



T.C.

**ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ATATÜRK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ KLİNİĞİ**

**BRUSELLOZUN TANISINDA KULLANILABİLECEK
GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON
YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Uzmanlık Tezi

Araş. Gör. Hasan ZEYBEK

Ankara, 2018



T.C.

**ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ATATÜRK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ KLİNİĞİ**

**BRUSELLOZUN TANISINDA KULLANILABİLECEK
GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON
YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Uzmanlık Tezi

Araş. Gör. Hasan ZEYBEK

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Rıza DURMAZ

Ankara, 2018

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini hoşgörü ile aktararak desteklerini esirgemeyen kıymetli hocalarım Prof. Dr. Z. Cibali AÇIKGÖZ, Prof. Dr. Esin AKTAŞ, Prof. Dr. Ahmet GÖDEK MERDAN'a;

Laboratuvar çalışmalarında bilgi, iş disiplini ve davranışları ile bana farklı bir deneyim kazandıran, tezimin hazırlanmasında ve yazılmasında desteğini gördüğüm, beraber çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Rıza DURMAZ'a;

Uzmanlık eğitimim süresinde iyi niyeti ve hoşgörüsü yanında akademik anlamda bana tecrübe kazandıran, yardımlarıyla her konuda destek veren Doç. Dr. Tuba DAL'a;

Tıbbi viroloji ve moleküler çalışmalarındaki deneyimleri, pratik düşünceleri ile bizlere yol gösteren Doç. Dr. Sibel AYDOĞAN'a;

Rutin mikrobiyoloji laboratuvarında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, bu meslekte yetişmemi sağlayan, aydınlatıcı fikirleri ve yaklaşımları ile örnek olan değerli uzmanlarımız; Uzm. Dr. Nevreste ÇELİKBİLEK, Uzm. Dr. Fisun KIRCA, Uzm. Dr. Birsen ÖZDEM ve Uzm. Dr. Nurhadiye KURU'ya;

İş yerinde birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, karşılıklı saygı ve anlayış içinde çalıştığım asistan ve teknisyen arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Hasan ZEYBEK

Ankara, 2018

ÖZET

Bruselloz; dünya genelinde çeşitli klinik bulgulara, rölapslara ve komplikasyonlara neden olabilen, morbiditesi yüksek, mortalitesi düşük bir zoonozdur. İnsanlarda brucella enfeksiyonunun gerçek insidansı tam olarak bilinmese de endemik bölgelerde insidansın $<0,01$ ile $>0,002$ arasında olduğu bildirilmektedir. Rutin laboratuvar tanı sıklıkla kültür ve seroloji ile konmaktadır. Ancak kültür yöntemlerinin duyarlılığı hastalığın evresine, *Brucella* türlerine, kültür ortamına ve kullanılan kan kültürü tekniğine göre değişkenlik gösterebilmektedir. Ayrıca rutinde daha sık kullanılan serolojik yöntemlerin de çapraz reaktif mikroorganizmalara karşı gelişen antikorlar sebebiyle özgüllüğü düşüktür. Konvansiyonel tanı testlerinde karşılaşılan bu olumsuzluklar nedeniyle Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) temelli yaklaşımlar tanıda önem kazanmıştır. Bu yöntemler brusellozun hızlı ve güvenilir teşhisinde iyi bir alternatiftir.

Bu çalışmada, brusellozun erken tanısında kullanılabilecek hızlı, özgün, duyarlı ve güvenilir bir mütipleks Gerçek Zamanlı PZR (mGz-PZR) yöntemi geliştirilmesi ve bu yöntemin konvansiyonel tanı testleri ile karşılaştırılması amaçlandı. mGz-PZR yönteminin en düşük saptama limiti (EDSL), 10^8 - 10^1 cfu/ml konsantrasyonda hazırlanan ve *Brucella melitensis* ATCC 23456 standart suşu içeren simüle serum ve tam kan örneklerinde araştırıldı. Bu örnekler öncelikle, Thermo ve Norgen DNA izolasyon kitleri ile ekstrakte edildi. Daha sonra Rotor-Gene (Corbett RG 6000, Australia) ve Bio-Rad (CFX-96 C1000 Touch Real-time system) cihazlarında, Maxima SYBR green, QuantiTect ve Ampliqon Tempase PZR master miksleri kullanılarak yöntemin EDSL'si belirlendi. Optimize edilen metodun validasyon çalışmaları yapıldıktan sonra yöntemin etkinliği, bruselloz şüpheli 57 hastaya ait serum örnekleri ve pozitif üreme sinyali veren 21 kan kültür şişesi üzerinde değerlendirildi.

Yöntemin EDSL'si; Maxima SYBR green 2x master miks ile çalışıldığında, her iki thermal cycler cihazında 10^4 cfu/ml bulundu. Daha düşük konsantrasyonlardaki DNA'yı saptamak için kullanılan prob bazlı QuantiTect ve Ampliqon Tempase master miksleri ile kurulan reaksiyonlarda 10^2 cfu/ml yoğunluktaki örneklerde amplifikasyon sağlandı. Optimize edilen metodun validasyonu Thermo DNA ekstraksiyon kit-Ampliqon master miks ile serum örneklerinde yapıldı. Validasyon çalışmalarında yöntemin doğruluk, tekrarlanabilirlik, özgüllük ve duyarlılık değerlerinin oldukça

yüksek olduğu belirlendi. Çalışmaya dahil edilen toplam 57 hastanın 33'ünün (%57,8) serum örneklerinde Gz-PZR ile pozitiflik saptandı. Kan kültürü mevcut olan 41 hastanın 21'inden *Brucella* spp. izole edildi ve bu 21 hastanın tamamının serum PZR'si *B. melitensis* varlığını gösterdi. İlaven; kan kültürü negatif olup serolojik testlerin en az birinde anlamlı pozitiflik (STAT $\geq 1/160$ ve/veya Coombs titre $\geq 1/320$) saptanan 20 hastanın -ki bu hastalar CDC laboratuvar tanı kriterlerine göre olası bruselloz kapsamındadırlar- 12'sinde serum PZR pozitifliği kaydedildi. Yöntemimiz gerek serum örnekleri gerekse tam kan veya diğer klinik örnekler ile kan kültür şişesinden bruselloz tanısında güvenle kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Bruselloz, *B. melitensis*, Moleküler tanı, Gerçek zamanlı PZR, Optimizasyon, Seroloji

