilmesi için bir biyoişaretçi olarak, SEKANS KİMLİK NUMARASI:1, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4, SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10'dan oluşan listeden seçilen en az bir 16S rDNA bakteriyel sekansıveya bunun tamamlayıcıRNA sekansını kullanarak ilgilidir, burada söz konusu bakteriyel sekanslar, söz konusu insan sujenin bir dışkınumunesinden nicemlendirilmektedir.

15

20

Tercihen, söz konusu nükleik asit sekansıSEKANS KİMLİK NUMARASI:1, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4, SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10'dan oluşan listeden seçilen bir 16S rDNA sekansıdır

25

Burada kullanılanğıüzere "biyoişaretçi" terimi, tipik olarak, kolaylıkla ölçülebilen bir vücut numunesinde bulunan maddeler olan, hastalığı işaretçilerine atıfta bulunmaktadı. Ölçülen miktar, CRC ve/veya poliplerin mevcudiyeti veya yokluğu veya gelecekte CRC ve/veya poliplerin olasılığıgibi, altta yatan hastalığıpatofizyolojisi ile ilişkili olabilmektedir. Durumlarına yönelik olarak tedavi alan hastalarda, ölçülen miktar, ayrıca terapiye yanıtı ile de ilişkili olacaktır

30

35

Bir üçüncü yönde, buluş, aşağıdakileri içeren bir kit ile ilgilidir:

a. şunlardan oluşan gruptan seçilen bir tepken:

5 i) SEKANS KİMLİK NUMARASI:1, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4, SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10'dan oluşan listeden seçilen en az bir 16S rDNA sekansı veya bunun tamamlayıcı rRNA sekansı ile spesifik olarak melezlenebilen nükleik asit probları veya

10 ii) SEKANS KİMLİK NUMARASI:1, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4, SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10'dan oluşan listeden seçilen en az bir 16S rDNA sekansı spesifik olarak çoğaltılabilen bir çift nükleik asit primeri; ve

b. mevcut buluşa at bir yöntemle göre, bir insan dışkı numunesinden söz konusu sekansların bir veya daha fazlasına ait seviyelerin nicemlenmesine yönelik talimatlar.

15 Burada kullanılan üzere "prob" terimi, hedef nükleik asit sekanslarına, önceden belirlenen koşullar altında spesifik ve tercihe bağlı melezlenmeyi mümkün kılan spesifik nükleotit sekansları içeren ve tercihe bağlı olarak, tahlil performansını artırmak için veya tespit için bir kısım içeren, uzunluk bakımından 10 ve 285 baz çifti arasında olan, sentetik veya biyolojik olarak üretilmiş nükleik asit sekanslarına işaret etmektedir. Minimum on nükleotit, genel olarak, istatistik olarak özgüllüğün elde edilmesi ve stabil melezleme ürünlerinin oluşturulması için gereklidir ve maksimum 285 nükleotit, genel olarak, yanlılaşmış sekansların ve tercihe bağlı melezlemenin belirlenmesi için reaksiyon parametrelerinin kolaylıkla ayarlanabildiği, uzunluk bakımından bir üst sınırı temsil etmektedir. Problar opsiyonel olarak, belirli tahlil koşullar altında bunların uygun ve optimal işlevselliğine katkıda bulunan belirli bileşenleri içerebilmektedir. Örneğin problar, nükleaz bozunmalarına karşı dirençlerinin artırılması (örneğin uç kaplama vasıtasıyla), tespit ligandlarının taşınması (örneğin floresin) veya bunların, bir kat destek üzerinde yakalanmasını kolaylaştırması (örneğin poli-deoksiadenosin "kuyrukları" için modifiye edilebilmektedir).

30 Burada kullanılan üzere "primerler" terimi, bir nükleotit sekansını çoğaltmak için polimeraz zincir reaksiyonu ("PCR") gibi bir çoğaltma yönteminde kullanılabilen oligonükleotitlere işaret etmektedir. Primerler, örneğin bir spesifik 16S rDNA sekansı olmak üzere belirli bir hedef sekansa ait polinükleotit sekansına dayanarak tasarlanmaktadır

35 Primerlerin ve probların tasarımı ve onaylanması teknikte iyi bilinmektedir. Niceliksel gerçek

zamanlı PCR yöntemleri için, bakınız örneğin Rodriguez A ve meslektaşları (Methods Mol Biol., 2015, 1275:31-56).

5 Burada kullanılan üzere "spesifik" bir nükleotit sekansı, önceden belirlenen bir hedef sekansa melezleneceği/bunu çoğaltacağı ve büyük oranda, tahlil koşullarında hedef olmayan bir sekansa melezlenmeyeceği/bunu çoğaltmayacağı anlamına gelmektedir, genel olarak zorlayıcı koşullar kullanılmaktadır.

10 Burada kullanılan üzere "melezleme", önceden belirlenen koşullar altında, hangi nükleik asit bazları birbiriyle eşleşebildiği ile ilgili olan belirli kurallara tabi olarak, nükleik asidin iki kısmen veya tamamen tamamlayıcı olan zincirinin, spesifik ve stabil hidrojen bağları ile bir çift-zincirli nükleik asidi meydana getirmek için antiparalel şekilde bir araya gelmesine izin verildiği bir prosese işaret etmektedir.

15 "Büyük oranda melezleme", gözlemlenen melezleme miktarı; sonuçları gözlemleyen bir kişinin, pozitif ve negatif kontrollerdeki melezleme verilerine göre sonucu pozitif olarak değerlendireceği şekilde olacağı anlamına gelmektedir. "Arka plan gürültüsü" olarak değerlendirilen veriler, önemli melezleme değildir.

20 "Zorlayıcı melezleme koşulları" yaklaşık 0.9 molar NaCl değerindeki bir tuz çözeltisinde yaklaşık 35°C ila 65°C anlamına gelmektedir. Zorlayıcı olarak, melezleme çözeltisi içerisinde mevcut olan iyonik türlerin konsantrasyonu ve tipi, mevcut olan denatüre etme ajanlarının tipleri ve konsantrasyonları ve melezleme sıcaklığı gibi reaksiyon parametreleri ile de belirlenebilmektedir. Genel olarak, melezleme koşulları daha zorlayıcı hale geldikçe, stabil hibritler oluşturulacaksa daha uzun problemler tercih edilmektedir. Bir kural olarak, melezlemenin gerçekleşeceği koşulları zorlayıcı olarak kullanılmak üzere tercih edilen problemler belirli özelliklerini dikte edecektir.

30 Tercihen, söz konusu nükleik asit sekansı SEKANS KİMLİK NUMARASI:1, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4, SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10'dan oluşan listeden seçilen bir 16S rDNA sekansıdır.

35 Belirli bir yapılandırılmada, söz konusu kit, bir insan sujude CRC ve/veya poliplere yönelik teşhis, erken tespit, yineleme belirlemesi, gelişim riski belirlemesi veya tahmin; veya söz konusu insan sujude kolonoskopinin gerçekleştirilip gerçekleştirilmeyeceğinin belirlenmesi;

veya CRC ve/veya polip teşhisi koyulan bir hastada prognozun belirlenmesi; veya CRC ve/veya poliplere sahip bir hastada bir terapinin yönlendirilmesi için kullanılmaktadır. Tercih edilen bir yapılandırılmada, kit ayrılma, DNA özütleme araçları, melezleme ve/veya çoğaltmanın gerçekleştirilmesine yönelik araçlar, tespit araçları ve/veya biyolojik numunenin toplanması ve/veya tutulmasına yönelik bir veya daha fazla kap içerebilmektedir.

Belirli bir yapılandırılmada, mevcut buluş, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2-13, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5-6, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8-9 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11-12'den oluşan primer çifti grubundan seçilen en az bir çift PCR primeri içeren, bir insan dışındaki numunesinden kolorektal kanserin teşhis edilmesine yönelik bir kit ile ilgilidir.

Bir dördüncü yönde, mevcut buluş, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 9, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11, ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:12'den oluşan gruptan seçilen; veya bunun en az %90 özdeşliğine, tercihen bunun en az %95 özdeşliğine, daha tercihen %96, %97, %98, %99 veya %100 özdeşliğe sahip bir nükleik asit sekansı ile ilgilidir. Tercihen, söz konusu sekanslar, SEKANS KİMLİK NUMARASI:1, SEKANS KİMLİK NUMARASI:4, SEKANS KİMLİK NUMARASI:7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:10'dan oluşan listeden seçilen en az bir 16S rDNA sekansının nicemlenmesine yönelik olarak, bir çoğaltma tahlilinde (qPCR gibi) primerler olarak veya bir melezleme tahlilinde nükleik asit problemleri olarak kullanılmaktadır.

Belirli bir yapılandırılmada, söz konusu nükleik asit sekansı SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2-13, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5-6, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8-9 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11-12'den oluşan gruptan seçilen bir çift PCR primeridir. Belirli bir başka yapılandırılmada, söz konusu nükleik asit sekansı SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 9, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11, ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:12'den oluşan gruptan seçilen bir nükleik asit probudur.

Bir beşinci yönde, mevcut buluş, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 9, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11, ve SEKANS KİMLİK NUMARASI:12'den oluşan gruptan seçilen; veya bunun en az %90 özdeşliğine sahip bir nükleik asit sekansı, buluşa ait bir tarama yönteminde kullanılmak üzere ilgilidir burada

SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2 ve/veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1'in nicemlenmesinde kullanılmaktadır SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5 ve/veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4'ün nicemlenmesinde kullanılmaktadır SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8 ve/veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 9, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7'nin nicemlenmesinde kullanılmaktadır ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11 ve/veya SEKANS KİMLİK NUMARASI:12, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10'un nicemlenmesinde kullanılmaktadır

Örnekler'de açıklanan belirli yapılandırmaların örnek olarak gösterildiği ve buluşu sürdürülebilir ve anlaşılacaktır

Tarifnamede bahsi geçen tüm yayınlar ve patent başvurular, bu buluşun ilgili olduğu, teknikte uzman kişilerin beceri seviyesini göstermektedir.

"Bir" kelimesinin kullanımı, "bir" anlamına gelmektedir, ancak, ayrıca, "bir veya daha fazla", "en az bir" ve "bir veya birden fazla" ifadelerinin anlamıyla de örtüşmektedir.

Bu başvuru boyunca, "yaklaşık" terimi, değerin belirtilen değeri  $\pm$  %5, tercihen değerin belirtilen değeri  $\pm$  %2 anlamına gelmektedir, en çok tercih edilecek şekilde "yaklaşık" terimi, tam anlamına belirtilen değer ( $\pm$  %0) anlamına gelmektedir.

## ÖRNEKLER

### Örnek 1.-Malzemeler ve Yöntemler

25

#### 1. Biyolojik numuneler

Dışkı numuneleri, yakın zamanda kolorektal kanseri (CRC) (evre 0-I) teşhisi koyulan 27 hasta, Lynch sendromu taşıyıcısı (L) olan 24 hasta ve 19 sağlıklı bireyden (C) elde edilmiştir. Tüm hastalar, numunelerin alınmasından en az 15 gün önce kolonoskopiye girmiştir.

Tamamıyla ilgili bilgilendirilmiş onam/mzalamış Dışlama kriterleri, çalışmadan önce 1 ay içerisinde antibiyotik tedavisini ve < 18 yaş altını kapsamaktadır

#### 2. 16S rDNA bakteriyel sekanslar:

B3, B10, B41, B46, B48 ve B50 sekanslar önceden, kültürsüz bakteri izolatlarından izole edilmiş olan denatüran gradyan jeli elektroforezi (DGGE) jel bantlarına karşı gelmektedir.

- 5 - 16S rDNA bakteriyel sekansı SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1 (B3), GQ411111.1 altında EMBL-EBI Avrupa Nükleotit Arşivi (ENA) veritabanında yayınlanmıştır
- 16S rDNA bakteriyel sekansı SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 (B10), GQ411118.1 altında EMBL-EBI Avrupa Nükleotit Arşivi (ENA) veritabanında yayınlanmıştır
- 16S rDNA bakteriyel sekansı SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 (B46), GQ411150.1 altında, EMBL-EBI Avrupa Nükleotit Arşivi (ENA) veritabanında yayınlanmıştır
- 10 - 16S rDNA bakteriyel sekansı SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10 (B48), GQ411152.1 altında, EMBL-EBI Avrupa Nükleotit Arşivi (ENA) veritabanında yayınlanmıştır
- 16S rDNA bakteriyel sekansı B41, GQ411145.1 altında, EMBL-EBI Avrupa Nükleotit Arşivi (ENA) veritabanında yayınlanmıştır ve
- 15 - 16S rDNA bakteriyel sekansı B50, GQ411154.1 altında, EMBL-EBI Avrupa Nükleotit Arşivi (ENA) veritabanında yayınlanmıştır

### 3. Numune toplama, koruma ve saklama

- 20 24 saatlik dışkı numuneleri, bir ay boyunca -20°C'de dışkı kabonda ve depoda toplanmıştır ve ISO 9001 koşullar altında -80°C dondurucuya aktarılmıştır

### 4. Numunenin işlenmesi ve DNA özütlemesi

- 25 Dışkı 6s-DNA özütlemesi için, NucleoSpin® Soil. (Macherey-Nagel) kullanılmıştır

Biyo güvenlik koşullar altında, 200mg-500mg dışkı numunesi, Nükleospin boncuk-tüp içerisine yerleştirilmiştir. 700µl SL1 ve 150µl Art. 1000, cam-tüpe eklenmiştir.

- 30 5. Bunun ardından, imalatçının talimatları doğrultusunda DNA özütlenmiştir ve saflaştırılmıştır ve 50UI elüsyon tamponu veya 10mM Tris HCl Ph=7.4 ile ayrılmıştır

### 6. DNA konsantrasyonunun hesaplanması

- 35 Özütün DNA konsantrasyonu, Quant-IT dsDNA Geniş-Aralık Analiz Kiti kullanılarak, Qubit ®

2.0 Florometre Katalog n° Q32866 ile florimetrik analiz vasıtasıyla belirlenmiştir. Bu yöntem, RNA'ya göre dsDNA için fazlaca seçicidir ve 2ng ila 1,000ng aralığında doğru bir nicemleme sağlamaktadır. Bu aralıkta, floresan, DNA konsantrasyonu ile lineer olarak ilişkilidir. DNA ölçümleri 5ul özüt üzerinde gerçekleştirilmiştir.

5

#### 7. Dışkı numunelerinden özütlenen DNA'nın niceliksel gerçek-zamanlı PCR'si (qPCR)

Dışkı numunelerine ait DNA, niceliksel gerçek-zamanlı PCR ile analiz edilmiştir. Özellikle, numune başına dört bakteriyel popülasyonun niceliği tarafında değerlendirilmiştir: B3, B10, B48 ve B46.

10

Bakteriyel sekanslar, bir floresan dsDNA suşu ile bir niceliksel gerçek zamanlı PCR kullanılarak nicemlenmiştir. Bu çalışmada, Promega (Madison, ABD)'den ön-karışım BRYT® kullanılmıştır. Öbakteriler, Furet ve meslektaşlar tarafından açılan prosedür takip edilerek çoğaltılmıştır (.FEMS Microbiol Ecol., 2009;68(3):351-62).

15

Her bir numuneye yönelik bakteriyel bolluklar, toplam DNA konsantrasyonuna normalize edilen Ct olarak ifade edilmiştir.

Ct (döngü eşiği), floresan sinyalin eşiğin geçmesi için gereken q-PCR döngüsü sayıları olarak tanımlanmaktadır. Ct seviyeleri, numune içindeki hedef nükleik asit konsantrasyonunun logaritması ile ters orantılıdır (yani Ct seviyesi azaldıkça, numunedeki hedef nükleik asit miktarı artmaktadır). Gerçek zamanlı analizler, 40 çoğaltma döngüsünden geçmiştir.

20

#### 8. İstatistik analiz yöntemleri

Verilerin istatistiksel olarak normal dağılımı, Kolmogorov - Smirnov Testi ile analiz edilmiştir. Verilerin istatistiksel olarak normal bir dağılımı olup olmadığına göre, aşağıdaki gruplar için kılbaslanmasında yönelik uygun bir istatistik test kullanılmıştır.

Analiz edilen gruplar şunlardır: CRC'ye karşı sağlığı, CRC'ye karşı Lynch, buna karşı sağlığı, CRC+Lynch'e karşı sağlığı ve CRC'ye karşı Lynch-yüksek risk, buna karşı Lynch düşük risk, buna karşı sağlığı.

30

Bu gruplar için, analiz edilen değişkenler şunlardır:

- Ct'de ifade edilen dört bakteriyel sekans nicemlemesi;
- Dört bakteriyel sekans nicemlemesinin oranı;
- Ağrı ve

35

- DNA konsantrasyonu

Bir ikili regresyon ve ROC analizi kullanılarak, sağlıklı ve CRC durumu ve risk (teçhizat içerisinde ve iki risk koşuluna ayrılmış) arasındaki bakteriyel sekans nicemlemesinin korelasyonu, ve testin duyarlılığı ve özgüllüğü belirlenmiştir.

DNA ve ağrılı bakterilerden gruplar arasında bir fark gözlemlenmemiştir. Öbakteri (Eub) miktarı, Lynch ve CRC+Lynch ve sağlıklı donörler (C) arasında farklı olduğu bulunmuştur ancak bu normal olarak değerlendirilmiştir, zira hastalıklı durumu, daha az sayıdaki DNA kopyasına sahip bakterileri içeren filogenetik çekirdeğin bir değişimini göstermektedir. Bu, toplam bakterinin azaldığını göstermemektedir (bakınız örneğin, Sobhani ve meslektaşları, PLoS One, 2011,27;6(1):e16393). Bu sebeple, Eub nicemlemesi, normalizasyon amaçları için iç referans olarak kullanılmamıştır.

## 15 **Örnek 2. Primer Tasarım ve onaylama**

Biyopsideki bakteriyel işaretçiler B3, B10, B46, B48, B41 ve B50'nin nicemlenmesine yönelik primer, biyoenformatik araçlar kullanılarak filogenetik gruplardan önceden elde edilen sekanslar ile kıyaslama analizinden tasarlanmıştır. European Bioinformatics Institute (www.ebi.ac.uk), Netprimer (Premier Biosoft) ve PrimerExpress (Life Technologies-Thermo Fischer)'den ClustalX.

Seçilen tespit sistemi SybrGreen®'di. Yakındaki gruplara göre farklı olan 3'ten az pozisyona sahip primer kümesi dahil edilmemiştir. Beklenenlerden farklı olan ayrışma eğrilerindeki Tm değerlerine sahip primer kümesi de dahil edilmemiştir. Primer onaylaması, biyopsi numunesinde ve dışkı numunesinde gerçekleştirilmiştir. Ayrışma eğrisi, primer performansını analiz edilmesi için belirlenmiştir.

Şekiller 8a ila 13b'de, sırasıyla B3, B10, B46, B48, B41 ve B50'nin çoğaltılması için tasarlanan primerlerin onaylanması yönelik çoğaltma çizimleri ve ayrışma eğrileri gösterilmektedir. Yeterli bir ayrışma eğrisini (her bir primer kümesi için tek tepe noktası) gösteren primerler, dışkı numunelerinde 16S rDNA'nın bakteriyel olarak nicemlenmesi için seçilmiştir. Açıkçası B3, B10, B46 ve B48'i çoğaltan primerler seçilmiştir, bunlar aşağıdaki Tablo 9'da gösterilmektedir. Özgüllük eksikliğinden dolayı (erime eğrilerinde her bir primer kümesi için çoklu tepeler) B51 ve B40 dahil edilmemiştir.

Tablo 9. Dışkı numunelerinde 16S rDNA bakteriyal sekanslar B3, B10, B46 ve B48'in qPCR amplifikasyonuna yönelik seçilmiş primer çiftleri.