ABSTRACT

Brucellosis; is a zoonosis with high morbidity and low-mortality which can cause various clinical findings, relapses and complications around the world. Although the true incidence of *Brucella* infection in humans is not exactly known, it is reported that the incidence is between <0.01 and >0.002 in endemic areas. Routine diagnosis of brucellosis is often performed by culture and serology. However, the sensitivity of culture methods may vary depending on the disease stage, *Brucella* species, culture medium and blood culture technique. In addition, the specificity of serological methods is low due to antibodies against cross-reactive microorganisms. Polymerase Chain Reaction (PCR) based approaches have gained importance to diagnose because of these adversities in conventional diagnostic tests. These methods are good alternative in the rapid and reliable diagnosis of human brucellosis.

In this study, we aimed to develop a rapid, specific, sensitive and reliable multiplex Real-time Polymerase Chain Reaction (mRt-PCR) method that can be used in the early diagnosis of brucellosis and to compare this method with conventional diagnostic tests. The lowest detection limit of the mRt-PCR method was investigated in simulated serum and whole blood samples containing *Brucella melitensis* ATCC 23456 standard strain with different concentration varying between 10^8 and 10^1 cfu / ml. These samples firstly were extracted with Thermo and Norgen DNA isolation kits. Then the lowest detection limit of the method was determined by using Maxima SYBR green, QuantiTect and Ampliqon Tempase PCR master mixes in Rotor-Gene (Corbett RG 6000, Australia) and Bio-Rad (CFX-96 C1000 Touch Real-time system) thermal cycler devices. Validation studies of the optimized method were performed, then the efficacy of the method was evaluated on 21 blood culture bottles with positive reproductive signal and 57 serum samples of brucellosis suspicious patients.

The lowest detection limit of the method was found 10^4 cfu / ml in both thermal cycler when the Maxima SYBR green 2x master mix was used. The amplification was provided at a concentration of 10^2 cfu / ml in the reactions that set up with the probe-based QuantiTect and Ampliqon Tempase master mixes. The validation studies of the optimized method was performed in serum samples with Thermo DNA extraction kit-Ampliqon master mix. It has been determined that the method showed high level accuracy, precision, specificity and sensitivity by performing the validation studies.

Positive mRt-PCR results were detected in 33 (57.8%) serum samples of 57 patients. Only the 41 patients had blood culture samples and *Brucella* spp. was isolated from 21 of them. Moreover, serum PCR results of all *Brucella* positive blood culture samples were positive as *Brucella melitensis*. Additionally; serum PCR positivity was recorded in 12 of 20 patients whose blood culture was negative and at least one of the serologic tests showed significant positive results (STAT $\geq 1 / 160$ and / or Coombs titer $\geq 1 / 320$). These patients are diagnosed as ‘‘presumptive case’’ according to the CDC laboratory criteria for diagnosis of brucellosis. Our method can be used safely in the diagnosis of brucellosis from both serum and whole blood samples or other clinical specimens and blood culture bottles.

Key Words: Brucellosis, *B. melitensis*, Molecular assay, Real-time PCR, Optimization, Serology

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Brucella</i> Türlerinin Genel Özellikleri	3
2.2. Tarihçe	3
2.3. Genetik Yapı	4
2.4. Patogenez	4
2.5. Epidemiyoloji ve Bulaş.....	5
2.6. Klinik Önemi	6
2.7. Tedavi.....	7
2.8. Brusellozun Tanısı	8
2.8.1. Kültür	8
2.8.2. Serolojik Testler	9
2.8.2.1. Rose-Bengal Testi	9
2.8.2.2. Standart Tüp Aglütinasyon Testi	10
2.8.2.3. Coombs Testi	10

2.8.2.4. 2-Merkaptoetanol Testi	11
2.8.2.5. ELISA	12
2.8.3. Moleküler Tanı Yöntemleri	12
2.8.3.1. Moleküler Testlerde Hatalı Negatif Sonuç Alınması	12
2.8.3.1.1. Klinik Örneklerden Kaynaklanan Sorunlar	13
2.8.3.1.2. Hedef Molekülün İzolasyonu ve Saflaştırılmasından Kaynaklanan Sorunlar.....	14
2.8.3.1.3. Amplifikasyon Aşamasından Kaynaklanan Sorunlar	14
2.8.3.2. Moleküler Testlerde Hatalı Pozitif Sonuç Alınması.....	14
2.8.3.3. Amplifikasyonu Etkileyen Parametreler ve Koşulların Standardizasyonu	15
2.9. Moleküler Tanıda Kullanılan Testlerin Validasyonu	17
2.9.1. Tanımlar.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Gerekli Materyaller	21
3.1.1. Sarf Malzemeler.....	21
3.1.1.1. DNA İzolasyon Kitleri	21
3.1.1.2. PZR Master Miksleri.....	21
3.1.1.3. Primerler.....	21
3.1.1.4. Konvansiyonel Tanı için Gerekli Malzemeler.....	21
3.1.2. Cihazlar	22
3.2. Gz-PZR Yönteminin Optimizasyon Çalışmaları	22

3.2.1. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması ve Sulandırılması	22
3.2.2. DNA İzolasyonu	23
3.2.2.1. Thermo scientific GeneJet Whole Blood genomic DNA pürifikasyon kit protokolü.....	23
3.2.2.2. Norgen Biotek Blood DNA isolation kit protokolü.....	24
3.2.3. Farklı Amplifikasyon Mikslerinin Saptayabileceği En Düşük DNA Konsantrasyonun Araştırılması	25
3.2.3.1. Maxima SYBR Green Master miks Kullanılarak Yapılan Optimizasyon Çalışmaları.....	27
3.2.3.2. Ampliqon TEMPASE Multiplex 2x PCR Master miks Kullanılarak Yapılan Optimizasyon Çalışmaları	28
3.2.3.3. QuantiTect multiplex 2x PCR master miks Kullanılarak Yapılan Optimizasyon Çalışmaları	29
3.3. mGz-PZR Yöntemi için Validasyon Çalışmaları.....	30
3.3.1. Validasyonu Yapılan mGz-PZR Yönteminin Etkinlik Çalışmaları	32
3.3.1.1. Hasta Örneklerinin Toplanması	32
3.3.1.2. Konvansiyonel Yöntemler	33
3.3.1.2.1. Kültür	33
3.3.1.2.2. Serolojik Testler	33
3.3.1.3. <i>Brucella</i> Üremesi Olan Kan Kültür Şişeleri	35
3.4. Sonuçların Analizi ve İstatistik	35
4. BULGULAR.....	37
4.1. Gz-PZR yönteminin optimizasyon işlemlerine ait sonuçlar	37

4.1.1. Farklı amplifikasyon master miksleri ile yapılan çalışmalar	37
4.1.1.1. Maxima SYBR Green Master Miks kullanılarak yapılan	
Gz-PZR Sonuçları.....	37
4.1.1.2. Prob temelli Master Miksler ile yapılan mGz-PZR	
Sonuçları	43
4.2. Prob Temelli mGz-PZR Yönteminin Validasyon Çalışmaları	53
4.2.1. Duyarlılık ve Özgüllük kriterlerinin validasyonu	54
4.2.2. Doğruluk ve Kesinlik Kriterlerinin Belirlenmesi.....	56
4.3. Valide Edilen Yöntemin Bruselloz Şüpheli Hasta Örneklerindeki	
Etkinliğinin Değerlendirilmesi	57
4.3.1. Seroloji ve Kan Kültürü Pozitifliği Saptanan Hastalar	58
4.3.2. Hasta örnekleri üzerinde çalışılan mGz-PZR sonuçları.....	58
4.3.3. Üreme sinyali veren Kan Kültür şişeleri üzerinde yapılan mGz-PZR	
sonuçları.....	61
5. TARTIŞMA.....	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	73
7. KAYNAKLAR	75
8. EKLER	87
EK-1. ETİK KURUL ONAYI	87
EK-2. ÖZGEÇMİŞ.....	88

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATCC	American Type Culture Collection
Ct	Cycling Threshold
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
dNTP	Deoksi Nükleotit Trifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EDSL	En Düşük Saptama Limiti
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FP	Forward Primer
GMP	Good Manufacturing Practices
Gz-PZR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
H₂S	Hidrojen Sülfür
ISO	International Organization for Standardization
IEC	International Electrotechnical Commission
KCI	Potasyum Klorür
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
LPS	Lipopolisakkarit
S-LPS	Smooth- Lipopolisakkarit
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
2-ME	2-Merkapto Etanol
mGz-PZR	Multipleks Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
NA	Nükleik Asit
ORF	Open Reading Frame
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PSR	Polymerase Spiral Reaction
RBT	Rose-Bengal Testi
RES	Retiküloendotelial Sistem
RP	Reverse Primer
STAT	Standart Tüp Aglütinasyon Testi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SF	Serum Fizyolojik
THSK	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu

T_M	Melt Temperature
TMP-SMZ	Trimetoprim-Sulfametoksazol
US EPA	United States Environmental Protection Agency
US FDA	United States Food and Drug Administration



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1. Tekrarlanabilir ölçüm sonuçları şematize edilmesi	19
Şekil 2. Rotor-gene, Corbett RG 6000 Thermal cyclers cihazında; Serumda Maxima SYBR Green 2x Master Mix ile yapılan monopleks Gz-PZR sonuçları.....	38
Şekil 3. Maxima SYBR Green 2x Master Mix ile monopleks uygulanan Gz-PZR Erime eğrisi analizi sonuçları.	38
Şekil 4. Tam kanda Maxima SYBR Green 2x Master Mix ile kurulan monopleks Gz-PZR sonuçları	39
Şekil 5. Maxima SYBR Green 2x Master Mix ile monopleks uygulanan Gz-PZR erime eğrisi analizi sonuçları	40
Şekil 6. BIO-RAD, CFX-96 C1000 cihazında tam kanda Maxima SYBR Green 2x Master Mix ile monopleks kurulmuş Gz-PZR sonuçları	41
Şekil 7. BIO-RAD, CFX-96 C1000 cihazında Maxima SYBR Green 2x Master Mix ile monopleks kurulmuş erime eğrisi analizi sonuçları	41
Şekil 8. Rotor gene Corbett RG 6000 ve Bio-rad CFX-96 C1000 cihazlarında, tam kan ve serum örnekleri ile Maxima SYBR Green 2x Master Mix kullanarak yapılan Gz-PZR sonuçları.....	42
Şekil 9. Ampliqon Tempase 2x master mix ile Rotor gene Corbett RG 6000 cihazında kurulan mGz-PZR sonuçları.....	44
Şekil 10. Ampliqon Tempase 2x master mix ile Rotor gene Corbett RG 6000 cihazında kurulan mGz-PZR sonuçları.....	45
Şekil 11. BIO-RAD cihazında; Tam kanda Ampliqon master mix ile çalışılan mGz-PZR sonuçları	46
Şekil 12. BIO-RAD cihazında; Serumda Ampliqon master mix ile çalışılan mGz-PZR sonuçları	47
Şekil 13. 3 ayrı reaksiyonda gerçekleştirilen Amplifikasyon grafikleri	48
Şekil 14. Thermo DNA izolasyon kiti ve farklı master mixler ile kurulan reaksiyonlarda C _T değerlerinin grafiksel dağılımı	50
Şekil 15. Ampliqon ve Quantitect 2x Master mixler ile gerçekleştirilen mGz-PZR sonuçları.....	52
Şekil 16. 10 yüksek pozitif, 10 düşük pozitif örnekler ile kaydedilen mGz-PZR sonuçları.....	54