<b>B3 İleri (SEKANS KİMLİK NO: 2)</b>	GGAGGCCTTCGGGTCGTAA
<b>B3 Ters (SEKANS KİMLİK NO: 13)</b>	AGGTTCCGGGGGCTTCGG
<b>B10 İleri (SEKANS KİMLİK NO: 5)</b>	CAACAAGGTAAGTGACGGC
<b>B10 Ters (SEKANS KİMLİK NO: 6)</b>	CGCCTACCTGTGCACTACTC
<b>B46 İleri (SEKANS KİMLİK NO: 8)</b>	TCCACGTAAGTCACAAGCG
<b>B46 Ters (SEKANS KİMLİK NO: 9)</b>	CGCCTACCTGTGCACTACTC
<b>B48 İleri (SEKANS KİMLİK NO: 11)</b>	GTACGGGGAGCAGCAGTG
<b>B48 Ters (SEKANS KİMLİK NO: 12)</b>	GACACTCTAGATGCACAGTTCC

### **Örnek 3: Sağlıklı sujelere karşı kolorektal kanser hastalarında 16S rDNA biyoişaretçilerinin analizi**

5

7 kontrol ve 9 kolorektal kanser hastasına ait dışkıların toplamda 16 numunesi analiz edilmiştir. Analiz edilen dışkı numunelerinde, Örnek 1'de bahsi geçen bakteri işaretçilerinden her birinin nicemlemesi, Ct değeri olarak ifade edilmektedir. Ct (döngü eşiği), floresan sinyalin eşiğin geçmesi için gereken q-PCR döngüsü sayı olarak tanımlanmaktadır. Ct seviyeleri, numune içindeki hedef nükleik asit konsantrasyonunun logaritması ile ters orantılıdır (yani Ct seviyesi azaldıkça, numunedeki hedef nükleik asit miktar artmaktadır). Gerçek zamanlı analizler, 40 çoğaltma döngüsünden geçmiştir. Elde edilen sonuçlar, aşağıda Tablo 1 ve 2'de gösterilmektedir. Tablo 1, Ct mutlak değerlerini temsil etmektedir ve Tablo 2 ise Ct oranlarını temsil etmektedir. İki numune t-testi uygulanmıştır.

15

Tablo 1. Ct tuz değerleri

Kimlik	Grup	Durum	B48	B46	B10	B3
F10	CRC	1	18.59	22.78	16.33	33.64
F11	CRC	1	20.33	26.45	20.37	41.57
F3	CRC	1	23.52	26.2	19.8	38.45
F4	CRC	1	16.41	20.87	14.88	
F5	CRC	1	19.04	24	17.61	35.68
F6	CRC	1	23.22	27.67	21.82	
F16	CRC	1		20.75	14.35	
F7	CRC	1	23.19	28.2	22.34	
F8	CRC	1	18.82	22.04	15.61	
F12	C	0	17.55	20.9	14.95	
F13	C	0	19.36	24.78	19.22	
F14	C	0	19.46	21.44	15.07	37.34

F15	C	0	17.55	19.85	12.84	36.98
F9	C	0	17.61	21.8	15.41	35.66
F1	C	0	18.09	21.97	14.79	38.3
F2	C	0	17.07	20.57	12.76	
Ortalama	CRC		20.39	24.329	18.12	37.34
	C		18.099	21.616	15.01	37.07
Standart Sapma	CRC		2.65	2.89	3.04	3.44
	C		0.94	1.58	2.15	1.09
P-değeri	CRC'ye karşı		0.025	0.021	0.019	0.444
		C				
Orta nokta (kesim değerleri)			19.244	22.972	16.56	37.2
%Duyarlılık			66.67	83.33	83.33	50
%Özgüllük			55.56	60	60	50
*Doğruluk			60	68.75	68.75	50
*Doğruluk şu şekilde belirlenmektedir (TN + TP)/(TN+TP+FN+FP)						

Tablo 2. Ct oranları

Kimlik	Grup	Durum	B48/B 10	B10/B3	B46/B10	B46/B48	B46/B3	B48/B3
F10	CRC	1	1.14	0.49	1.39	1.23	0.68	0.55
F11	CRC	1	1	0.49	1.3	1.3	0.64	0.49
F3	CRC	1	1.19	0.51	1.32	1.11	0.68	0.61
F4	CRC	1	1.1		1.4	1.27		
F5	CRC	1	1.08	0.49	1.36	1.26	0.67	0.53
F6	CRC	1	1.06		1.27	1.19		
F16	CRC	1			1.45			
F7	CRC	1	1.04		1.26	1.22		
F8	CRC	1	1.21		1.41	1.17		
F12	C	0	1.17		1.4	1.19		
F13	C	0	1.01		1.29	1.28		
F14	C	0	1.29	0.4	1.42	1.1	0.57	0.52
F15	C	0	1.37	0.35	1.55	1.13	0.54	0.47
F9	C	0	1.14	0.43	1.41	1.24	0.61	0.49
F1	C	0	1.22	0.39	1.49	1.21	0.57	0.47
F2	C	0	1.34		1.61	1.21		
Ortalama	CRC		1.1	0.5	1.35	1.22	0.67	0.55
	C		1.22	0.39	1.45	1.19	0.57	0.49
Standart Sapma	CRC		0.07	0.01	0.07	0.06	0.02	0.05
	C		0.13	0.04	0.11	0.06	0.03	0.02
P-değeri	CRC'ye karşı		0.02	0.001	0.018	0.224	0.001	0.045
		C						
Orta nokta (kesim değerleri)			1.16123	0.4441	1.40243	1.20669	0.62	0.52
%Duyarlılık			75	100	77.78	55.56	100.00	75.00

%Özgüllük	71.43	100	71.43	42.86	100.00	75.00
*Doğruluk	73.33	100	75	50	100.00	75.00
*Doğruluk şu şekilde belirlenmektedir (TN + TP)/(TN+TP+FN+FP)						

Kolorektal kanserin teşhisine ait duyarlılık ve özgüllük, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 oranı için %75 ve 71; SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 oranı için sırasıyla %77 ve %71; SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1 oranı için sırasıyla %100 ve %100; SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7/ SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1 oranı için sırasıyla %100 ve %100; ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10/ SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1 oranı için sırasıyla %75 ve %75'tir.

10 Şekiller 1, 2 ve 3, Ct değerlerinin oranlarına ait grafiksel temsillerdir (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1).

15 Şekiller 4 ve 5, Ct mutlaklarına grafiksel temsilleridir (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7).

**Örnek 4. Lynch sendromu hastalarında 16S rDNA biyoişaretçileri analizi: CRC'ye karşı yüksek risk (poliplere sahip), buna karşı düşük risk (poliplere sahip değil)**

20 Bu analizin amacı klinik göstergelerden önce kolorektal kanserin tespit edilmesine yönelik biyoişaretçi tahmini değerinin belirlenmesidir.

25 Lynch sendromuna sahip toplamda 8 birey (kolorektal kanser gelişimi bakımından genetik, artan risk) analiz edilmiştir. Tüm bireyler, dışkı humunesinin toplanmasından önce, bir yıl maksimum zaman aralığında kolonoskopiye girmiştir. Endoskopik incelemeye göre, bunlardan 4'ü malign polipe (Yüksek Risk olarak adlandırılan) sahipti ve 4'ü ise polipe sahip değildi (Düşük Risk olarak adlandırılan).

30 Analiz edilen dışkı humunelerinde, Örnek 1'de bahdi geçen bakteri işaretçilerinden her birinin nicemlemesi, Örnek 2'de açıklanan primerler kullanılarak belirlenmiştir ve Ct değeri cinsinden nicemlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, aşağıda Tablolar 3 ve 4'te gösterilmektedir. Tablo 3, Ct mutlak

değerlerini temsil etmektedir ve Tablo 4 ise Ct oranları temsil etmektedir. İki numune t-testi uygulanmıştır

Tablo 3. Ct tuz değerleri

Kimlik	Grup	Durum	B48	B46	B10	B3
F10	CRC	1	18.59	22.78	16.33	33.64
F11	CRC	1	20.33	26.45	20.37	41.57
F3	CRC	1	23.52	26.20	19.80	38.45
F4	CRC	1	16.41	20.87	14.88	
F5	CRC	1	19.04	24.00	17.61	35.68
F6	CRC	1	23.22	27.67	21.82	
F16	CRC	1		20.75	14.35	
F7	CRC	1	23.19	28.20	22.34	
F8	CRC	1	18.82	22.04	15.61	
MIL1	Yüksek Risk	2	22.58	25.87	14.56	35.56
MIL2	Yüksek Risk	2	24.53	25.79	14.73	37.06
MIL5	Yüksek Risk	2	22.56	24.57	14.16	38.44
MIL4	Yüksek Risk	2	20.00	29.90	18.41	37.99
MIL6	Düşük Risk	3	20.15	24.90	15.20	37.58
MIL3	Düşük Risk	3	18.11	20.45	10.34	31.16
MIL7	Düşük Risk	3	22.81	24.70	13.35	41.40
MIL8	Düşük Risk	3	20.60	21.88	11.38	32.42
Ortalama	CRC		20.39	24.33	18.12	37.34
	Yüksek Risk		22.42	26.53	15.46	37.26
	Düşük Risk		20.42	22.98	12.57	35.64
Standart Sapma	CRC		2.65	2.89	3.04	3.44
	Yüksek Risk		1.86	2,32	1,98	1,27
	Düşük Risk		1,93	2,18	2,15	4,74
P-değeri	CRC'ye karşı Yüksek Risk		0,10	0,10	0,070	0,48
	CRC'ye karşı Düşük Risk		0,49	0,21	0,004	0,29
	Yüksek Riske karşı Düşük Risk		0,09	0,03	0,047	0,27
Orta nokta (kesim değerleri)Yüksek Risk vs Düşük Risk			21,42	24,76	14,02	36,45
%Duyarlılık Yüksek Riske karşı Düşük Risk			75,00	75,00	80,00	60,00
%Özgüllük Yüksek Riske karşı Düşük Risk			75,00	75,00	100,00	66,67
Doğruluk Yüksek Riske karşı Düşük Risk			75,00	75,00	87,50	62,50

Tablo 4. Ct oranları

Kimlik	Grup	Durum	B48/B10	B10/B3	B46/B 10	B46/B48	B46/B3	B48/B3
F10	CRC	1	1.14	0.49	1.39	1.23	0.68	0.55
F11	CRC	1	1.00	0.49	1.30	1.30	0.64	0.49
F3	CRC	1	1.19	0.51	1.32	1.11	0.68	0.61
F4	CRC	1	1.10		1.40	1.27		
F5	CRC	1	1.08	0.49	1.36	1.26	0.67	0.53
F6	CRC	1	1.06		1.27	1.19		
F16	CRC	1			1.45			
F7	CRC	1	1.04		1.26	1.22		
F8	CRC	1	1.21		1.41	1.17		
MIL1	Yüksek Risk	2	1.55	0.41	1.78	1.15	0.73	0.63
MIL2	Yüksek Risk	2	1.67	0.40	1.75	1.05	0.70	0.66
MIL5	Yüksek Risk	2	1.59	0.37	1.74	1.09	0.64	0.59
MIL4	Yüksek Risk	2	1.09	0.48	1.62	1.49	0.79	0.53
MIL6	Düşük Risk	3	1.33	0.40	1.64	1.24	0.66	0.54
MIL3	Düşük Risk	3	1.75	0.33	1.98	1.13	0.66	0.58
MIL7	Düşük Risk	3	1.71	0.32	1.85	1.08	0.60	0.55
MIL8	Düşük Risk	3	1.81	0.35	1.92	1.06	0.67	0.64
Ortalama	CRC		1.10	0.50	1.35	1.22	0.67	0.55
	Yüksek Risk		1.47	0.41	1.72	1.20	0.71	0.60
	Düşük Risk		1.65	0.35	1.85	1.13	0.65	0.58
Standart Sapma	CRC		0.07	0.01	0.07	0.06	0.02	0.05
	Yüksek Risk		0.26	0.05	0.07	0.20	0.06	0.06
	Düşük Risk		0.22	0.04	0.15	0.08	0.03	0.04
P-değeri	CRC'ye karşı Yüksek Risk		0.001491	0.009755	0.000001	0.38	0.11	0.10
	CRC'ye karşı Düşük Risk		0.000029	0.000159	0.000002	0.02	0.19	0.21
	Yüksek Riske karşı Düşük Risk		0.172991	0.044382	0.087799	0.28	0.06	0.25
Orta Nokta (kesim değerleri) Yüksek Riske karşı Düşük Risk			1.56	0.38	1.78	1.16	0.68	0.59
%Duyarlılık Yüksek Riske karşı Düşük Risk			66.67	75.00	80.00	50.00	75.00	75.00
%Özgüllük Yüksek Riske karşı Düşük Risk			60.00	75.00	100.00	50.00	75.00	75.00
Doğruluk Yüksek Riske karşı Düşük Risk			62.50	75.00	87.50	50.00	75.00	75.00

Bikrobiyolojik oran işaretçileri, kolorektal kanser gelişimi bakımından Yüksek Riske sahip birey grubunu (Lynch sendromuna ve poliplere sahip hastalar) ayırtı edebildi. Kolorektal kanserin yüksek riskli popülasyonunun tespitine ait duyarlılık ve özgüllük, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 için %80 ve %100; SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4/SEKANS KİMLİK NUMARASI:1 oranı için

sırasıyla %75 ve %75; SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4 oranı için sırasıyla %80 ve %100; SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1 oranı için sırasıyla %75 ve %75; ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10/SEKANS KİMLİK NUMARASI:1 oranı için sırasıyla %75 ve %75 idi.

5

Şekil 6, Ct değerlerinin oranına (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4/SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1) ait bir grafiksel temsildir ve Şekil 7 ise Ct mutlaklarına (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4) bir grafiksel temsildir.

## 10 **Örnek 5: Sağlıklı sujelere karşı kolorektal kanser hastalarında 16S rDNA biyoişaretçilerinin analizi**

Dışkı numuneleri, yakın zamanda kolorektal kanser (CRC) (evre 0-I) teşhisi koyulan 27 hasta, ve sağlıklı bireylerden (C) elde edilmiştir. Tüm hastalar, numunelerin alınmasından en az 15 gün önce kolonoskopiye girmiştir.

Tamamıyla ilgili bilgilendirilmiş onam almazlamlı Dışkıama kriterleri, çalışmadan önce 1 ay içerisinde antibiyotik tedavisini ve < 18 yaş altını kapsamaktadır

Tablo 5'te (aşağıdaki), dört bakteriyel sekansın nicemlemesinin, CRC hastalarında ait dışkılardaki Ct'te anlamlı bir artış sergilediği gösterilmektedir. Bu, bu grupta dört bakteriyel sekansın daha düşük bir yükünün olduğu anlamına gelmektedir.

Bu dört bakteriye ait anlamlı şekilde azalan yük, CRC hastaların tanınması için güçlü bir araç olabilmektedir. Bakteriyel işaretçilerin performansının ayrı ayrı analiz edilmesi durumunda, CRC hastalarında %94 özgüllük ve %48 duyarlılık ve 0.7 doğruluk ile tanımlayan B3; ve ikinci olarak, %84 özgüllük ve %61.5 duyarlılık ve 0.698 doğruluğa sahip B46 ile en iyi sonuçları elde edildiği tarafımızca anlaşılmaktadır

B48 ve B10 ayrıca, 0.69 değerinde bir doğruluk, ancak sırasıyla %100 özgüllük ve %36 duyarlılık ve %57 özgüllük ve %89.5 duyarlılık sergilemektedir.

30

Bakteriyel sekansların nicemlemesinin Ct'si arasındaki oran hesaplanmıştır. Hiçbir istatistiksel fark gözlemlenmese de, artırımlı bir numunede bu oranın uygulanmasının, CRC'nin taramasının tamamlanması için kullanılabilir bir algoritma olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu amaçla, ayrıca, dört sekansın kombinasyonu da, testin duyarlılığı ve özgüllüğünün artırılmasından göz önünde bulundurulmalıdır

35

**Tablo 5.** Sağlıklı bireyler ve CRC hastaların (Ct'de ifade edilen) 4 bakteriyel sekansların ölçümü, İki numune t-testi ve ROC analizi ile istatistiksel analiz.

Kimlik	Grup	Durum	B3	B48	B10	B46
4	CRC	1	29.86	20.84	14.18	21.34
5	CRC	1	24.3	15.88	10.34	17.53
6	CRC	1	27.33	20.66	15.77	23.13
7	CRC	1	24.88	19.06	13.64	20.69
8	CRC	1	20.61	17.78	12.92	19.7
11	CRC	1	27.28	25.69	17.05	24.35
12	CRC	1	29.04	22.58	16.49	23.17
13	CRC	1	21.98	17.52	10.97	17.34
14	CRC	1	27.07	19.94	13.52	19.9
15	CRC	1	28.57	26.60	19.77	27.53
24	CRC	1	26.77	22.64	17.84	23.83
25	CRC	1	21.64	17.01	11.54	18.7
27	CRC	1	26.52	20.97	15.49	22.63
31	CRC	1	29.91	18.92	16.44	23.8
35	CRC	1	23.37	18.81	12.24	18.77
36	CRC	1	22.87	17.28	12.74	19.76
38	CRC	1		16.36	24.43	30.7
F10	CRC	1	20.49	18.59	16.33	22.78
F16	CRC	1	18.24		14.35	20.75
F11	CRC	1	29.19	20.33	20.37	26.45
F3	CRC	1	32.48	23.52	19.80	26.20
F4	CRC	1	21.76	16.41	14.88	20.87
F5	CRC	1	20.56	19.04	17.61	24.00
F6	CRC	1	31.6	23.22	21.82	27.67
F7	CRC	1	27.14	23.19	22.34	28.20
F8	CRC	1	22.37	18.82	15.61	22.04
43	CRC	1	30.9	22.46	17.12	25.57
16	C	0	22.97	20.21	15.54	23.12
17	C	0	20.4	15.84	10.71	17.54
18	C	0	22.05	15.72	12.06	17.67
23	C	0	21.79	17.16	12.59	18.89
28	C	0	20	18.86	15.29	21.33
30	C	0	26.61	20.47	12.78	20.26
32	C	0	22.76	15.07	15.95	23.09
33	C	0	23.66	18.30	13.54	19.57
34	C	0	22.01	17.73	14.29	19.07
37	C	0	24.06	19.60	14.47	19.65

F1	C	0	24.71	18.09	14.79	21.97
F12	C	0	20.79	17.55	14.95	20.90
F13	C	0	25.1	19.36	19.22	24.78
F14	C	0	21.63	19.46	15.07	21.44
F2	C	0	20.42	17.07	12.76	20.57
F15	C	0	19.69	17.55	12.84	19.85
F9	C	0	23.29	17.61	15.41	21.80
39	C	0		18.03	11.95	18.97
<b>Ortalama</b>		CRC	25.64346154	20.15846154	16.13222222	22.86666667
		C	22.46705882	17.98222222	14.12111111	20.58166667
<b>Standart Sapma</b>		CRC	3.96679613	2.887129637	3.575465632	3.448853767
		C	1.948072011	1.514799756	1.957886432	1.927739456
<b>P-değeri (iki numune t-testi)</b>		CRC'ye karşı	0.038	0.019	0.049	0.021
<b>CRC'ye karşı</b>		<b>Orta-nokta</b>	26.69	20.90	15.75	22.0
		<b>AUC</b>	0.70	0.69	0.69	0.698
		<b>Duyarlılık</b>	%48	%36	%57	%61.5
		<b>Özgüllük</b>	%94	%100	%89.5	%84

Şekiller 14 ila 17, CRC ve sağlıklı (C) gruplarda, sırasıyla B3, B10, B46 ve B48'e yönelik mutlak Ct değerlerinin grafiksel temsilini sağlamaktadır.

- 5 Şekil 27, sağlıklıya karşı CRC analizinde B3, B10, B46 ve B48'e yönelik ROC eğrilerini sağlamaktadır.

**Örnek 6: 16S rDNA biyoişaretçi analiz CRC'ye karşı Lynch (klinik gösterge yok), buna karşı sağlıklı bireyler**

10

Bu analizin amacı klinik göstergelerden önce kolorektal aknsenin tespit edilmesine yönelik biyoişaretçi tahmini değerinin belirlenmesidir.

Dışkı numuneleri, yakın zamanda kolorektal kanseri (CRC) (evre 0-I) teşhisi koyulan 27 hasta, Lynch sendromu taşıyıcısı (L) olan 24 hasta ve 19 sağlıklı bireyden (C) elde edilmiştir.

15

Tüm hastalar, numunelerin alınmasından en az 15 gün önce kolonoskopiye girmiştir.

Tamamı ilgili bilgilendirilmiş onam almış ve Dışlama kriterleri, çalışmadan önce 1 ay içerisinde antibiyotik tedavisini ve < 18 yaş altını kapsamaktadır.

Sağlıklı bireyler, yakın zamanda CRC teşhisi koyulan hastalar ve Lynch sendromu

taşıyıcılarındaki dışkı numunelerindeki dört bakteriyel sekans nicemlenmiştir. Lynch sendromu taşıyıcıları kanser, spesifik olarak kolorektal kanser gelişimine genetik olarak yatkındır. Bu grup, kolorektal kanser neoplazmasında ve klinik göstergelere sahip olmayan bireylerden oluşmaktadır ve bir kolorektal kanser risk grubu olarak değerlendirilmektedir.

5

Lynch sendromu grubunun, sağlıklı hasta grubuna kıyasla B3 ve B48 Ct değerinin önemli bir artışını sergilediği gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, Lynch grubunda, dışkı numunesinde B3 ve B48 bakteriyel yükü daha azdır.