Şekil 17. Özgüllük kriterinin değerlendirilmesinde; Thermo ekstraksiyon kiti ve Ampliqon Master miks kullanarak yapılan mGz-PZR sonuçları.....	55
Şekil 18. PZR pozitif bulunan 24 hastanın amplifikasyon grafiği	59
Şekil 19. mGz-PZR pozitifliği ve serolojik testlerin grafiksel dağılımı.....	60



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1. Laboratuvarıarda Geliştirilmiş NA Saptayan Testlerin Asgari Değerlendirme Kriterleri.....	18
Tablo 2. <i>Brucella</i> spp., <i>B. melitensis</i> ve GAPDH'in Saptaması için Oligonükleotid Primer ve Problar	26
Tablo 3. CE Onaysız Laboratuvar yapımı NA Saptayan Kalitatif Modifiye Testlerde Validasyon Parametreleri	31
Tablo 4. Thermo Scientific DNA İzolasyon Kit Kullanılarak Yapılan 10 Ayrı mGz-PZR Sonuçları.....	50
Tablo 5. Norgen Biotek DNA İzolasyon Kit Kullanılarak Yapılan 10 Ayrı mGz-PZR Sonuçları.....	53
Tablo 6. Yöntemimizin Validasyon Sonuçları.....	57
Tablo 7. Çalışmaya Dahil Edilen 57 Klinik Örneğin Kan Kültürü ve Serolojik Test Sonuçları.....	58
Tablo 8. mGz-PZR ile Konvansiyonel Tanı Testlerinin Karşılaştırılması.....	60

1-GİRİŞ VE AMAÇ

Bruselloz; dünya genelinde enfekte hayvanlardan insanlara sıklıkla doğrudan temas, kontamine olmuş süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi ve enfekte damlacıkların inhalasyonu ile bulaşabilen zoonotik bir enfeksiyon hastalığıdır (1-3). Ülkemizde brusella enfeksiyonu halen güncel bir halk sağlığı sorunudur. Hayvancılığın yaygın olduğu, çiğ süt ve süt ürünleri tüketiminin sık olduğu bölgelerde endemik olabilmektedir. Bruselloz; çeşitli klinik komplikasyonlara ve rölapslara neden olabilen, morbiditesi yüksek, mortalitesi düşük bir zoonozdur (4,5). İnsanlarda brusella enfeksiyonunun gerçek insidansı tam olarak bilinmese de endemik bölgelerde insidansın <0.01 ile >0.002 arasında olduğu bildirilmektedir. Ülkemizde yapılan araştırmalarda bruselloza ait seropozitiflik oranı, normal popülasyonda %1,8 iken riskli gruplarda %6 olarak saptanmıştır (6,7). Hastalık en sık Güneydoğu Anadolu Bölgesi (%49,2), Doğu Anadolu Bölgesi (%21,7), İç Anadolu Bölgesi (%19,9) ve Ege Bölgesi'nde (%5) görülmektedir (4). Hastalık tipik olarak cinsiyet ayırımı yapmadan genç ve orta yaşlı erişkinleri tutmakta olup, çocuk ve yaşlılarda insidansı daha düşüktür (4).

Brusellozun tanısında rutin laboratuvarlarda sıklıkla kültür ve serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Kültür tanıda altın standart olarak kabul edilmektedir (8). Bakterinin kan, kemik iliği veya diğer enfekte dokulardan üretilmesi kesin tanı koydurucu olsa da mikroorganizmanın in vitro şartlarda zor ve yavaş üremesi nedeniyle tanıda zorluklar yaşanmaktadır (9). Günümüzde *Brucella* türü bakterilerin üretilmesi için otomatize kan kültür sistemleri kullanılmaktadır. Bu sistemlerde pozitif üreme sinyali alınması için geçen süre; kan ve diğer klinik örnekler için iki ile yedi gün arasında değişmektedir (10).

Rutin uygulamalarda sıklıkla serolojik yöntemlerden Rose-Bengal testi (RBT) tarama testi olarak kullanılır ve ardından serumda brusella antikorlarının tespiti ve titrasyonu için standart tüp aglütinasyon testi (Wright Testi, STAT) uygulanır. STAT'da titrenin 1/160 ve üzerinde olması klinik olarak anlamlı kabul edilir (11). Ancak bu yöntemlerin zaman alıcı ve özgüllüğünün düşük olması nedeniyle tanıda moleküler yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Moleküler yöntemlerden ise doğrudan klinik örneklerde *Brucella* türlerinin saptanmasında konvansiyonel Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Gz-PZR) testleri denenmiştir. Bu yöntemlerde BCSP31 (31-kDa'luk hücre yüzey proteinini kodlar),

BP26 (26-kDa'luk periplazmik proteini kodlar), 16S rRNA ve insertion sequence IS711 gibi, *Brucella* türlerine spesifik gen bölgeleri hedeflenmektedir (12-15). Moleküler tanıya yönelik çalışmalarda da örneğin türüne, DNA izolasyon protokolüne, amplifikasyon yöntemine ve amplifikasyon koşullarına bağlı olarak farklı sonuçlar gözlenmektedir ki bu durum bruselloz tanısında standardize bir moleküler yöntemin gerekliliğini ortaya koymaktadır (16).

Çalışmanın Amaç ve Hedefleri

Sunduğumuz tezin amacı; brusellozun erken tanısında kullanılabilecek hızlı, özgün, duyarlı ve güvenilir bir moleküler yöntem geliştirerek hastalığın prognozunun izlenmesine ve brusellozlu hastaların tedavisine katkıda bulunmaktır.

Hedefler;

1. Brusellozun moleküler tanısı için kullanılabilecek uygun moleküler yöntemin araştırılması ve en düşük saptama limitinin belirlenmesi,
2. Brusellozun moleküler tanısı için uygun gördüğümüz yöntemin doğruluk, kesinlik (tekrarlanabilirlik), duyarlılık ve özgüllük gibi performans göstergelerinin saptanarak validasyon çalışmalarının yapılması,
3. Validasyon işlemlerinin tamamlanmasının ardından yöntemin bruselloz tanısındaki etkinliğinin konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırılarak erken ve doğru tanı için değerinin araştırılması,
4. Yöntemin, pozitif sinyal veren kültür şişelerinde, mikroskopi ve kültüre gereksinimi ortadan kaldırma potansiyelinin araştırılması,
5. Yöntemin ülkemizde bruselloza yol açan türleri ayırt etmedeki etkinliğinin araştırılmasıdır.

2- GENEL BİLGİLER

2.1. *Brucella* Türlerinin Genel Özellikleri

Brucella türleri, Proteobakterilerin alfa-2 alt sınıfında yer almaktadır. Bu sınıfta ayrıca memelilerde hastalık oluşturan *Ochrobactrum* ve *Bartonella* gibi bakteriler de yer alır (17).

Brucella; aerobik, hareketsiz, kapsülsüz 0,5x0,6-1,5 mikrometre boyutunda oldukça küçük, hücre içi gram negatif kokobasil morfolojisinde bir bakteridir. 37 °C’de (10-40 °C), pH:6.6-7.4’de optimal olarak çoğalır. Kültürde yavaş ürer (yaklaşık 5-7 gün) (18). Katalazı pozitif olup, oksidaz ve üreaz pozitifliği değişkendir. Sıklıkla aerobik ortamlarda ürer, bazı kökenler artmış karbondioksitli ortamı yeğler. Bu cins içinde yer alan mikroorganizmalar; 60 °C sıcaklıkta 10 dakikada, %0,1 fenol çözeltisinde 15 dakikada tahrip olur. Hayvan barınaklarındaki tozlarda altı hafta, suda on hafta, düşük materyalinde 75 gün, çiğ süttten yapılmış tuzsuz krema yağında 142 gün, %10 tuz içeren salamura peynirde 45 gün, %17 tuz içeren salamura peynirde bir ay yaşar (19,20). Bruselloz hayvanlarda yaşam boyu enfeksiyonlara neden olabilen, düşük, sterilite ve mastite yol açabilen bir zoonozdur. *Brucella* türlerinden, *B. melitensis* koyun ve keçilerde; *B. abortus* daha çok sığırlarda; *B. canis* köpeklerde; *B. ovis* koyunlarda; *B. suis* domuzlarda; *B. neomatae* ratlarda enfeksiyon yapar (21,22,23).

2.2. Tarihçe

Bakteriyi ilk kez izole eden ve tanımlayan İngiliz ordusunda görevli hekim Sir David Bruce’dur. Dr. David Bruce 1886 ve 1887’de Malta adasında çalışmalar yaparken, Malta ateşinden etkilenen hastaların dalaklarından ilk kez *Brucella* bakterisini izole etmiş ve daha sonra bu mikroorganizmayı 1895’de *Micrococcus melitensis* olarak adlandırmıştır. Hastalığın klinik belirtileri, salgın yaptığı bölgelere göre (Ondülan ateş, Malta humması, Girit humması, Akdeniz dalgalı humması) değişik adlarla anılmıştır. Meyer ve Shaw, Malta ateşi ve Bang hastalığındaki ajanları da kapsayan organizmaların her ikisi için sırasıyla *B. melitensis*, *B. abortus* isimlerini önermiştir (18,24).

2.3. Genetik Yapısı

Çoğu *Brucella* türü, yaklaşık 2,1 ve 1,2 Mbp'lik, iki halkasal kromozoma sahiptirler. Kromozomdaki G+C içeriği %57'dir. Daha büyük olan kromozom I'in aksine, daha küçük olan kromozom II, bir replikasyon orjinine ve bir megaplazmidten köken aldığı öne sürülen genetik içeriğe sahiptir. *Brucella*'nın kromozom I'i yaklaşık 2,100-2,200 açık okuma bölgesi (ORF) ve kromozom II'si tahminen 1,100-1,200 açık okuma bölgesine sahiptir (24). Çalışmalarda *B. melitensis*'e ait 3,200 ORF bölgesinin hastalığın patogeneğinde rol oynadığı ve konak tropizmini sağladığı saptanmıştır (17,24).

2.4. Patogenez

Brucella bakterisi giriş kapıları olan gastrointestinal sistem, deri veya solunum yolu ile alındıktan sonra, bir süre belli sayıda kalır, daha sonra gittiği organlarda ve bölgesel lenf bezlerinde (mezenterik, servikal, aksiller, supraklaviküler) üreyerek bruselloz hastalığının meydana gelmesine neden olur. Bölgesel lenf bezlerinde üreyen bakteri hematojen yolla retikulo endotelyal sisteme (RES) ve tüm vücuda yayılır. Bakteri; karaciğer, dalak, kemik iliği, böbrek, endokard, merkezi sinir sistemi ve genital organlara yerleşebilir (23). Fakültatif intrasellüler bir bakteri olan *Brucella*, fagositik hücreler içerisinde çoğalır ve uzun süre canlı kalabilir. Brusellozun klinik semptomlarının süresinin uzaması, fokal komplikasyonların gelişmesi ve rölaps olgularının ortaya çıkmasında bu durumun rol oynadığı düşünülmektedir (25,26,27).