- 10 Elbette ki, Lynch grubu, B10 dışında, CRC'ye kıyasla bakteriyel sekans nicemlemesini bakımından hiçbir istatistiksel fark sergilememektedir. Lynch grubunun mikrobiyolojik profilinin CRC'ye benzer olduğu anlaşılmaktadır ancak bu grupta hiçbir klinik gösterge ve neoplazma gözlemlenmemektedir. Bu, bu dört bakteri sekansından biri veya daha fazlasının tespit edilmesinin, CRC riskine sahip olan ve kolonoskopi araştırılmasına ihtiyaç olabilen
- 15 insanların taranmasından etkili bir araç olabileceği anlamına gelmektedir.

Tablo 6. Sağlıklı bireyler, CRC hastaları ve Lynch sendromu taşıyıcılarında (Ct'de ifade edilen) 4 bakteriyel sekanslarının nicemlemesi, tek yönlü ANOVA ve ROC analizi ile istatistiksel analiz.

Kimlik	Grup	Durum	B3	B48	B10	B46
4	CRC	1	29.86	20.84	14.18	21.34
5	CRC	1	24.3	15.88	10.34	17.53
6	CRC	1	27.33	20.66	15.77	23.13
7	CRC	1	24.88	19.06	13.64	20.69
8	CRC	1	20.61	17.78	12.92	19.7
11	CRC	1	27.28	25.69	17.05	24.35
12	CRC	1	29.04	22.58	16.49	23.17
13	CRC	1	21.98	17.52	10.97	17.34
14	CRC	1	27.07	19.94	13.52	19.9
15	CRC	1	28.57	26.60	19.77	27.53
24	CRC	1	26.77	22.64	17.84	23.83
25	CRC	1	21.64	17.01	11.54	18.7
27	CRC	1	26.52	20.97	15.49	22.63
31	CRC	1	29.91	18.92	16.44	23.8
35	CRC	1	23.37	18.81	12.24	18.77
36	CRC	1	22.87	17.28	12.74	19.76
38	CRC	1		16.36	24.43	30.7
F10	CRC	1	20.49	18.59	16.33	22.78
F16	CRC	1	18.24		14.35	20.75

F11	CRC	1	29.19	20.33	20.37	26.45
F3	CRC	1	32.48	23.52	19.80	26.20
F4	CRC	1	21.76	16.41	14.88	20.87
F5	CRC	1	20.56	19.04	17.61	24.00
F6	CRC	1	31.6	23.22	21.82	27.67
F7	CRC	1	27.14	23.19	22.34	28.20
F8	CRC	1	22.37	18.82	15.61	22.04
43	CRC	1	30.9	22.46	17.12	25.57
16	C	0	22.97	20.21	15.54	23.12
17	C	0	20.4	15.84	10.71	17.54
18	C	0	22.05	15.72	12.06	17.67
23	C	0	21.79	17.16	12.59	18.89
28	C	0	20	18.86	15.29	21.33
30	C	0	26.61	20.47	12.78	20.26
32	C	0	22.76	15.07	15.95	23.09
33	C	0	23.66	18.30	13.54	19.57
34	C	0	22.01	17.73	14.29	19.07
37	C	0	24.06	19.60	14.47	19.65
F1	C	0	24.71	18.09	14.79	21.97
F12	C	0	20.79	17.55	14.95	20.90
F13	C	0	25.1	19.36	19.22	24.78
F14	C	0	21.63	19.46	15.07	21.44
F2	C	0	20.42	17.07	12.76	20.57
F15	C	0	19.69	17.55	12.84	19.85
F9	C	0	23.29	17.61	15.41	21.80
39	C	0		18.03	11.95	18.97
1	L	2	23.08	18.76	12.03	19.21
2	L	2	26.58	18.47	13.60	21.02
3	L	2	23.51	19.36	10.85	18.33
9	L	2		16.94	12.89	19.77
10	L	2	19.91	17.68	10.44	17.84
19	L	2	32.81	21.60	15.72	21.67
20	L	2	19.9	19.77	17.81	24.2
21	L	2	19.66	17.05	13.55	19.7
22	L	2	21.28	16.04	10.22	17.48
26	L	2	19.57	20.73	11.79	19.36
29	L	2	23.67	17.92	11.30	18.2
40	L	2	29.14	23.47	19.42	26.3
41	L	2	32.14	20.18	17.27	23.72
42	L	2	35.19	18.34	19.63	27.07

44	L	2	28.83	23.16	16.15	23.42
45	L	2	24.79	16.85	10.84	19.02
MIL1	L	2	37.1	22.60	14.69	25.52
MIL2	L	2	32.74	24.60	14.63	25.53
MIL3	L	2	27.80	18.00	10.34	20.28
MIL4	L	2	29.09	20.00	18.17	29.66
MIL5	L	2	33.45	22.60		24.81
MIL6	L	2	31.69	20.20	14.66	24.54
MIL7	L	2	35.88	22.90	13.05	24.59
MIL8	L	2	26.2	20.60	10.85	21.87
<b>Ortalama</b>	CRC		25.64346154	20.15846154	16.13222222	22.86666667
	C		22.46705882	17.98222222	14.12111111	20.58166667
	Lynch		27.56565217	19.90916667	13.9076087	22.21291667
<b>Standart Sapma</b>	CRC		3.96679613	2.887129637	3.575465632	3.448853767
	C		1.948072011	1.514799756	1.957886432	1.927739456
	Lynch		5.628873475	2.403976627	3.02383331	3.369239985
<b>P-değeri (tek yönlü ANOVA)</b>	CRC'ye karşı C		0.038	0.019	0.049	0.021
	CRC'ye karşı L		0.381	0.988	0.057	0.849
	L'ye karşı C		0.004	0.018	0.989	0.163
<b>C'ye karşı L</b>	<b>Orta Nokta</b>		25.65	19.69	11.87	23.27
	<b>AUC</b>		0.73	0.746	0.55	0.629
	<b>Duyarlılık</b>		60.9	54,2	34.8	45.8
<b>L'ye karşı CRC</b>	<b>Özgüllük</b>		88.9	94.1	94.7	94.7
	<b>Orta Nokta</b>		31.65	19.21	14.78	21.95
	<b>AUC</b>		0.60	0.487	0.69	0.55
	<b>Duyarlılık</b>		96	52	65.4	61.5
	<b>Özgüllük</b>		34.8	58.3	69.6	54.2
	<b>Orta Nokta</b>		26.69	20.90	15.75	22.0
<b>CRC'ye karşı C</b>	<b>AUC</b>		0,70	0.69	0.69	0.698
	<b>Duyarlılık</b>		%48	%36	%57	%61.5
	<b>Özgüllük</b>		%94	%100	%89.5	%84

Şekiller 18 ila 21, sırasıyla, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10 sekansları için CRC, L ve C gruplarındaki mutlak Ct değerlerinin grafiksel temsilini sağlamaktadır.

5

Şekil 28, sağ tarafta (C) karşı Lynch (L) analizinde B3, B10, B46 ve B48'e yönelik ROC eğrilerini sağlamaktadır.

Şekil 30, CRC'ye karşı Lynch analizinde B3, B10, B46 ve B48'e yönelik ROC eğrilerini

sağlamaktadır

### **Örnek 7: 16S rDNA biyoişaretçi analizi CRC + Lynch'e karşı sağlıklı bireyler**

5 Örnek 6 analizine göre, Lynch sendromu taşıyıcıları, CRC hastalarında, dışkıda benzer bir mikrobiyolojik profile sahiptir. Dolayısıyla, bu deneyde, kolonoskopi araştırmasından önce, sağlıklı bireylerde ve kolorektal kanseri riski olan bireylerde (CRC+L) kolorektal kanseri riskinin taranmasına yönelik dört bakteriyel sekansın nicemleme tespiti kullanılarak ait potansiyelin test edilmesi amaçlanmaktadır

10

Tablo 7'de, Ct olarak ifade edilen bakteriyel sekansların nicemlemesi temsil edilmektedir.

B3, B48 ve B46'nın, kolorektal kanseri risk grubunda (CRC+L) Ct değerini anlamlı şekilde arttırdığı gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, dışkıda bu bakterilerin seviyesi azalmaktadır

15

CRC+L'de B10 ayrıca, hiçbir istatistiksel fark gözlemlenmese de daha düşük bir seviye sergilemektedir (p=0.137).

20

Kolorektal kanserin tespit edilmesinde bakteriyel nicemleme performansları değerlendirildiğinde, B3 ve B48'in en iyi doğruluğa (0.7) ve sırasıyla %56.2 duyarlılık-%88.9 özgüllük ve %51 duyarlılık-%84 özgüllüğe sahip olduğu gösterilmektedir.

25

İkinci olarak, B46, 0.665 değerinde bir doğruluğa ve %94.7 duyarlılık-%23.12 özgüllüğe sahiptir. Nihai olarak, B10, 0.58 değerinde bir doğruluğa ve %44.9 duyarlılık-%89.5 özgüllüğe sahiptir.

30

Bakteriyel sekansların nicemlemesinin Ct'si arasındaki oran hesaplanmıştır. Hiçbir istatistiksel fark gözlemlenmese de (Mann-Whitney U testi ile B3/B46 p=0.061; iki numuneli t-testi analizi ile B10/B3 p=0.132; iki numuneli t-testi analizi p=0.127 ile B46/B10); artıran bir numunede bu oranın uygulanması, CRC'nin taramasının tamamlanması için kullanışlı bir algoritma olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır

35

Bu amaçla, ayrıca, dört sekansın kombinasyonu da, testin duyarlılığı ve özgüllüğünün artırılmasından göz önünde bulundurulmalıdır

**Tablo 7.** Sağlıklı bireylerin (C) ve kolorektal kanser riski taşıyan bireylerin (CRC+L) Ct'de ifade edilmiş 4 bakteriyel sekansların ölçümü, iki numune t-testi ve ROC analizi ile istatistiksel analiz.

Kimlik	Grup	Durum	B3	B48	B10	B46
4	CRC+L	3	29.86	20.84	14.18	21.34
5	CRC+L	3	24.3	15.88	10.34	17.53
6	CRC+L	3	27.33	20.66	15.77	23.13
7	CRC+L	3	24.88	19.06	13.64	20.69
8	CRC+L	3	20.61	17.78	12.92	19.7
11	CRC+L	3	27.28	25.69	17.05	24.35
12	CRC+L	3	29.04	22.58	16.49	23.17
13	CRC+L	3	21.98	17.52	10.97	17.34
14	CRC+L	3	27.07	19.94	13.52	19.9
15	CRC+L	3	28.57	26.60	19.77	27.53
24	CRC+L	3	26.77	22.64	17.84	23.83
25	CRC+L	3	21.64	17.01	11.54	18.7
27	CRC+L	3	26.52	20.97	15.49	22.63
31	CRC+L	3	29.91	18.92	16.44	23.8
35	CRC+L	3	23.37	18.81	12.24	18.77
36	CRC+L	3	22.87	17.28	12.74	19.76
38	CRC+L	3		16.36	24.43	30.7
F10	CRC+L	3	20.49	18.59	16.33	22.78
F16	CRC+L	3	18.24		14.35	20.75
F11	CRC+L	3	29.19	20.33	20.37	26.45
F3	CRC+L	3	32.48	23.52	19.80	26.20
F4	CRC+L	3	21.76	16.41	14.88	20.87
F5	CRC+L	3	20.56	19.04	17.61	24.00
F6	CRC+L	3	31.6	23.22	21.82	27.67
F7	CRC+L	3	27.14	23.19	22.34	28.20
F8	CRC+L	3	22.37	18.82	15.61	22.04
43	CRC+L	3	30.9	22.46	17.12	25.57
1	CRC+L	3	23.08	18.76	12.03	19.21
2	CRC+L	3	26.58	18.47	13.60	21.02
3	CRC+L	3	23.51	19.36	10.85	18.33
9	CRC+L	3		16.94	12.89	19.77
10	CRC+L	3	19.91	17.68	10.44	17.84
19	CRC+L	3	32.81	21.60	15.72	21.67
20	CRC+L	3	19.9	19.77	17.81	24.2
21	CRC+L	3	19.66	17.05	13.55	19.7
22	CRC+L	3	21.28	16.04	10.22	17.48
26	CRC+L	3	19.57	20.73	11.79	19.36
29	CRC+L	3	23.67	17.92	11.30	18.2

40	CRC+L	3	29.14	23.47	19.42	26.3
41	CRC+L	3	32.14	20.18	17.27	23.72
42	CRC+L	3	35.19	18.34	19.63	27.07
44	CRC+L	3	28.83	23.16	16.15	23.42
45	CRC+L	3	24.79	16.85	10.84	19.02
MIL1	CRC+L	3	37.1	22.60	14.69	25.52
MIL2	CRC+L	3	32.74	24.60	14.63	25.53
MIL3	CRC+L	3	27.80	18.00	10.34	20.28
MIL4	CRC+L	3	29.09	20.00	18.17	29.66
MIL5	CRC+L	3	33.45	22.60		24.81
MIL6	CRC+L	3	31.69	20.20	14.66	24.54
MIL7	CRC+L	3	35.88	22.90	13.05	24.59
MIL8	CRC+L	3	26.2	20.60	10.85	21.87
16	C	0	22.97	20.21	15.54	23.12
17	C	0	20.4	15.84	10.71	17.54
18	C	0	22.05	15.72	12.06	17.67
23	C	0	21.79	17.16	12.59	18.89
28	C	0	20	18.86	15.29	21.33
30	C	0	26.61	20.47	12.78	20.26
32	C	0	22.76	15.07	15.95	23.09
33	C	0	23.66	18.30	13.54	19.57
34	C	0	22.01	17.73	14.29	19.07
37	C	0	24.06	19.60	14.47	19.65
F1	C	0	24.71	18.09	14.79	21.97
F12	C	0	20.79	17.55	14.95	20.90
F13	C	0	25.1	19.36	19.22	24.78
F14	C	0	21.63	19.46	15.07	21.44
F2	C	0	20.42	17.07	12.76	20.57
F15	C	0	19.69	17.55	12.84	19.85
F9	C	0	23.29	17.61	15.41	21.80
39	C	0		18.03	11.95	18.97
<b>Ortalama</b>		CRC+L	26.54	20.03	15.10	22.56
		C	22.46	17.98	14.12	20.58
<b>Standart Sapma</b>		CRC+L	4.86	2.64	3.48	3.39
		C	1.94	1.51	1.96	1.93
<b>P-değeri (İki numune t-testi)</b>		CRC+L'ye karşılı	0.0001	0.001	0.137	0.004
		<b>Orta Nokta</b>	25,65	19.69	15.58	23.13
		<b>AUC</b>	0.71	0.70	0.580	0.665
		<b>Duyarlılık</b>	56.2	51	44.9	94.7
		<b>Özgüllük</b>	88.9	84	89.5	23.12

Şekil 22, sırasıyla CRC+ Lynch (L) ve sağlıklı (C) gruplarda, sırasıyla SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7 ve SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10 sekanslarındaki mutlak Ct değerlerinin grafiksel temsilini sağlamaktadır

5 Şekil 29, sağlıklıya karşı CRC + Lynch analizinde B3, B10, B46 ve B48'e yönelik ROC eğrilerini sağlamaktadır

### **Örnek 8: 16S rDNA biyoişaretçi analizi CRC'ye karşı L-Yüksek Risk, buna karşı L-Düşük Risk, buna karşı sağlıklı bireyler**

10

Bu örnekte, Lynch sendromu taşıyıcılarında bakteriyel sekansların nicemlenmesi kullanılarak kolorektal kanser riskinin farklı aşamalarından tanımlanması amaçlanmaktadır

15 Kolorektal neoplazma arkaplanma ve son kolonoskopisinde adenomaların varlığına göre, Lynch sendromu taşıyıcıları, Yüksek risk (L-Yüksek Risk) ve Düşük risk (L-Düşük risk) kolorektal kanser olarak sınıflandırıldı. 6 Yüksek riskli ve 18 Düşük riskli birey bulunmaktaydı

20 Dört bakteriyel sekansın nicemlenmesi gerçekleştirilmiştir ve farklı gruplar arasında istatistiksel olarak hiçbir farklılık gözlemlenmemiştir. Yalnızca B3 seviyeleri için, C'ye karşı L-Düşük riski ( $p=0.088$ , Kruskal-Wallis testi) ve C'ye karşı L-Yüksek riski ( $p=0.143$ , Kruskal-Wallis testi) kıyaslayan, Ct'nin azalma eğilimi mevcuttu.

Bakteriyel sekansların nicemlenmesine ait Ct arasındaki oran hesaplanmıştır

25 Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır ve B3/B10 ve B10/B46 oranları C ve L-Düşük risk arasında anlamlı bir fark sergilememiştir. B3/B48 oranı C'ye karşı L-Yüksek riski kıyaslayan anlamlı bir fark sergilemektedir. B3/B10 ve B48/B10 oranları CRC'ye karşı L-Yüksek Riskte anlamlı şekilde farklı olmuştur.

30 ROC analizleri numune boyutundan dolayı gerçekleştirilmemiştir, ancak istatistiksel analizler göz önünde bulundurulduğunda, L-Düşük riskli grubu ayırt edebildiğinden dolayı en iyi oranın B3/B10 olabildiği tahmin edilebilmektedir.

35 Bu amaçla, dört sekansın kombinasyonunun ayrı ayrı testin gücünü artırdığı düşünülebilmektedir ve çok değişkenli lojistik regresyon analizleri gerçekleştirilmelidir, ancak

numunenin boyutunun artması gerekmektedir.

**Tablo 8.** Sağlıklı bireyler (C), L-Düşük Risk, L-Yüksek Risk ve CRC'ye ait Ct'de ifade edilen 4 bakteriyel sekansın nicemlemesi

Kimlik	Grup	Durum	B3	B48	B10	B46	B3/B10	B48/B10	B3/B48	B10/B46
4	CRC	1	29,86	20,84	14,18	21,34	2,11	1,47	1,43	0,66
5	CRC	1	24,3	15,88	10,34	17,53	2,35	1,54	1,53	0,59
6	CRC	1	27,33	20,66	15,77	23,13	1,73	1,31	1,32	0,68
7	CRC	1	24,88	19,06	13,64	20,69	1,82	1,40	1,31	0,66
8	CRC	1	20,61	17,78	12,92	19,7	1,60	1,38	1,16	0,66
11	CRC	1	27,28	25,69	17,05	24,35	1,60	1,51	1,06	0,70
12	CRC	1	29,04	22,58	16,49	23,17	1,76	1,37	1,29	0,71
13	CRC	1	21,98	17,52	10,97	17,34	2,00	1,60	1,25	0,63
14	CRC	1	27,07	19,94	13,52	19,9	2,00	1,47	1,36	0,68
15	CRC	1	28,57	26,60	19,77	27,53	1,45	1,35	1,07	0,72
24	CRC	1	26,77	22,64	17,84	23,83	1,50	1,27	1,18	0,75
25	CRC	1	21,64	17,01	11,54	18,7	1,88	1,47	1,27	0,62
27	CRC	1	26,52	20,97	15,49	22,63	1,71	1,35	1,26	0,68
31	CRC	1	29,91	18,92	16,44	23,8	1,82	1,15	1,58	0,69
35	CRC	1	23,37	18,81	12,24	18,77	1,91	1,54	1,24	0,65
36	CRC	1	22,87	17,28	12,74	19,76	1,80	1,36	1,32	0,64
38	CRC	1		16,36	24,43	30,7		0,67		0,80
F10	CRC	1	20,49	18,59	16,33	22,78	1,25	1,14	1,10	0,72
F16	CRC	1	18,24		14,35	20,75	1,27			0,69