Bakterinin doku makrofajları ve monositler tarafından fagosite edilmesi durumunda fagolizozom içerisindeki asit mikroorganizmanın hücre içi çoğalmasını kolaylaştıran genlerini aktive eder. Fagozom matürasyonunun başlangıcında eğer asidifikasyon inhibe edilirse bakteri ölmektedir (28,29). Normalde fagositoz yapabilen hücreler fagosite ettikleri bakterilerin çoğunu aynı zamanda öldürmektedir. Hücre içi öldürme mekanizmasından kaçmayı başaran bakteri makrofajlarda fagozom- lizozom füzyonunu engeller. Bakteri nötrofillerde antioksidan savunma sistemlerinden miyeloperoksidaz-hidrojen peroksit enzim sistemini inhibe eder. Sonuç olarak oksidatif hasara karşı kendini korumak için katalaz ve süperoksit dismutaz enzimleri ile hidrojen peroksit ve süperoksiti inaktive edip fagositik hücreler içinde canlılığını sürdürebilir, çoğalabilir. Hastalığın karakteristik histopatolojik görünümü; karaciğer, dalak ve kemik

iliğinde epiteloid hücreler, plazma hücreleri ve mononükleer hücrelerin oluşturduğu granülomlar şeklindedir (30).

Brucella türlerinin majör virülans faktörü S-LPS'dir (18,24). Koloni morfolojisi, hücre duvarının lipopolisakkarid (LPS) tabakasında yer alan O antijenine göre değişmekle birlikte düzgün (saydam, homojen) veya opak, granüllü olabilmektedir. S koloni (smooth koloni) formunda olan türler ile R (rough) koloni oluşturan türler arasında hücre duvarının LPS tabakasındaki O polisakkarit yapısında farklılıklar mevcuttur. R koloni oluşturan *Brucella* türleri daha az virulan olup bu durum O polisakkaridinin önemli bir virülans faktörü olduğunun göstergesidir. S-LPS taşımayan türler; *B. canis* ve *B. ovis*'tir; bu iki tür bu nedenle düşük virülansa sahiptirler. *B. melitensis* en virulan türdür. Dokulara invazyonu diğer türlere göre yüksek olan *B. suis* fokal nekroza ve süpürasyonlara neden olmaktadır (17,18,24,30).

Brucella enfeksiyonlarında hem humoral hem de hücresel immünite etkindir (31). Bruselloz vakalarında bakterinin majör *Brucella* antijeni S-LPS'ye karşı gelişen antikorların humoral immüniteden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Brusellozda oluşan antikorlar IgM, IgG ve IgA tipindedir. (18,24). Enfeksiyonun akut evresinde IgM sınıfı antikorlar meydana gelir ve ilk haftada saptanırlar. İkinci haftadan sonra ise IgG artar ve tedavi edilmeyen olgularda en az bir yıl süreyle yüksek kalır. Tedaviye cevap veren hastalarda ise tedavi başlangıcından itibaren altıncı aya doğru kaybolurlar. Aktif bir enfeksiyon olmamasına rağmen IgM'ler bazen aylar ya da yıllarca serumda saptanabilir. (23,24,32). Bu nedenle tedaviye yanıtta IgG antikorlarının titresindeki düşüşün izlenmesi klinik olarak daha anlamlıdır. Nüks eden olgularda ise antikor titreleri yeniden artış gösterir veya uzun süre serumda saptanabilir düzeyde devam eder. IgM antikor seviyeleri, akut hastalığın ilk haftasında yükselir, 3 ayda zirveye ulaşır ve kronik hastalık süresince aynı düzeyde tespit edilebilir. Uygun antibiyotik tedavisi olsa bile nadir bazı vakalarda IgM düzeyleri 2 yıla kadar yüksek seyredebilir. IgG antikor seviyeleri, akut hastalığın başlangıcından yaklaşık 3 hafta sonra yükselmeye başlar, 6-8. haftada pik yapar ve kronik hastalık süresince yüksek kalır. IgA seviyeleri IgG seviyelerine paraleldir (32).

2.5. Epidemiyoloji ve Bulaş

Brucella evcil ve yabani hayvanlarda da enfeksiyonlara neden olabilmesi nedeniyle dünyada oldukça yaygındır. Bruselloz; Ortadoğu, Akdeniz, Güneydoğu

Avrupa, Asya, Latin Amerika, Afrika ve Karayipler’de yüksek düzeyde endemiktir (33). Dünya genelinde her yıl 500.000’in üzerinde yeni olgu rapor edilmektedir (23,34-36). Bulaş sıklıkla cilt, konjonktiva, gastrointestinal sistem ve inhalasyonla olmaktadır. Veteriner, mezbaha işçisi ve hayvancılıkla uğraşanlarda cilt, inhalasyon ve konjunktival bulaş sık görülmektedir. Çiğ süttten yapılan peynirler ve diğer süt ürünlerinin tüketilmesi ile bulaş geniş kitleleri etkilemektedir. Bunun dışında laboratuvar kontaminasyonu ve kan transfüzyonu ile de bulaş rapor edilmiştir (23,37). Çiğ et yeme alışkanlığı olan bölgelerde et ile geçiş de mümkün olabilmektedir. İnsandan insana geçiş çok nadir olmakla birlikte literatürde kan transfüzyonu ve kemik iliği transplantasyonu ile geçiş bildirilmiştir (37).

Hastalık ülkemizde özellikle Ankara ovası, Konya, Doğu ve Güney Doğu Anadolu bölgesinde yaygındır (5,10,38). *B. abortus* geniş bir coğrafik yayılım göstermesine rağmen, *B. melitensis* ülkemiz de dahil olmak üzere insanda en çok hastalık olgusuna sebep olan etkindir. Sığır brusellozu, koyun ve keçi brusellozuna göre daha iyi kontrol edilmektedir. Bakteri hayvanlarda insanda olduğunun aksine, metabolizmasında glukozu tercih ettiği şeker olan eritriol’den zengin dokulara yerleşme eğilimindedir. Bu yüzden hayvanlarda meme, uterus, plasenta, epididim gibi dokulara yerleşip kısırılık, düşük ve yaşam boyu devam eden asemptomatik taşıyıcılığa neden olabilir (18,21,24).

Bruselloz, besin hijyeni (özellikle süt ve süt ürünlerinin pastörize edilmeden tüketilmesi) ve sanitasyonun iyi olmadığı ülkelerde her kesimi, özellikle de çocuk yaş grubundaki popülasyonu etkilemesinden dolayı geniş kitleler için de risk teşkil eden bir enfeksiyon hastalığı haline gelmiştir (5,9).

2.6. Klinik Önemi

Brusellozun inkübasyon süresi 1-3 hafta olup semptomlar genellikle nonspesifiktir (23). Öncelikle hastanın ayrıntılı anamnezi alınmalı, ailede benzer semptomlu bireylerin olup olmadığı, kişinin hayvancılıkla uğraşıp uğraşmadığı, pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleri tüketme öyküsü mutlaka sorgulanmalıdır. Hastalığın seyri etken mikroorganizmaya bağlı olarak değişmektedir. Sıklıkla ateş yüksekliği, halsizlik, terleme, kas ve eklem ağrısı, kilo kaybı gibi yakınmalar vardır. Hastaların tamamına yakınında ateş mevcuttur (36,39). Ateş yavaş yavaş artış göstererek en yüksek seviyeye ulaşır, ardından aynı şekilde azalır (dalgalı ateş) (18).

Özellikle çocukluk çağı bruselloz olgularında %25'lere varan eklem yakınmaları gözlenebilmektedir (35,40). Hepatosplenomegali, lenfadenopati, artrit, anemi, lökopeni, trombositopeni en sık rastlanan klinik ve laboratuvar bulgularıdır. Özellikle hayvancılıkla uğraşan erişkinlerde, bruselloz subklinik seyredebilmektedir. Bu olgular asemptomatik olup düşük titrede serolojik test pozitifliği ve kültür negatifliği ile birlikte (7,40). *Brucella* enfeksiyonları akut, subakut, lokalize, kronik enfeksiyon şeklinde gözlenebilir. Tanı sıklıkla hastalığın kliniği de göz önüne alınarak, serolojik testler ve kültür ile konur. Bruselloz olgularının bir kısmında tedaviye rağmen rölaps gözlenebilir (23,24,41). Ülkemizde yapılan farklı çalışmalarda rölaps oranları %6-11 olarak belirlenmiştir (33). Rölapsın nedeni sıklıkla kısa süreli ve uygun olmayan dozlarda antibiyotik tedavisi, hastaların ilaç uyumunun iyi olmaması veya antibiyotik direncinden kaynaklanmaktadır (33,42,43).

2.7. Tedavi

Brucella enfeksiyonlarında etken mikroorganizmanın intraselüler olması nedeniyle tedavide kullanılacak antibiyotikler hücre içine iyi penetre olmalıdır. Ayrıca bakterinin fagolizozomu asidik bir ortam olduğundan, tedavide intraselüler etkinliği yüksek ve asidik pH'da etkili antibiyotikler tercih edilmelidir. Hastalığın nüks oranları yüksek olduğundan tedavide kombine ilaçlar tercih edilir (18,24,44). Tetrasiklin tedavide en etkili ilaçtır ancak monoterapi olarak önerilmemektedir. Erişkin hastaların tedavisinde tetrasiklin + streptomisin, doksisisiklin + rifampisin, doksisisiklin + streptomisin ya da ofloksasin+rifampisin kombinasyonları altı hafta süre ile kullanılmaktadır. Çocuklarda ise trimetoprim-sülfametaksazol (TMP-SMZ) (10 mg/kg/gün) + rifampisin (20 mg/kg/gün) kombinasyonu 4-6 hafta + gentamisin (5-7 mg/kg/gün, 5 gün) tercih edilmektedir. Sekiz yaşın üzerindeki çocuklarda doksisisiklin + rifampisin tedavisi verilebilir (38,41,44). Nörobruselloz tedavisi ise rifampisin + doksisisiklin + 3. kuşak sefalosporinler ya da streptomisin + doksisisiklin kombinasyonuna TMP-SMZ (Trimetoprim+sülfametoksazol) eklenerek 3'lü kombinasyon şeklindedir. Nörobruselloz olgularında tedavi süresi çocuklarda ortalama 3 ay, erişkinlerde 9 ay kadardır. *Brucella* türlerinin neden olduğu menenjit ve endokardit vakalarında tedavi protokolü henüz optimal olmadığından tam bir tedavi rejimi belirlenememiştir. Brusella endokarditinde rifampisin + doksisisiklin, TMP-SMZ + doksisisiklin veya gentamisin + TMP-SMZ kombinasyonunu 6-9 hafta süreyle verilmesi önerilir (23,41,44).