5

F11	CRC	1	29,19	20,33	20,37	26,45	1,43	1,00	1,44	0,77
F3	CRC	1	32,48	23,52	19,80	26,20	1,64	1,19	1,38	0,76
F4	CRC	1	21,76	16,41	14,88	20,87	1,46	1,10	1,33	0,71
F5	CRC	1	20,56	19,04	17,61	24,00	1,17	1,08	1,08	0,73
F6	CRC	1	31,6	23,22	21,82	27,67	1,45	1,06	1,36	0,79
F7	CRC	1	27,14	23,19	22,34	28,20	1,21	1,04	1,17	0,79
F8	CRC	1	22,37	18,82	15,61	22,04	1,43	1,21	1,19	0,71
43	CRC	1	30,9	22,46	17,12	25,57	1,80	1,31	1,38	0,67
16	C	0	22,97	20,21	15,54	23,12	1,48	1,30	1,14	0,67
17	C	0	20,4	15,84	10,71	17,54	1,90	1,48	1,29	0,61
18	C	0	22,05	15,72	12,06	17,67	1,83	1,30	1,40	0,68
23	C	0	21,79	17,16	12,59	18,89	1,73	1,36	1,27	0,67
28	C	0	20	18,86	15,29	21,33	1,31	1,23	1,06	0,72
30	C	0	26,61	20,47	12,78	20,26	2,08	1,60	1,30	0,63
32	C	0	22,76	15,07	15,95	23,09	1,43	0,94	1,51	0,69
33	C	0	23,66	18,30	13,54	19,57	1,75	1,35	1,29	0,69
34	C	0	22,01	17,73	14,29	19,07	1,54	1,24	1,24	0,75
37	C	0	24,06	19,60	14,47	19,65	1,66	1,35	1,23	0,74
F1	C	0	24,71	18,09	14,79	21,97	1,67	1,22	1,37	0,67
F12	C	0	20,79	17,55	14,95	20,90	1,39	1,17	1,18	0,72
F13	C	0	25,1	19,36	19,22	24,78	1,31	1,01	1,30	0,78
F14	C	0	21,63	19,46	15,07	21,44	1,44	1,29	1,11	0,70
F2	C	0	20,42	17,07	12,76	20,57	1,60	1,34	1,20	0,62
F15	C	0	19,69	17,55	12,84	19,85	1,53	1,37	1,12	0,65
F9	C	0	23,29	17,61	15,41	21,80	1,51	1,14	1,32	0,71
39	C	0		18,03	11,95	18,97		1,51		0,63
1	L-Düşük Risk	4	23,08	18,76	12,03	19,21	1,92	1,56	1,23	0,63
3	L-Düşük Risk	4	23,51	19,36	10,85	18,33	2,17	1,78	1,21	0,59
9	L-Düşük Risk	4		16,94	12,89	19,77		1,31		0,65

10	L-Düşük Risk	4	19,91	17,68	10,44	17,84	1,91	1,69	1,13	0,58
19	L-Düşük Risk	4	32,81	21,60	15,72	21,67	2,09	1,37	1,52	0,73
20	L-Düşük Risk	4	19,9	19,77	17,81	24,2	1,12	1,11	1,01	0,74
21	L-Düşük Risk	4	19,66	17,05	13,55	19,7	1,45	1,26	1,15	0,69
26	L-Düşük Risk	4	19,57	20,73	11,79	19,36	1,66	1,76	0,94	0,61
29	L-Düşük Risk	4	23,67	17,92	11,30	18,2	2,09	1,59	1,32	0,62
40	L-Düşük Risk	4	29,14	23,47	19,42	26,3	1,50	1,21	1,24	0,74
42	L-Düşük Risk	4	35,19	18,34	19,63	27,07	1,79	0,93	1,92	0,73
44	L-Düşük Risk	4	28,83	23,16	16,15	23,42	1,79	1,43	1,24	0,69
MIL1	L-Düşük Risk	4	37,1	22,60	14,69	25,52	2,53	1,54	1,64	0,58
MIL2	L-Düşük Risk	4	32,74	24,60	14,63	25,53	2,24	1,68	1,33	0,57
MIL3	L-Düşük Risk	4	27,80	18,00	10,34	20,28	2,69	1,74	1,54	0,51
MIL6	L-Düşük Risk	4	31,69	20,20	14,66	24,54	2,16	1,38	1,57	0,60
MIL7	L-Düşük Risk	4	35,88	22,90	13,05	24,59	2,75	1,75	1,57	0,53
MIL8	L-Düşük Risk	4	26,2	20,60	10,85	21,87	2,41	1,90	1,27	0,50
2	L-Yüksek Risk	5	26,58	18,47	13,60	21,02	1,95	1,36	1,44	0,65
22	L-Yüksek Risk	5	21,28	16,04	10,22	17,48	2,08	1,57	1,33	0,58
41	L-Yüksek Risk	5	32,14	20,18	17,27	23,72	1,86	1,17	1,59	0,73
45	L-Yüksek Risk	5	24,79	16,85	10,84	19,02	2,29	1,55	1,47	0,57
MIL4	L-Yüksek Risk	5	29,09	20,00	18,17	29,66	1,60	1,10	1,45	0,61
MIL5	L-Yüksek Risk	5	33,45	22,60		24,81			1,48	
<b>Ortalama</b>	CRC		25,64	20,16	16,13	22,87	1,66	1,28	1,28	0,70
	C		22,47	17,98	14,12	20,58	1,60	1,29	1,25	0,68
	L-Düşük Risk		27,45	20,20	13,88	22,08	2,02	1,50	1,34	0,63
	L-Yüksek Risk		27,89	19,02	14,02	22,62	1,96	1,35	1,46	0,63
<b>Standart Sapma</b>	CRC		3,97	2,89	3,58	3,45	0,29	0,21	0,14	0,05
	C		1,95	1,51	1,96	1,93	0,21	0,16	0,11	0,05
	L-Düşük Risk		6,08	2,40	2,96	3,09	0,44	0,27	0,25	0,08

<b>P-Değeri</b> <b>Kruskal-Wallis testi</b>	L-Yüksek Risk	4,59	2,41	3,62	4,42	0,26	0,22	0,09	0,06
	CRC'ye karşı C	0,32							
	CRC'ye karşı LL	1				0,017	0,022		
	CRC'ye karşı LH	1							
	C'ye karşı LL	0,088				0,016			0,01
	C'ye karşı LH	0,143						0,031	
	LL'ye karşı LH	1							

Şekiller 23 ila 26, sırasıyla CRC, Yüksek Risk L, Düşük Risk L ve C gruplarında, mutlak Ct değerleri oranları B48/B10, B3/B10, B46/B10 ve B3/B48'in grafiksel temsilini sunmaktadır.

## SEKANS LİSTESİ

- <110> Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta (IDIBGI) Universitat de Girona (UdG)
- 5 <120> NİCELİKSEL PCR İLE BİR İNSAN DIŞKISI NUMUNESİNDEN KOLOREKTAL KANSERİN TEŞHİS EDİLMESİNE YÖNELİK YÖNTEM
- <130> 900 663
- 10 <150> EP14382074  
<151> 2014-03-03
- <160> 13
- <170> PatentIn versiyonu 3.5
- <210> 1
- 15 <211> 489  
<212> DNA  
<213> Yapay Sekans
- <220>  
<223> /mol\_tip="unassigned DNA" /note="B3 16S ribosomal DNA sequence, partial sequence (accession number GQ411111.1)"
- 20 <400> 1

```

acggaggcct tcgggtcgta accgctttca gcaggggaaga gtcaagactg tacctgcaga      60
agaagccccg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtagggggc gagcgttatc      120
cggattcatt gggcgtaaag cgcgcgtagg cggccccgca ggccgggggt cgaagcgggg      180
ggctcaaccc cccgaagccc ccggaacctc cgcggcttgg gtccggtagg ggaggggtgga      240
acaccgggtg tagcggtgga atgcgagat atcgggtgga acaccgggtg cgaaggcggc      300
cctctggggc gagaccgacg ctgaggcgcg aaagctgggg gagcgaacag gattagatac      360
cctggtagtc ccagccgtaa acgatggacg ctaggtgtgg ggggacgac cccccgtgcc      420
gcagccaacg cattaagcgt cccgcctggg gagtacggcc gcaaggctaa aactcaaagg      480
aattgacgg                                     489

```

```

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Yapay Sekans

```

```

5 <220>
  <223> /mol_type="unassigned DNA" /note="B3 16S ribosomal DNA sequence forward primer"

```

```

<400> 2
ggaggccttc gggtcgtaa      19

```

```

10 <210> 3
    <211> 18
    <212> DNA
    <213> Yapay Sekans

```

```

<220>
<223> /mol_type="unassigned DNA" /note="B3 16S ribosomal DNA sequence reverse primer"

```

```

15 <400> 3
    ccgaagcccc cggaacct      18

```

```

20 <210> 4
    <211> 485
    <212> DNA
    <213> Yapay Sekans

```

```

<220>
<223> /mol_type="unassigned DNA" /note="B10 16S ribosomal DNA sequence, partial sequence (accession number GQ411118.1)"

```

```

<400> 4

```

```

cttcggattg taaactcctg ttgttgagga gataatgacg gtactcaaca aggtaagtga      60
cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa aacgtaggtc acaagcgttg tccggaatta      120
ctgggtgtaa agggagcgca ggcgggaaga caagttggaa gtgaaatcca tgggctcaac      180
ccatgaactg ctttcaaaac tgtttttctt gagtagtgca caggtaggcg gaattcccgg      240
tgtagcgggtg gaatgcgtag atatcgggag gaacaccagt ggcgaaggcg gcctactggg      300
caccaactga cgctgaggct cgaaagtgtg ggtagcaaac aggattagat accctggtag      360
tccacactgt aaacgatgat tactaggtgt tggaggattg accccttcag tgccgcagtt      420
aacacaataa gtaatccacc tggggagtac gaccgcaagg ttgaaactca aaggaattga      480
cggac                                          485

```

```

<210> 5
<211> 19
<212> DNA
<213> Yapay Sekans

```

```

5 <220>
  <223> /mol_type="unassigned DNA" /note="B10 16S ribosomal DNA sequence forward primer"

```

```

<400> 5
caacaaggta agtgacggc      19

```

```

10 <210> 6
    <211> 20
    <212> DNA
    <213> Yapay Sekans

```

```

<220>
<223> /mol_type="unassigned DNA" /note="B10 16S rDNA sequence reverse primer"

```

```

15 <400> 6
    cgctacctg tgcactact      20

```

```

20 <210> 7
    <211> 474
    <212> DNA
    <213> Yapay Sekans

```

```

<220>
<223> /mol_type="unassigned DNA" /note="B46 16S ribosomal DNA sequence, partial sequence (accession number GQ411150.1)"

```

```

<400> 7

```

```

gtaacatttc tgtaacaaga catacagcag tttctcagag ttcccaaact caaaggaatt      60
gacggaagcc gcggttccac gtaagtcaca agcgttgctc ggaattactg ggtgtaaagg      120
gagcgcaggc ggaagacaa gttggaagtg aaatccatgg gctcaacca taaactgctt      180
tcctaactgt ttttcttgag tagtgcacag gtaggcggaa ttcccgggtg agcgggtggaa      240
tgcctagata tcgggaggaa caccattggc gaaggcggcc tactggactg caactgacgc      300
tgaggctcga aagtgtgggt agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc actccgtaaa      360
ccatgattac tacgtgttgg aggattgacc ccttctgtgc cgcagataac acaataagta      420
atccacctgg ggagtacgac cgcccgggtg agactcacag gaattgacgg actc          474

```

```

<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> Yapay Sekans

```

```

5 <220>
<223> /mol_type="unassigned DNA" /note="B46 16S ribosomal DNA sequence forward primer"

```

```

<400> 8
tccacgtaag tcacaagcg      19

```

```

10 <210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Yapay Sekans

```

```

<220>
<223> /mol_type="unassigned DNA" /note="B46 16S ribosomal DNA sequence reverse primer"

```

```

15 <400> 9
cgctacctg tgcactactc      20

```

```

<210> 10
<211> 566
<212> DNA
20 <213> Yapay Sekans

```

```

<220>
<223> /mol_type="unassigned DNA" /note="B48 16S ribosomal DNA sequence, partial sequence (accession number GQ411152.1)"

```

```

<400> 10

```

tctcttacgg	ggagcagcag	tggggaatat	tgcacaatgg	gggaaaccct	gatgcagcga	60
cgccgcgtga	gcgatgaagt	atttcggtat	gtaaagctct	atcagcaggg	aagaaaatga	120
cggtacctga	ctaagaagcc	ccggctaaat	acgtgccagc	agccgcggta	atacgtatgg	180
tgcaagcggt	atccggattt	actgggtgta	aagggagcgt	agacggagtg	gcaagtctga	240
tgtgaaaacc	cggggctcaa	ccccgggact	gcattggaaa	ctgtgcatct	agagtgtcgg	300
agaggtaagc	ggaattccta	gtgtagcggg	gaaatgcgta	gatattagga	ggaacaccag	360
tggcgaaggc	ggcttactgg	acgataactg	acgctgaggg	tcgaaagcgt	ggggagcaaa	420
caggattaga	taccctggta	gtccacgccg	taaacgatga	ctactaggtg	tcggggagca	480
cagctcttcg	gtgccgcagc	aaacgcaata	agtattccac	ctggggagta	cgttcgcgaag	540
aatgaaactc	acagaatttg	acggag				566

<210> 11  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Yapay Sekans

5 <220>  
 <223> /mol\_type="unassigned DNA" /note="B48 16S ribosomal DNA sequence forward primer"

<400> 11  
 gtacggggag cagcagtg 18

10 <210> 12  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Yapay Sekans

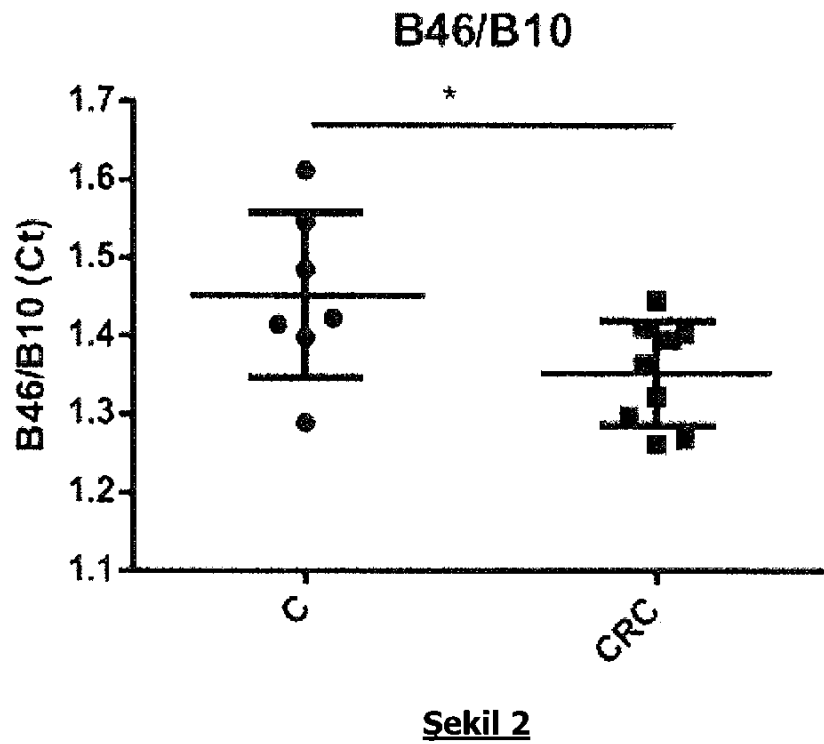
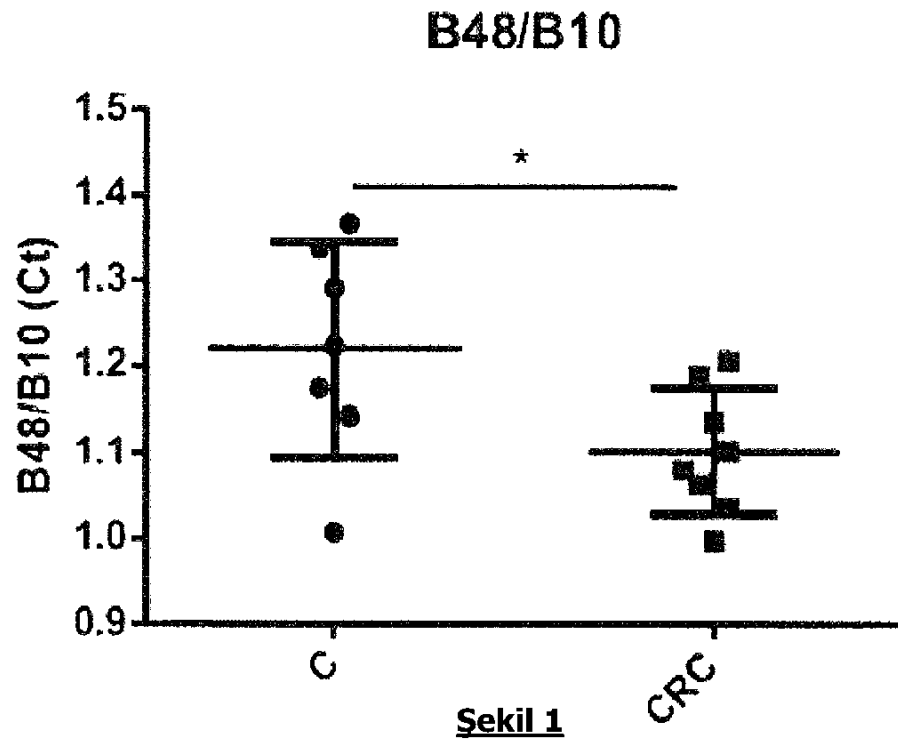
<220>  
 <223> /mol\_type="unassigned DNA" /note="B48 16S ribosomal DNA sequence reverse primer"

15 <400> 12  
 gacactctag atgcacagtt tcc 23

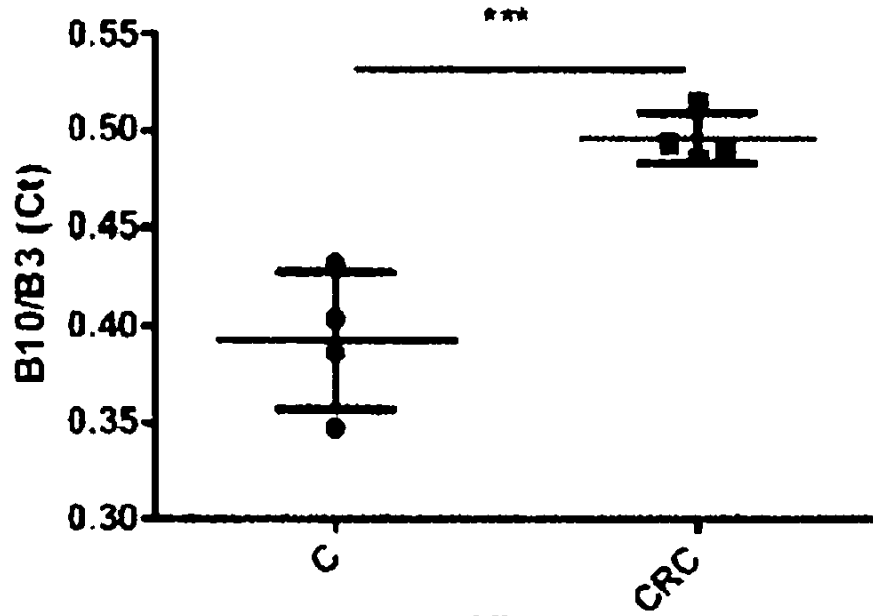
20 <210> 13  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Yapay Sekans

<220>  
 <223> /mol\_type="unassigned DNA" /note="B3 16S ribosomal DNA sequence reverse primer"

25 <400> 13  
 aggttccggg ggcttcgg 18

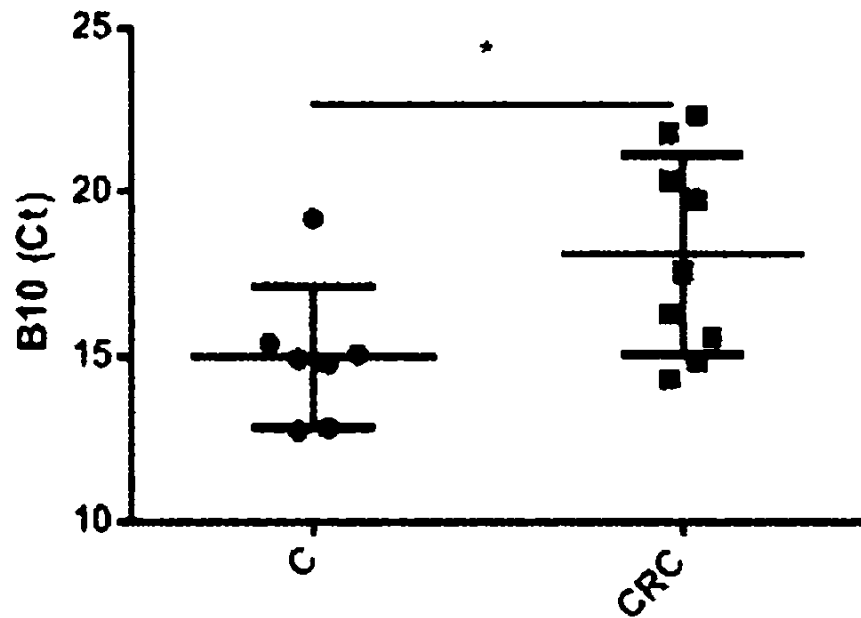


### B10/B3

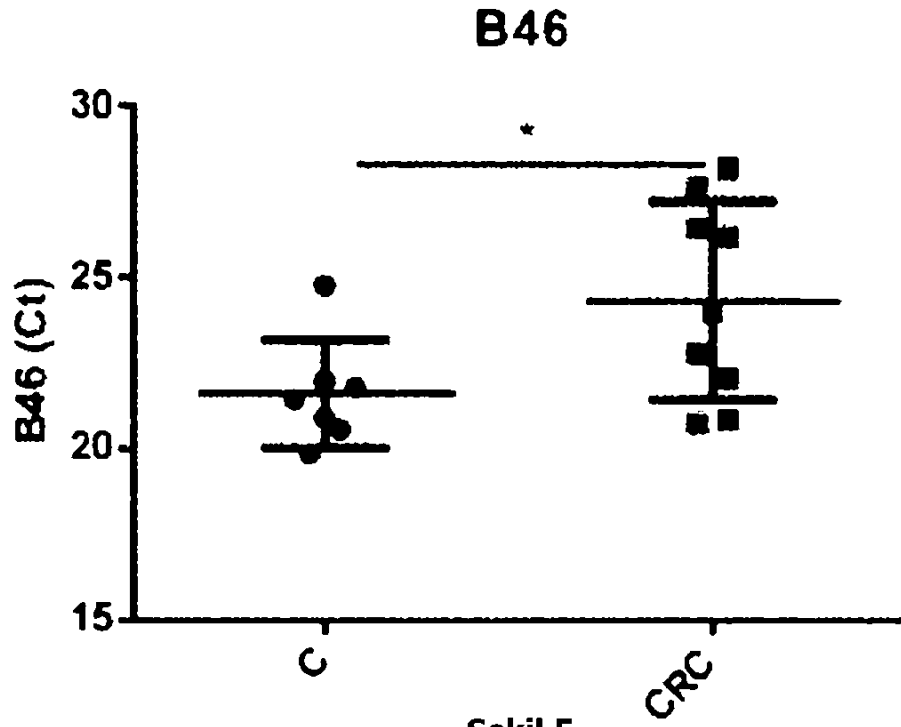


Sekil 3

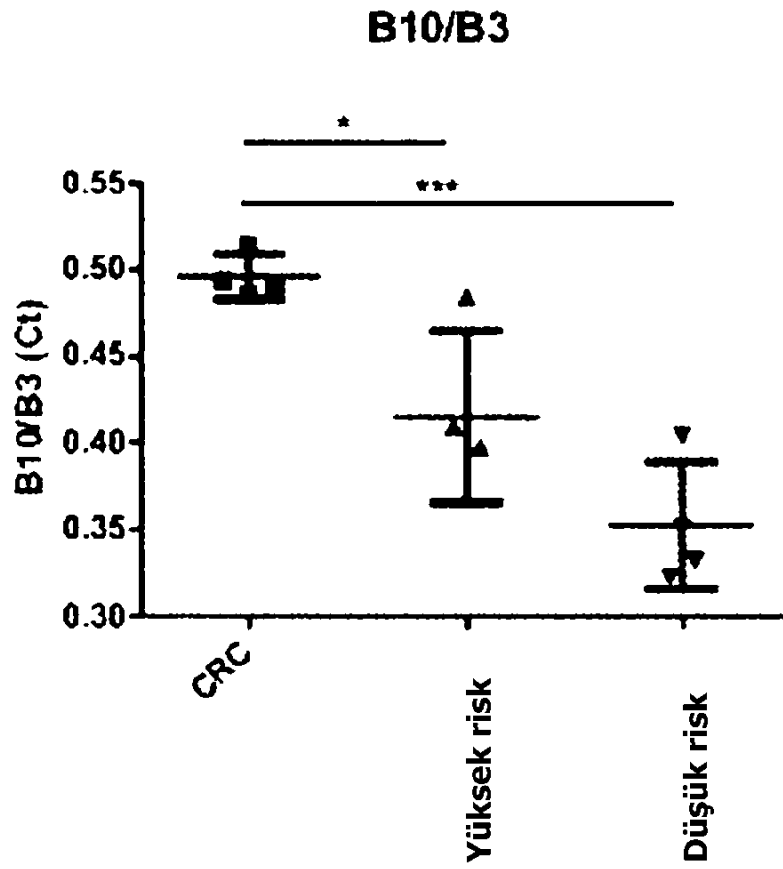
### B10



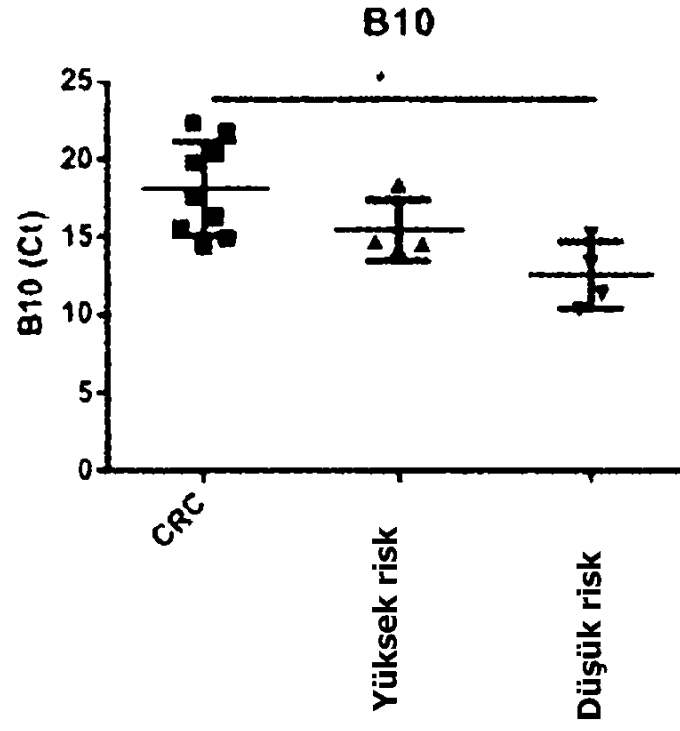
Sekil 4



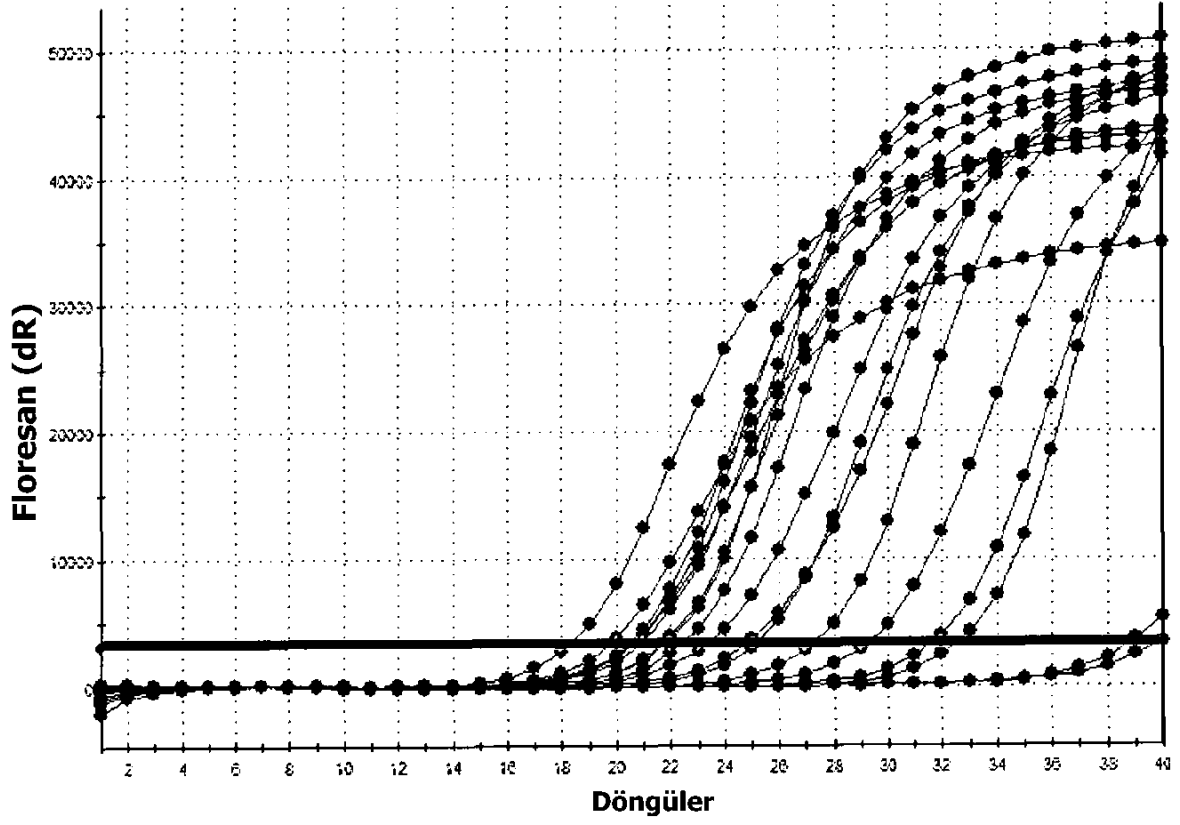
Şekil 5



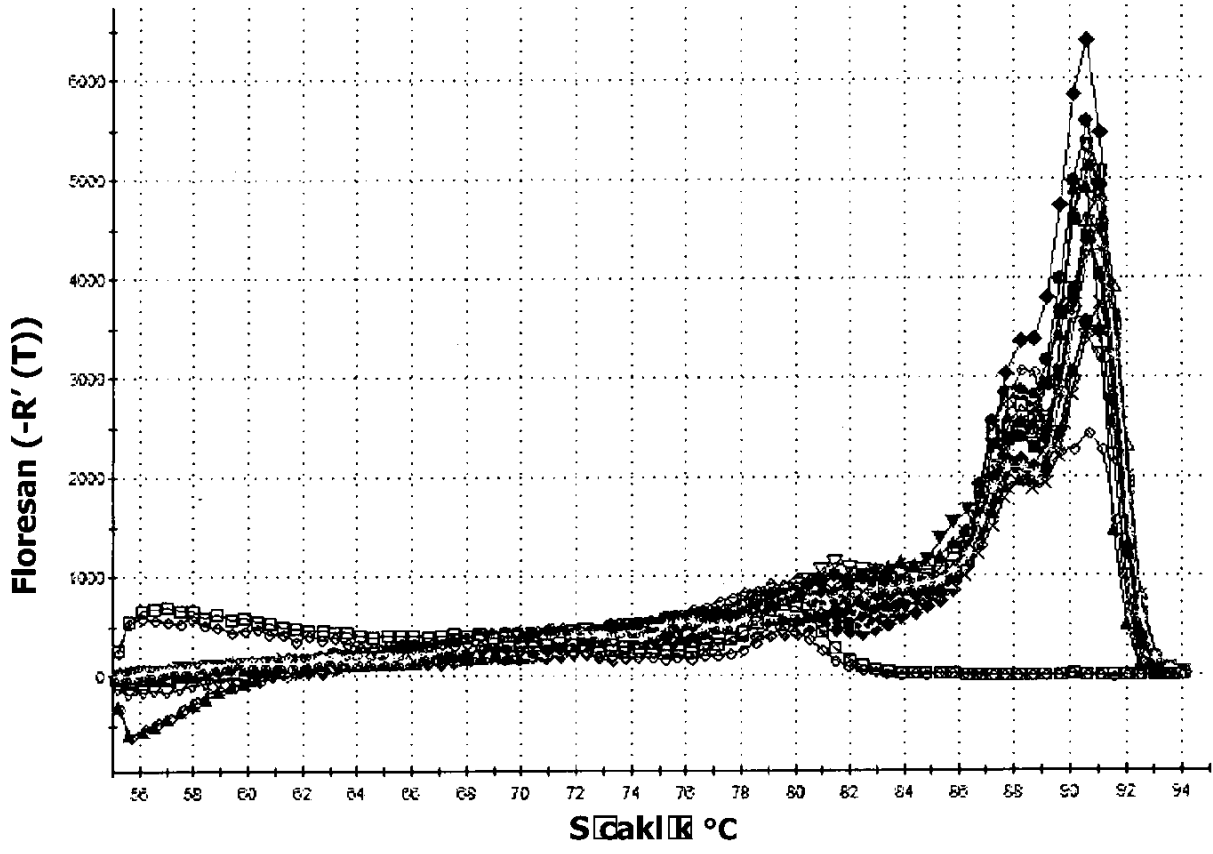
Şekil 6



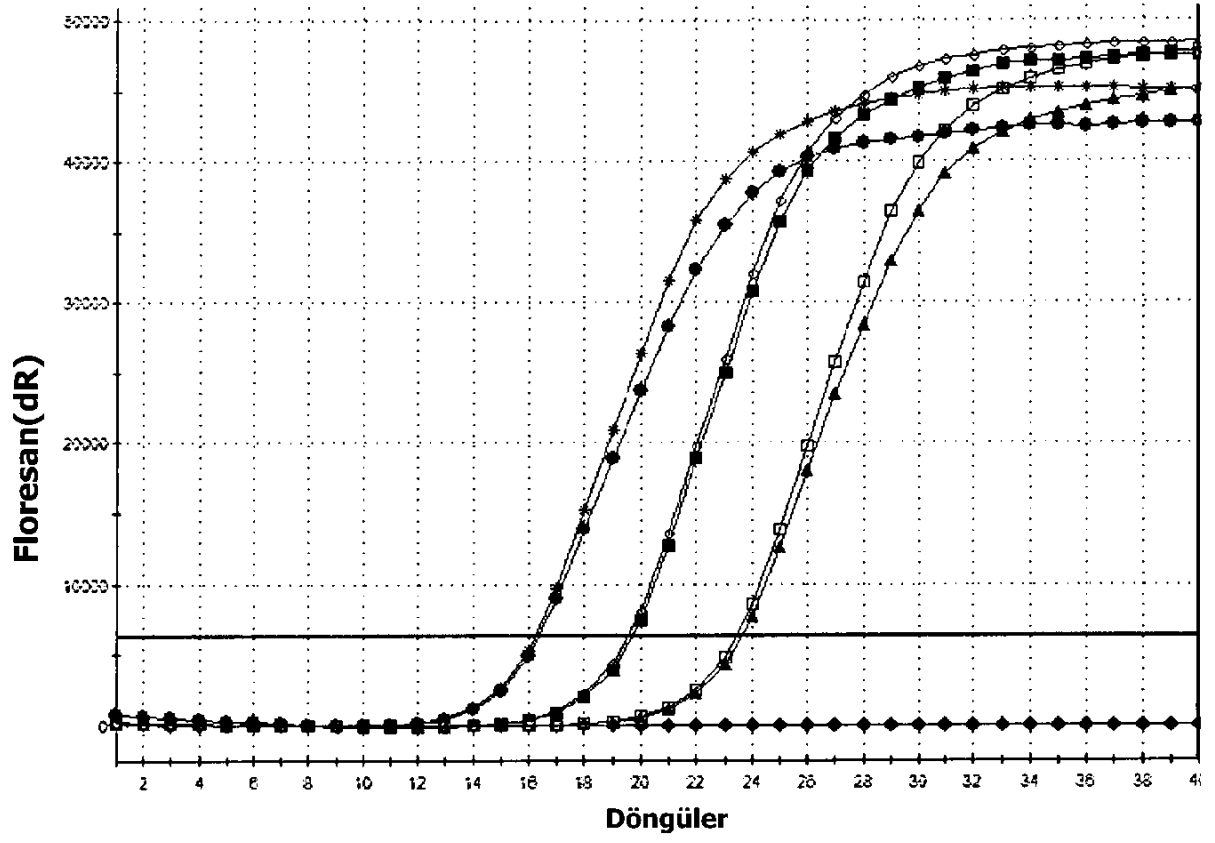
Şekil 7



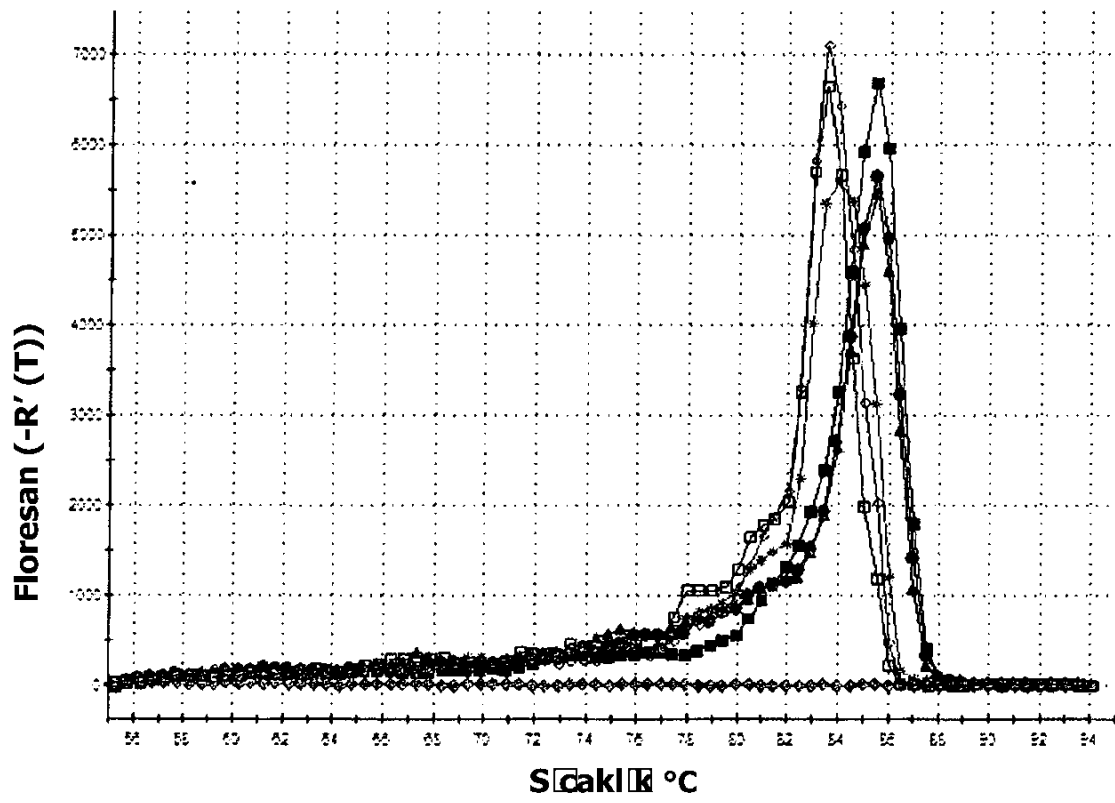
Şekil 8a



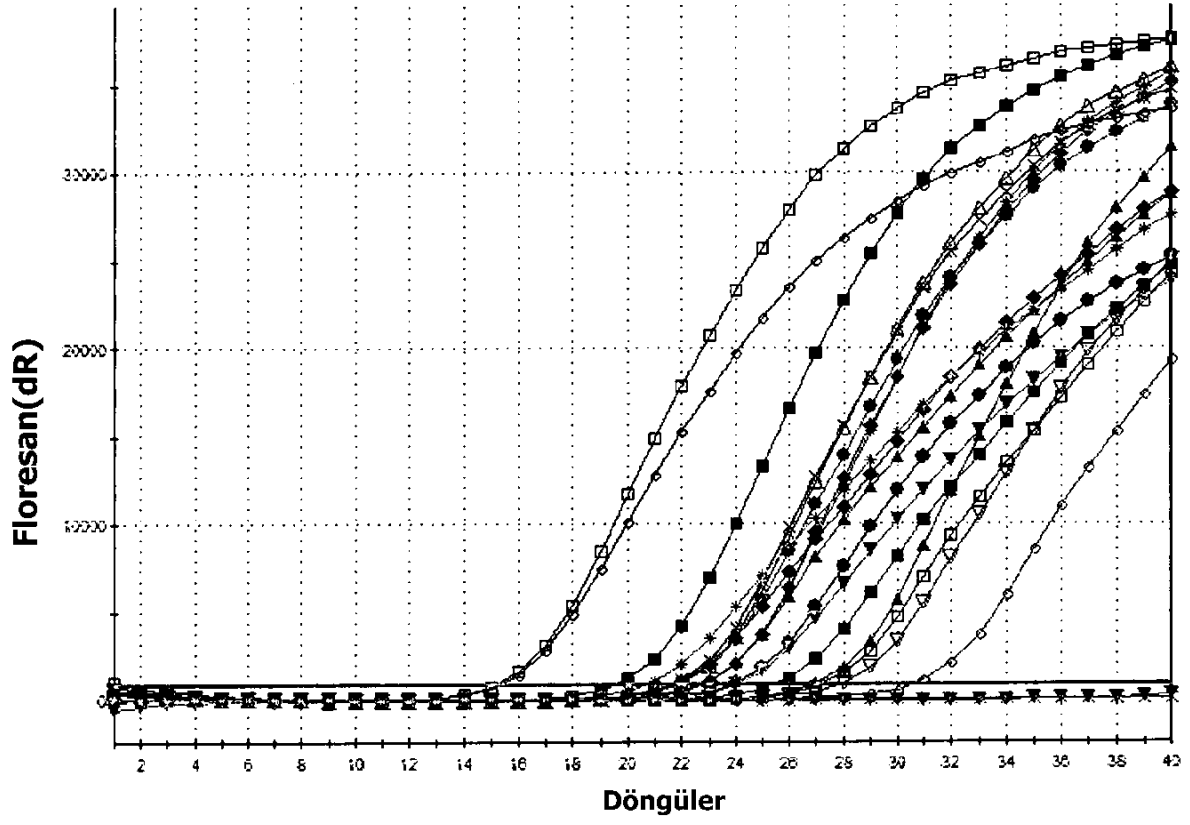
Şekil 8b



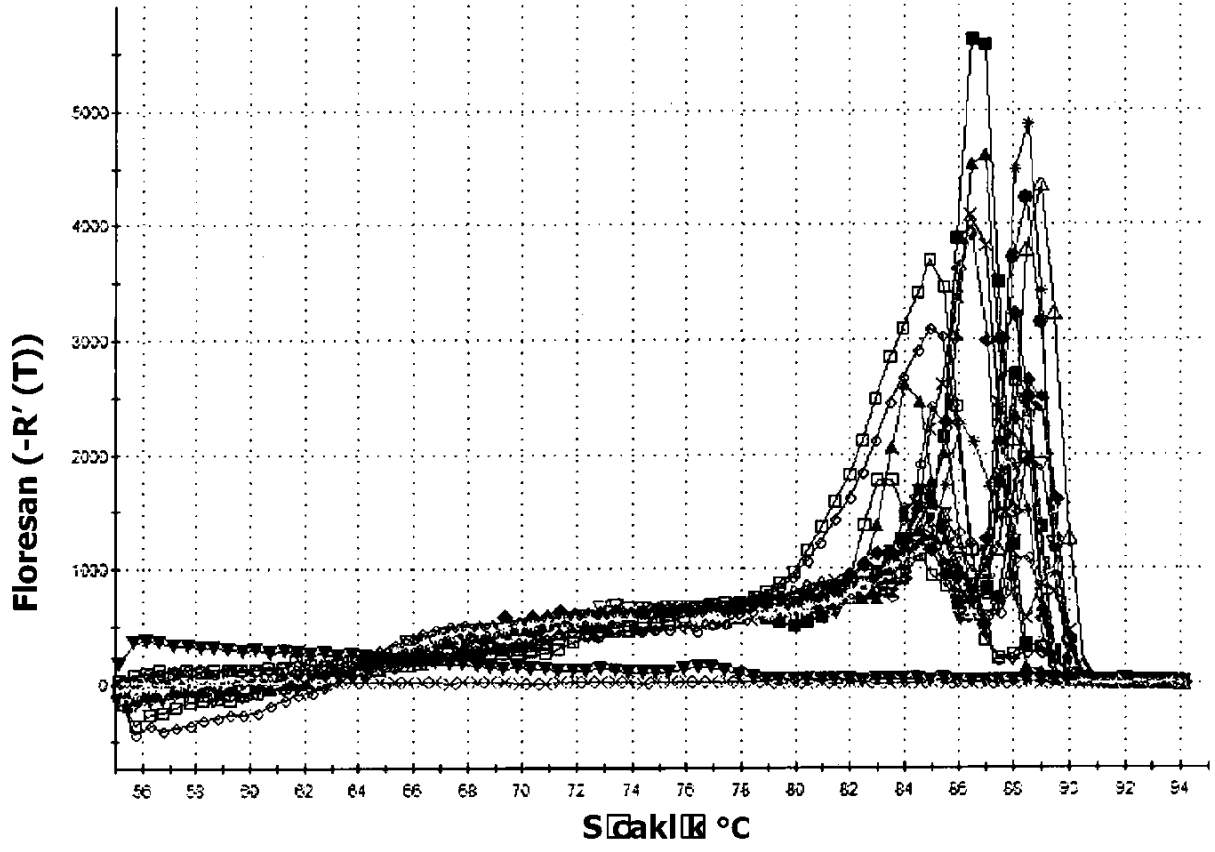
Şekil 9a



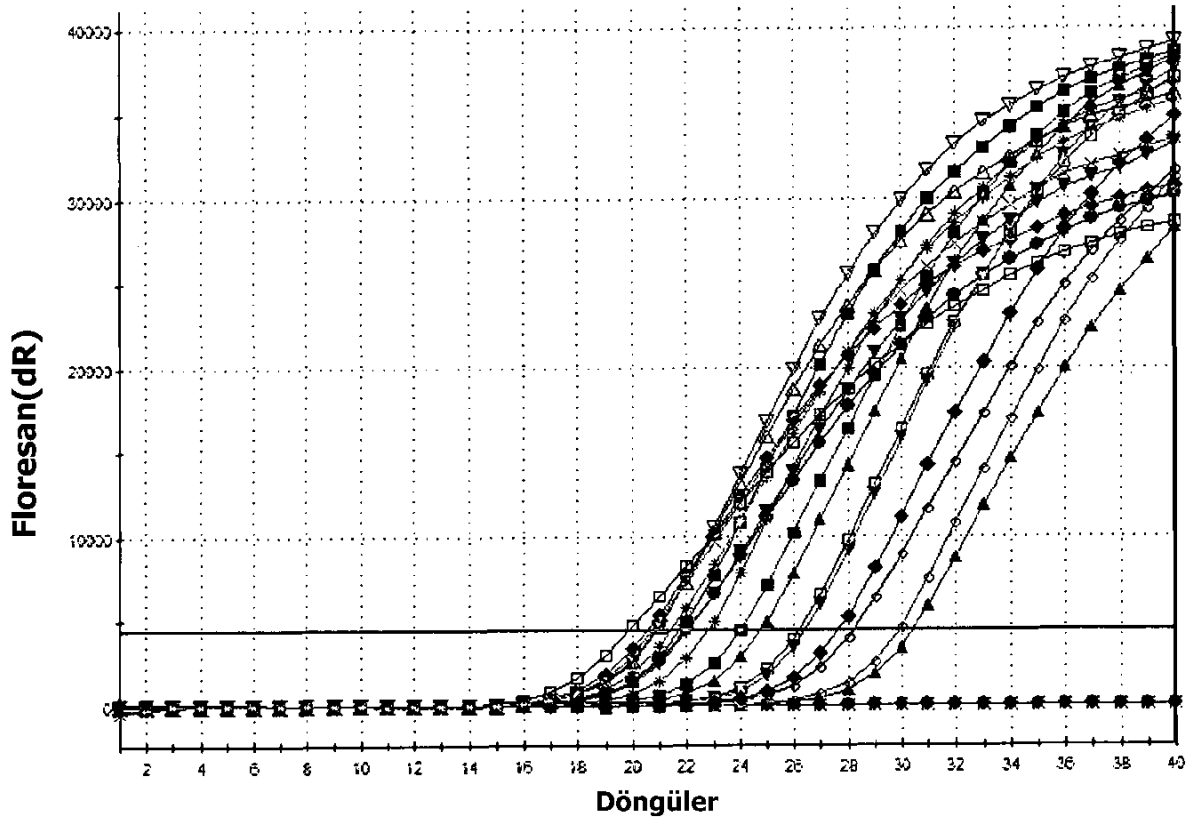
Şekil 9b



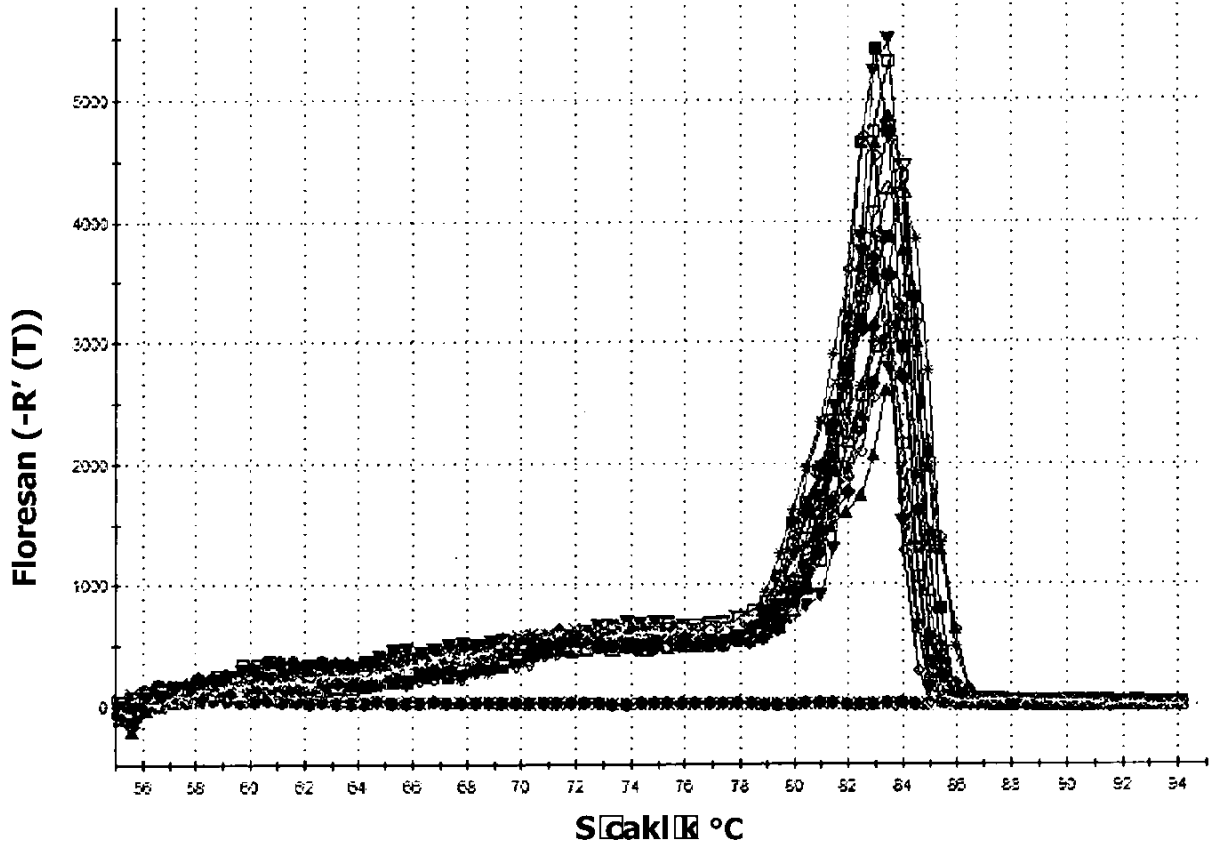
Şekil 10a



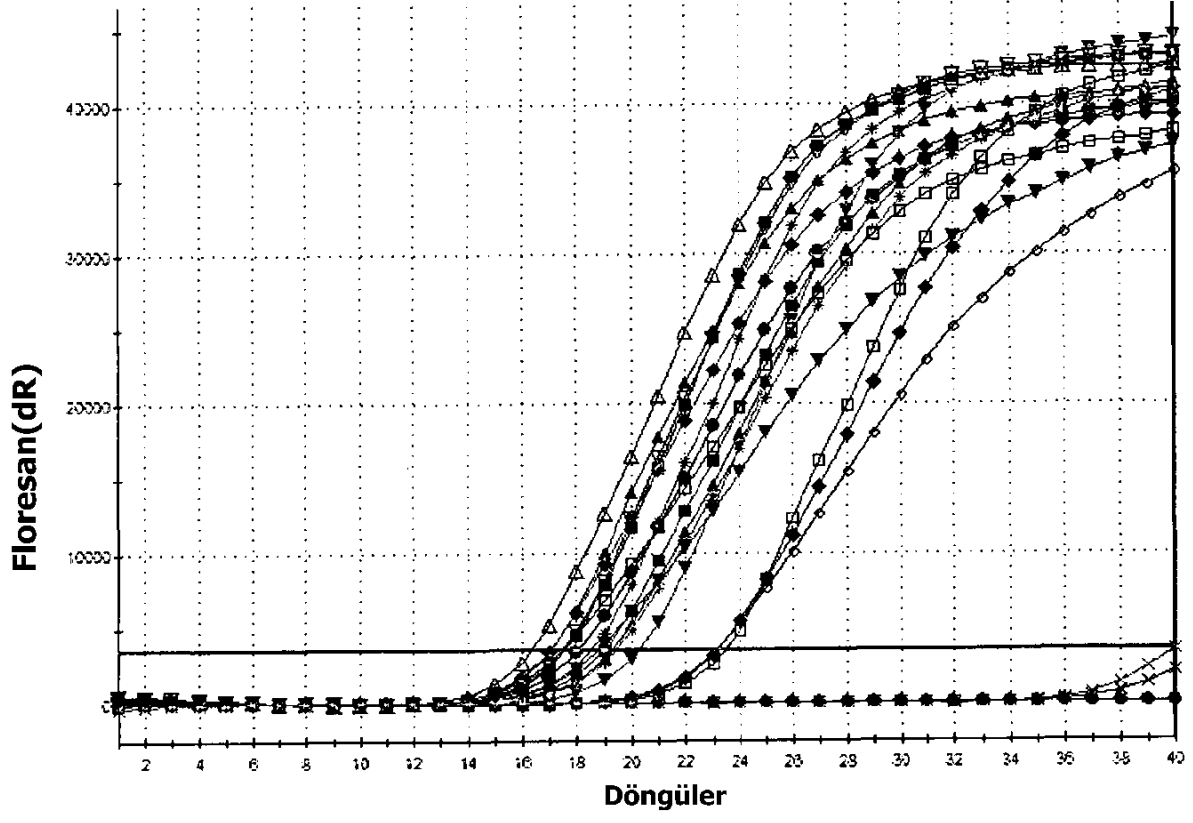
Şekil 10b



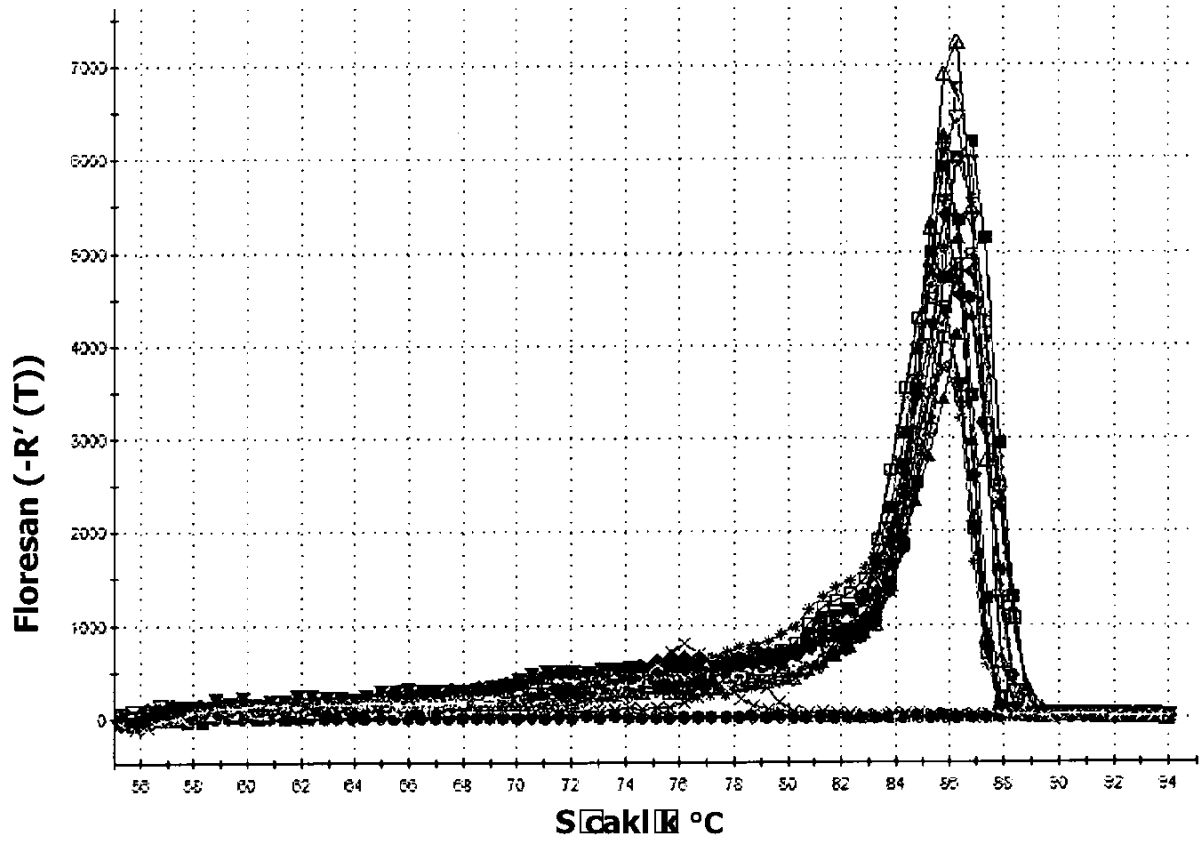
Şekil 11a



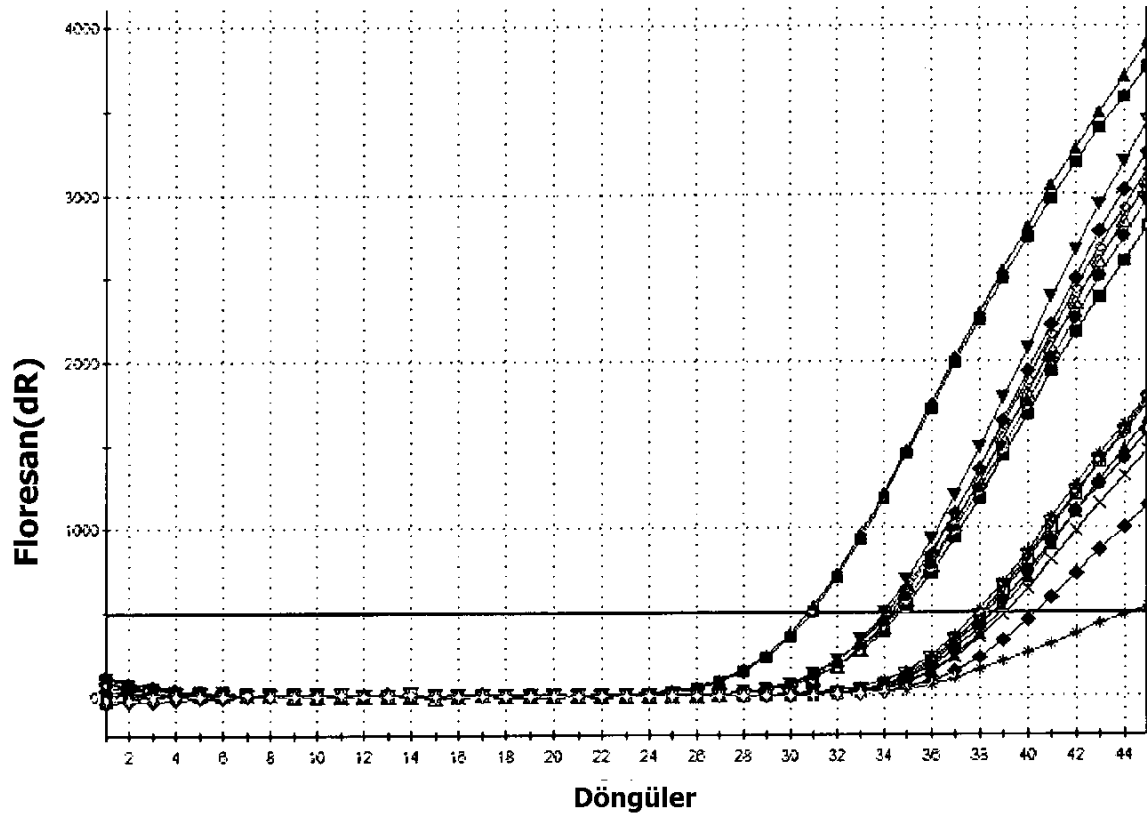
Şekil 11b



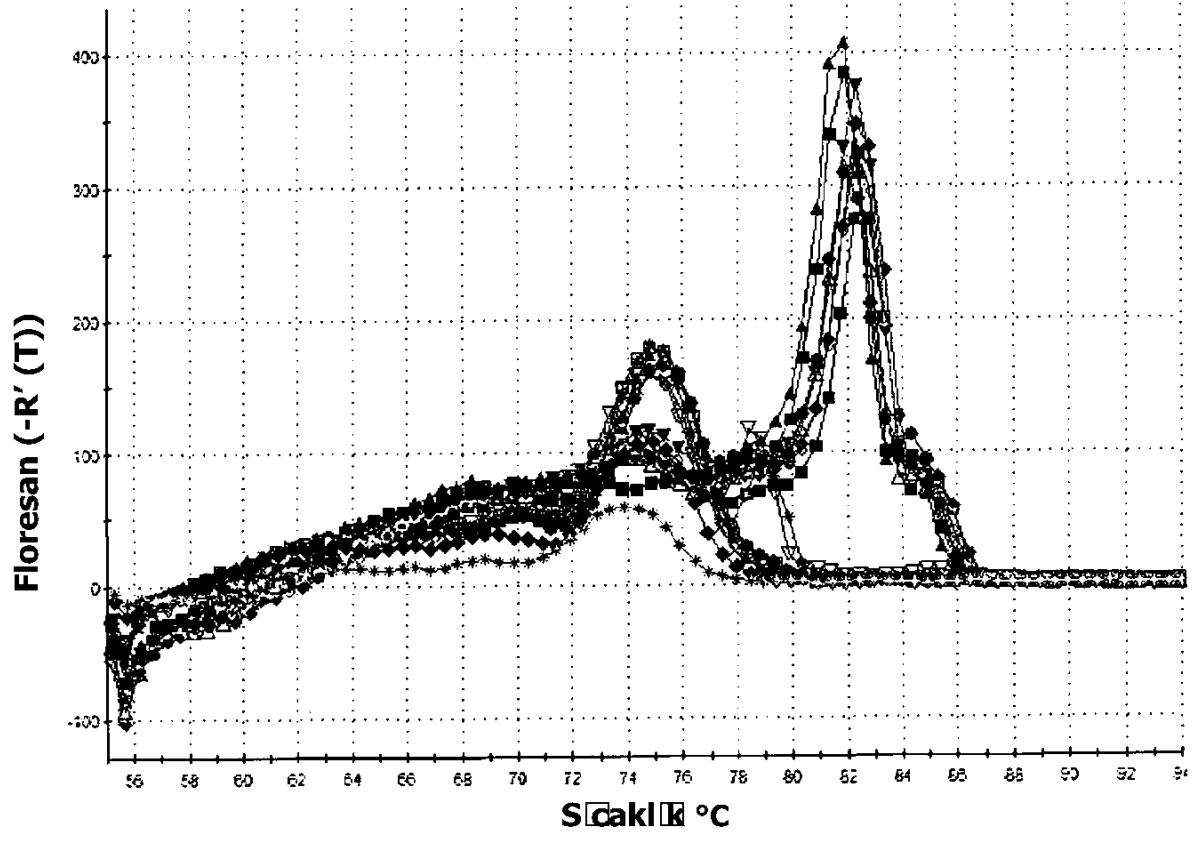
Şekil 12a



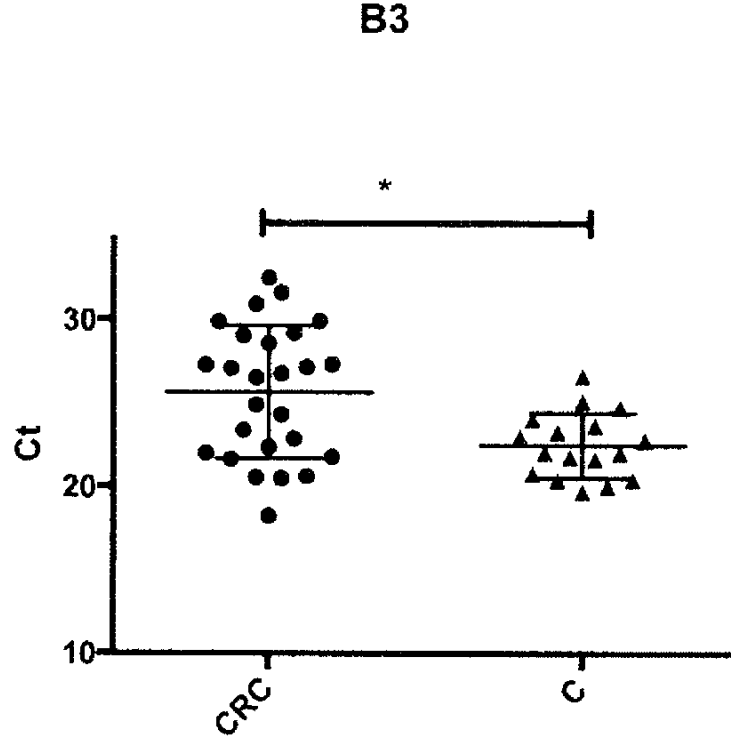
Şekil 12b



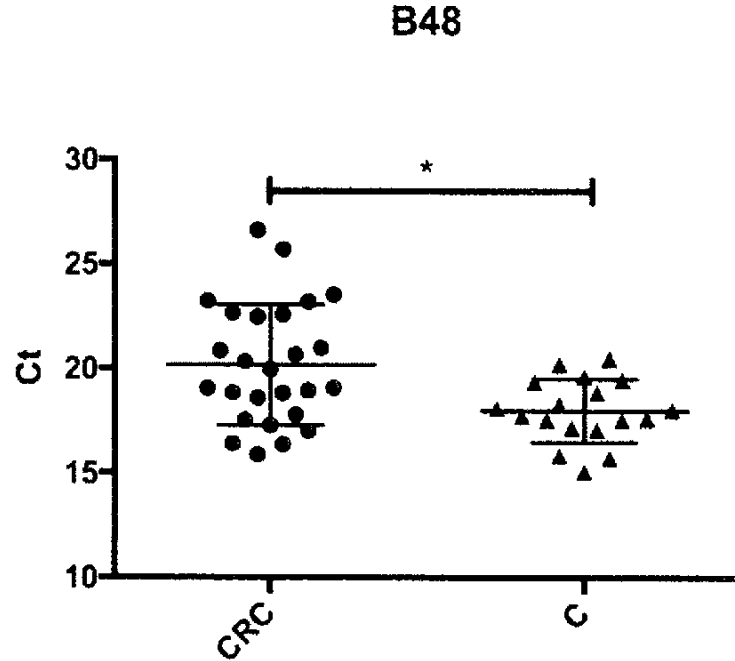
Şekil 13a



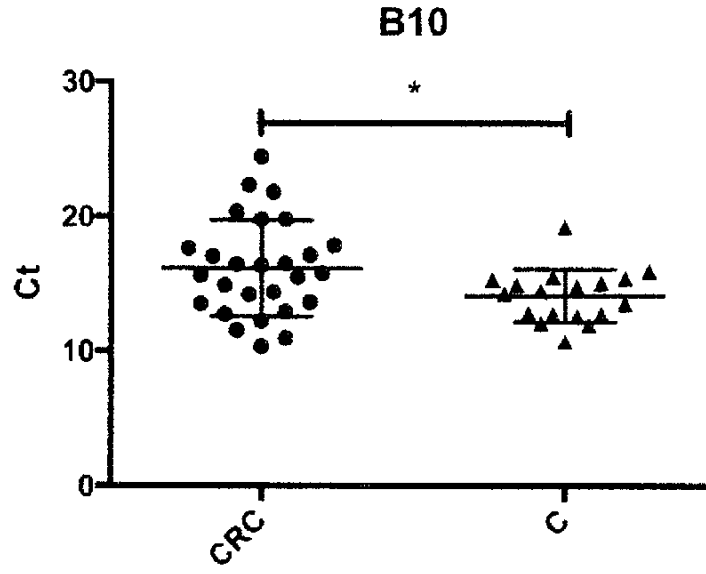
Şekil 13b



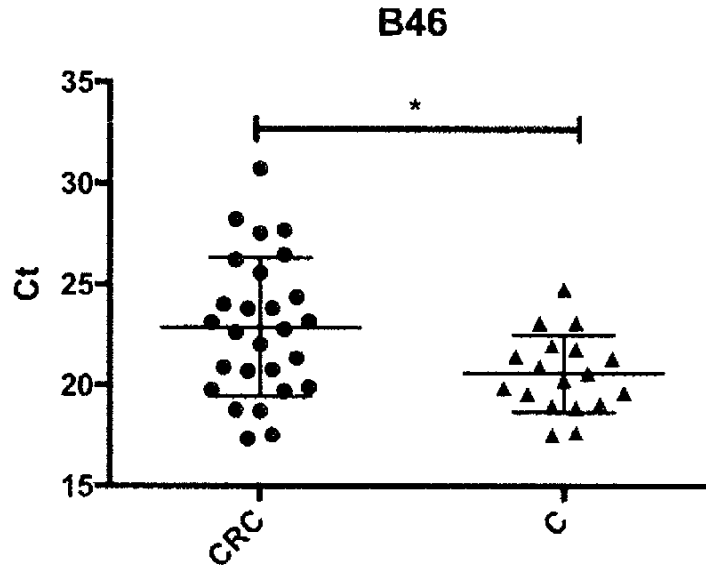
**Şekil 14.** CRC ve C gruplarındaki B3'ün Ct değeri.



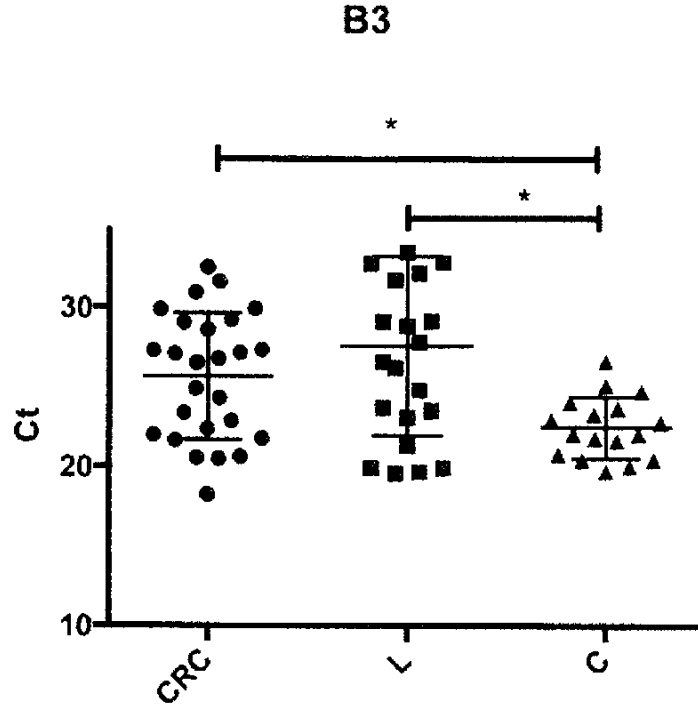
**Şekil 15.** CRC ve C gruplarındaki B48'in Ct değeri.



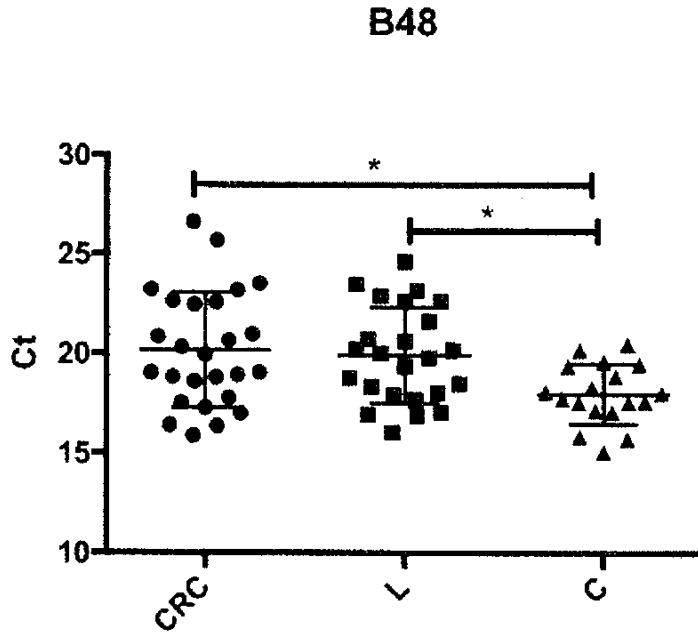
**Şekil 16.** CRC ve C gruplarındaki B10'un Ct değeri.



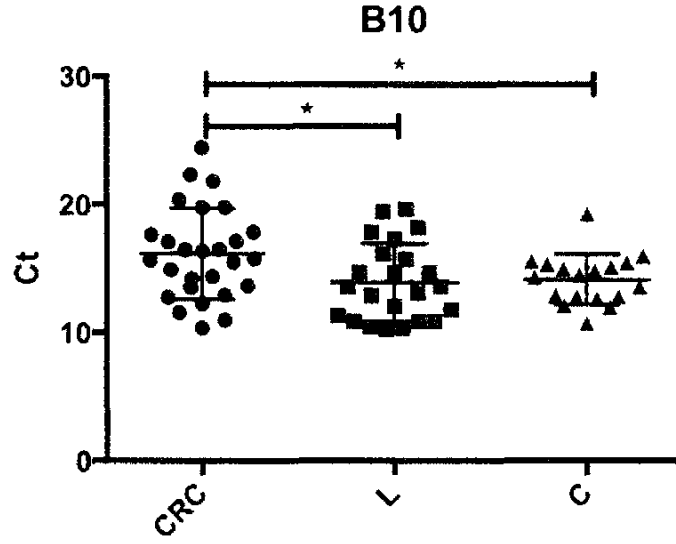
**Şekil 17.** CRC ve C gruplarındaki B46'nin Ct değeri.



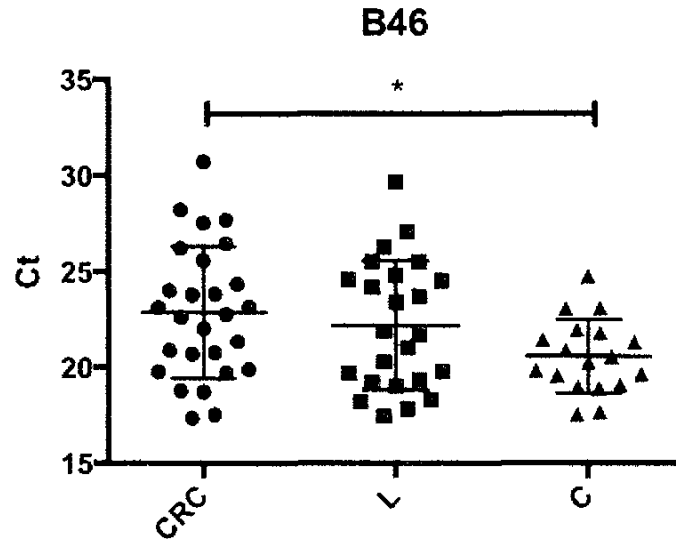
**Sekil 18.** CRC, L ve C gruplarındaki B3'ün Ct değeri.



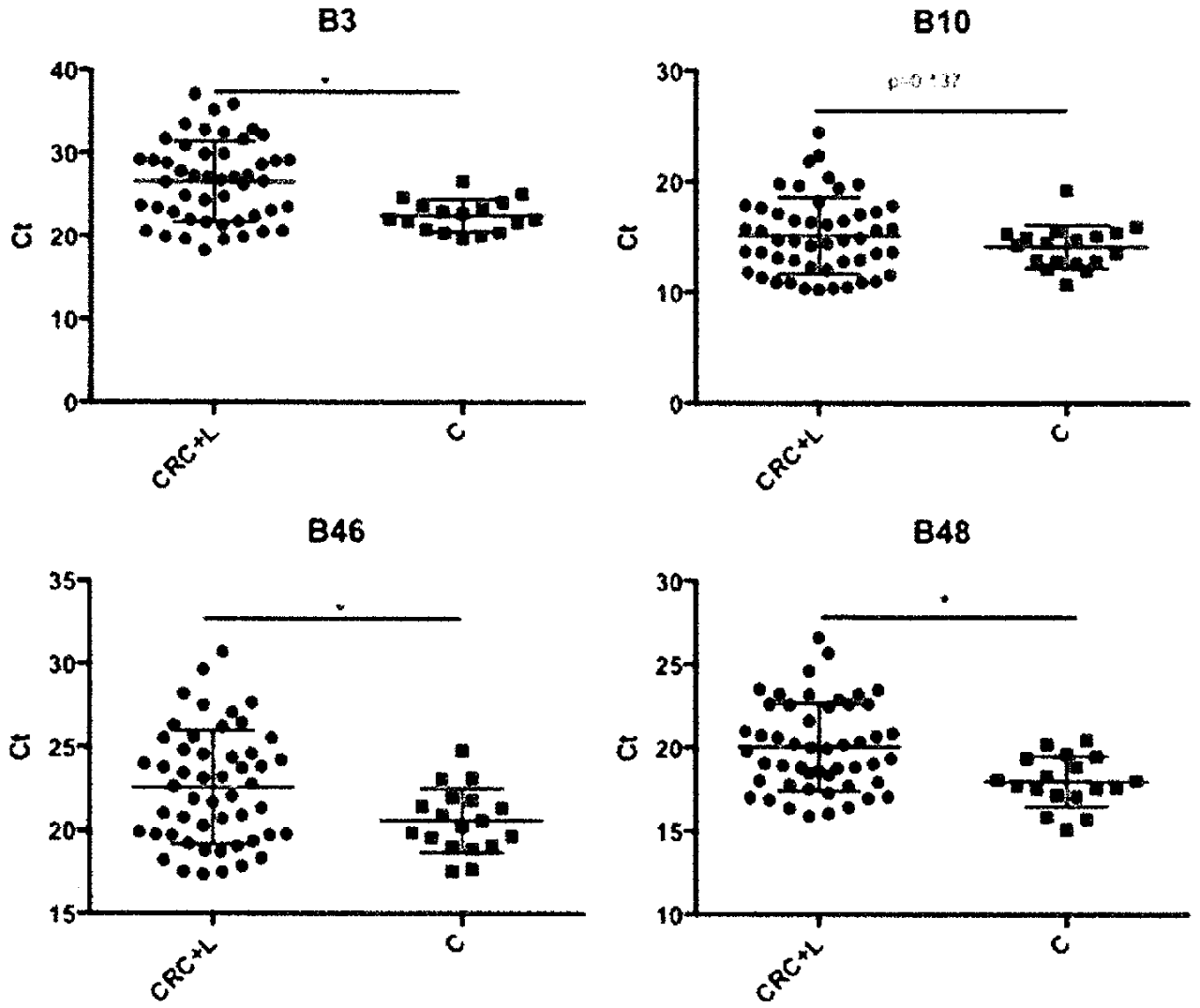
**Sekil 19.** CRC, L ve C gruplarındaki B48'in Ct değeri.



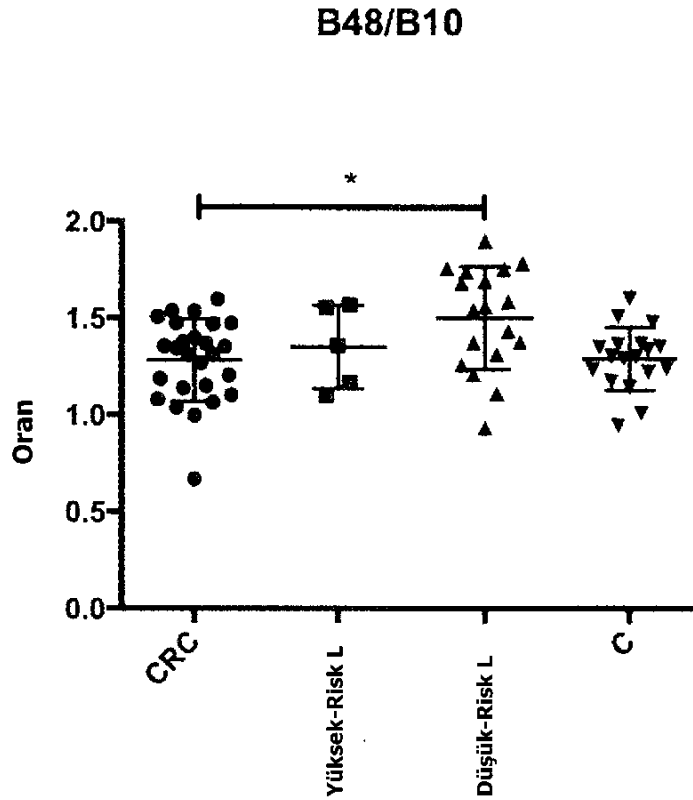
**Şekil 20.** CRC, L ve C gruplarındaki B10'un Ct değeri.



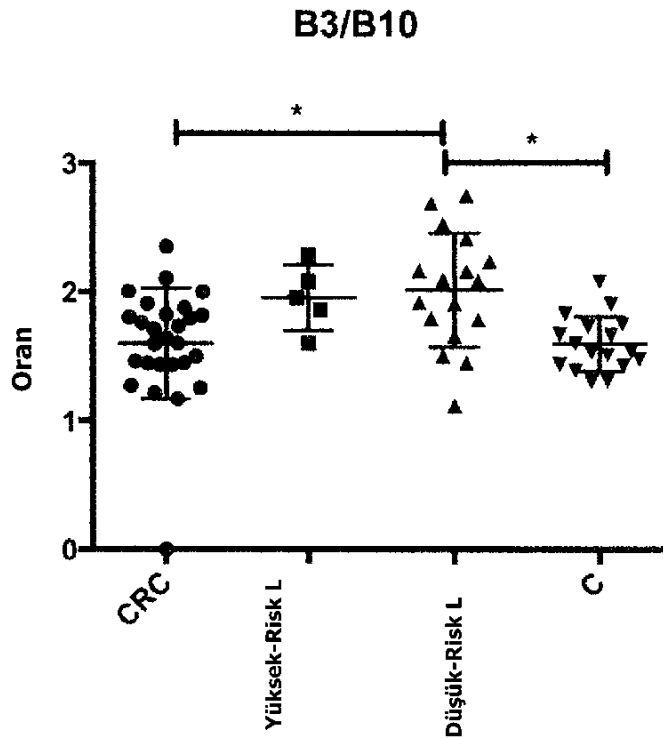
**Şekil 21.** CRC, L ve C gruplarındaki B46'nin Ct değeri.



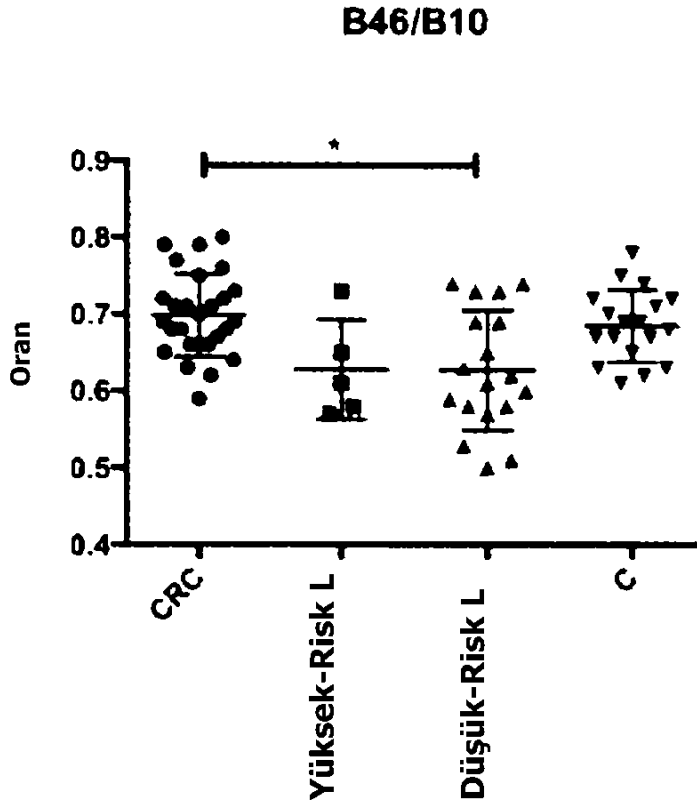
**Sekil 22:** CRC+L'ye karşı C'deki B3, B10, B46 ve B48'in Ct değeri



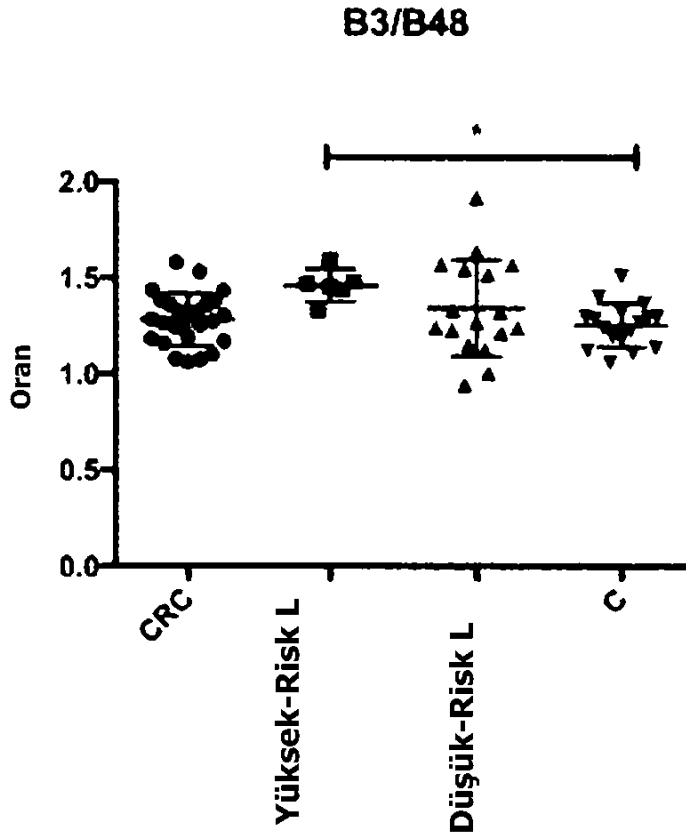
**Sekil 23.** CRC, Yüksek Risk L, Düşük Risk L ve C gruplarındaki B48/B10 oran değerleri.



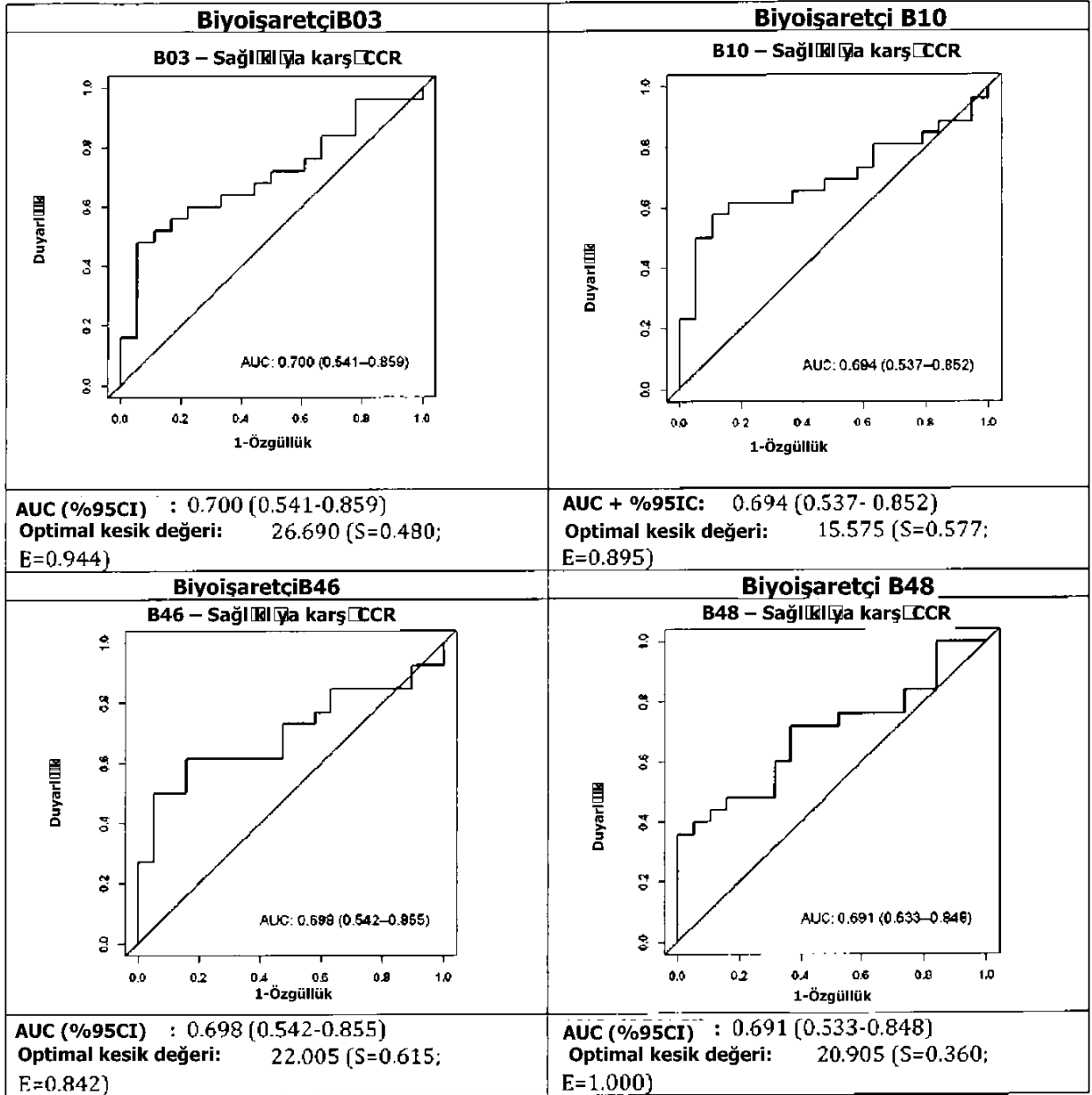
**Sekil 24.** CRC, Yüksek Risk L, Düşük Risk L ve C gruplarındaki B3/B10 oran değerleri.



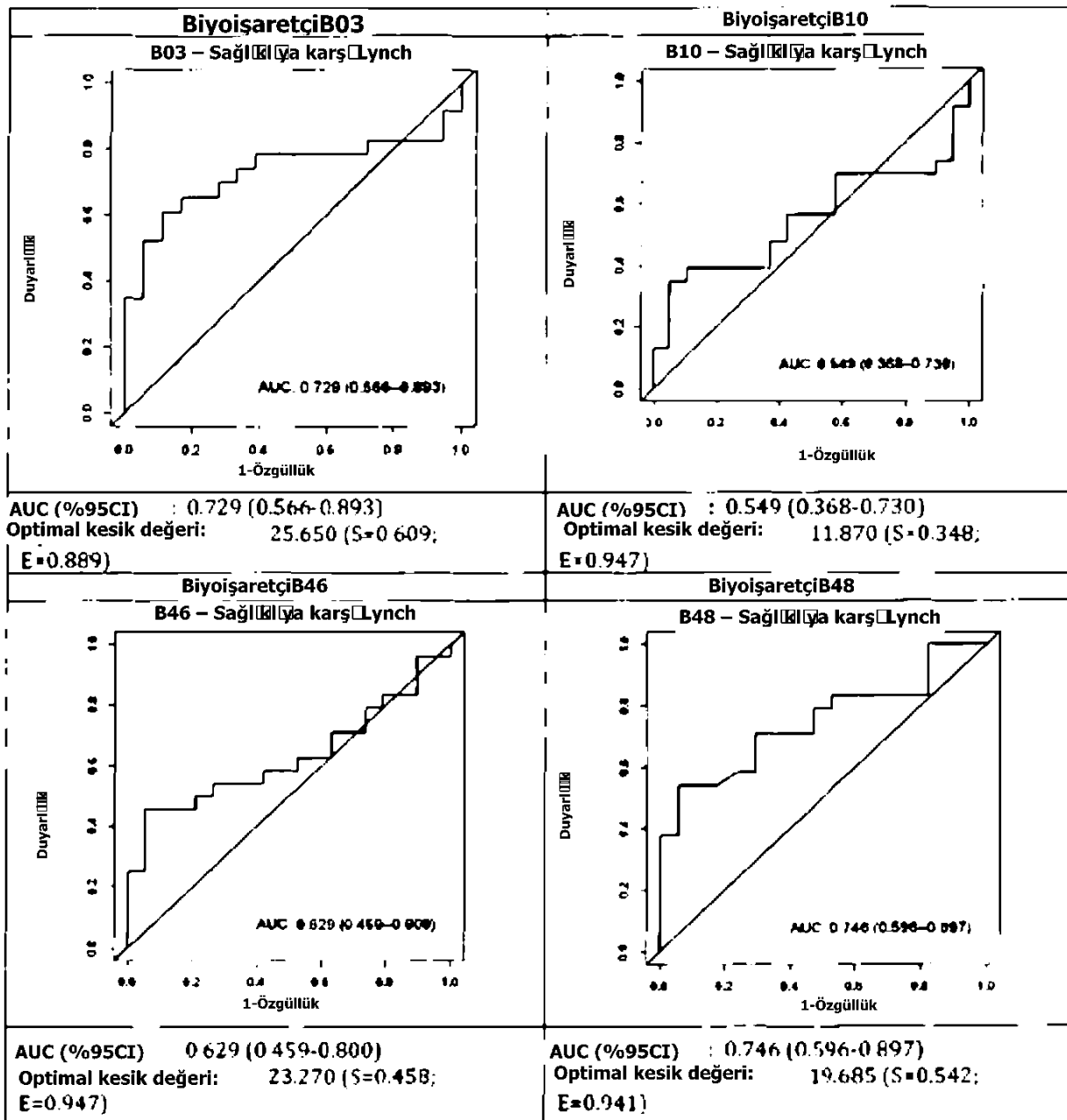
**Sekil 25.** CRC, Yüksek Risk L, Düşük Risk L ve C gruplarındaki B46/B10 oranı değeri.



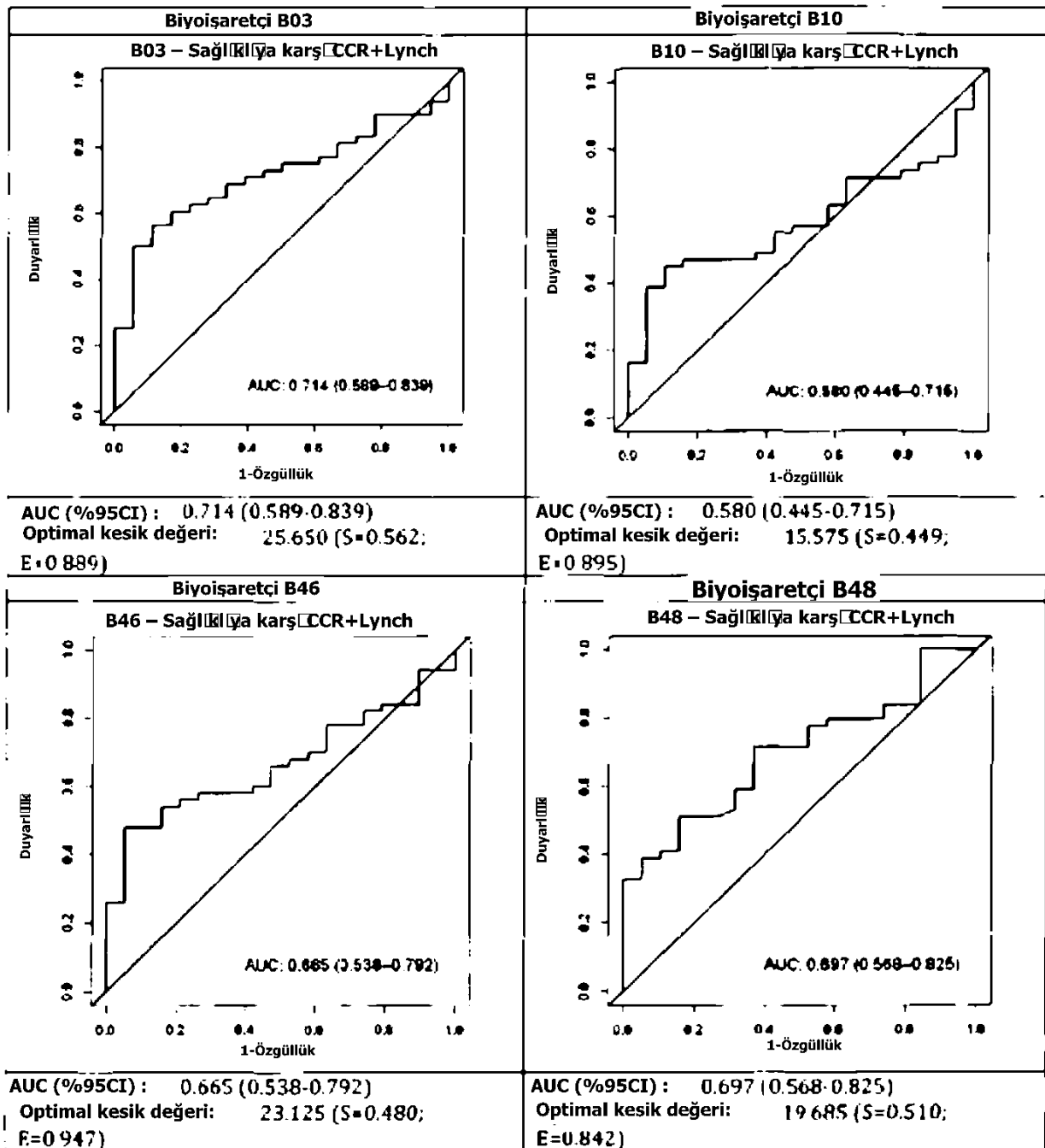
**Sekil 26.** CRC, Yüksek Risk L, Düşük Risk L ve C gruplarındaki B3/B48 oranı değeri.



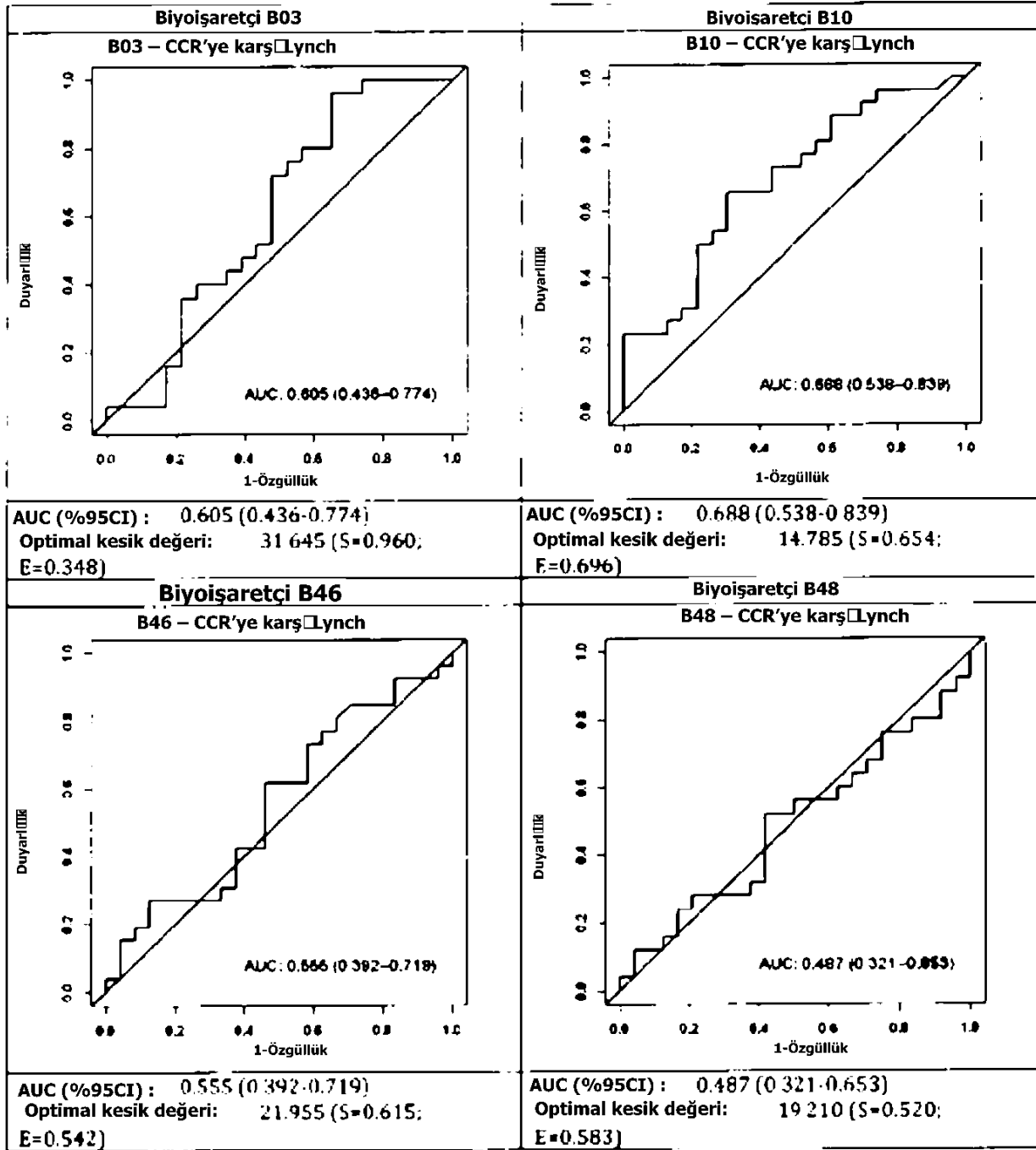
Şekil 27



Şekil 28



şekil 29



Şekil 30