2.8. Brusellozun Tanısı

İnsanda bruselloz tanısı, bu hastalığın çok çeşitli olabilen klinik bulgularından dolayı saf klinik temellerde yapılamaz; bakteriyolojik ve serolojik testlerin yapılması zorunludur (21,23). Bununla birlikte, endemik bir bölgede yaşayan veya son zamanlarda brusellozun endemik olduğu bir ülkeye seyahat öyküsü olan febril bir hastanın *Brucella* ile enfekte olabilme olasılığı hekimler tarafından gözardı edilmemelidir. Bu nedenle tanıyı yönlendirmek için doğru klinik öykü alınması şarttır ve bazı çok temel sorulara (meslek, çiğ süt içme, hayvanlarla temas ve endemik bölgelere seyahat) duyulan ihtiyaç vurgulanmalıdır (23). Ayrıca hızlı bir tarama testi yapılmalıdır. Rose Bengal testi hassas bir hızlı tarama testi olarak kullanılabilir ancak sonuçlar bakteriyolojik ve diğer serolojik testlerle doğrulanmalıdır. Tarama testi ile hastanın kliniğinin tutarsız olduğu durumlarda, ek testler kullanarak sonucun kontrol edilmesi tavsiye edilir (23,44).

2.8.1. Kültür

Brusellozun tanısı, etken bakterinin hastadan izole edilmesi ile konur. Bu yüzden kültür kesin tanı yöntemi olup, bruselloz şüphesi olan hastalarda ateş yüksekliği olsun ya da olmasın en az iki kan kültürü alınmalıdır (23). *Brucella*; kemik iliği, beyin omurilik sıvısı, yara, irin, vb. klinik materyallerden izole edilse de, kan bakteriyolojik kültürde en sık kullanılan örnektir. Kültürden önce kanın lökosit fraksiyonunun konsantre edilmesi ve lize edilmesi mikroorganizmanın izolasyon oranını arttırmaktadır (18,23,24).

Brucella türleri, standart bifazik (katı ve sıvı) veya Castaneda kültür yöntemleri ile izole edilebilir. Günümüzde rutin laboratuvarlarda *Brucella* bakterisinin üretilmesi için otomatize kan kültür sistemleri kullanılmaktadır. Aerobik BACTEC kan kültür sistemi ile bakteri, ilk yedi gün içerisinde, yaklaşık %90 oranında izole edilebilmektedir. Bu sistemlerde pozitif üreme sinyali alınması için geçen süre; kan örnekleri için yaklaşık beş gün, kemik iliği örnekleri için ise yaklaşık yedi gündür (23). Ayrıca BOS, idrar, eklem sıvısı, anne sütü, plevral sıvı, peritoneal sıvı, vajinal akıntı, enfekte doku ve abse kültürleri de etkeni tespit etmek için kullanılabilir (23,24).

Otomatize kan kültürü sistemlerinin; katı faz ile birlikte serum-dekstrozu suyu ve yüksek kaliteli pepton içermesi tavsiye edilmektedir. Bunun dışında katı besiyeri olarak, serumlu Tryptose Agar, %5 koyun kanı eklenmiş *Brucella* Agar kullanılabilir. Bakterinin %5-10 CO₂'li ortamda inkübasyonu uygundur. Üreme sinyali veren kan

kültür şişeleri katı kültüre pasajlandıktan sonra 35-37 °C’de 3-7 gün inkübasyona bırakılır ve üreyen koloniler *Brucella* etkenleri açısından değerlendirilir. Bakterinin cins düzeyinde olası identifikasyonu; koloni morfolojisi, Gram boyama, biyokimyasal testler (katalaz, oksidaz testi, üreaz deneyi) ve aglütinasyon testleri (*Brucella*’ya özgü antiserumlar ile yapılan lam aglütinasyon) yardımıyla konur (21,23).

BACTEC 9204 ve BacT / Alert kan kültürü sistemleri, bakterinin tespiti için geçen süreyi kısaltır. Bu yöntemlerle *Brucella* varlığı, inkübasyonun üçüncü günü tespit edilebilir (45). Bunun dışında günümüze daha yeni BACTEC FX otomatize kan kültürü sistemleri kullanıma girmiştir. (Becton-Dickinson, Sparks, MD). Bu sistemlerde *Brucella* bakterisi ilk üç gün içinde %90 oranında üretilebilmektedir (109).

2.8.2. Serolojik Testler

Hasta serumunda *Brucella*’ya karşı oluşan antikor titrelerindeki yükselme brusellozun ön tanısını koymada oldukça faydalıdır. Serolojik testler sadece hastalığın laboratuvar tanısında değil aynı zamanda hastalığın tedavi takibinde de önemli bir yere sahiptir (46). Brusellozun laboratuvar tanısında en sık kullanılan serolojik testler; Rose Bengal Testi (RBT), Standart Serum Tüp Aglütinasyon Testi (STAT), Coombs testi ve ELISA testidir. STAT, Coombs ve ELISA testleri daha pratik uygulanabildiğinden 2-Merkaptoetanol testi (2-ME) nadiren kullanılmaktadır (24,46).

2.8.2.1. Rose-Bengal Testi

Rose-Bengal antijeni; *B. abortus* S99 suşundan üretilmiş, düşük asiditede (pH: 3.65 ±0.05) Rose-Bengal boyası ile boyanmış ve *Brucella* antiserumu ile standardize edilmiş ölü bakteri süspansiyonudur (47). Hasta serumunda antikor varlığını araştırmak amacıyla rutin bakteriyoloji laboratuvarlarında tarama amaçlı kullanılmaktadır. Antijen antikor reaksiyonu esasına dayanan testte yalancı pozitiflikler saptanabilmektedir. (10,18,24). Rose Bengal Testinde (RBT) ortamın asidik olması dolayısıyla IgM antikorlarının antijene bağlanma kabiliyeti düşük pH’ta önemli ölçüde azalmaktadır. Test IgG antikorlarını daha iyi saptar (48-50).

RBT şu anda tüm dünyada önerilen hızlı tarama testidir, ancak sonuçlar her zaman diğer serolojik testlerle doğrulanmalıdır. RBT’nin duyarlılığı yüksektir, ancak *Y. enterocolitica* O:9, *V. cholerae*, *F. tularensis* ve diğer çapraz reaktif organizmalarla enfekte olmuş bireylerden alınan serumlarla yanlış pozitif sonuç verebilir (23,24,41).

2.8.2.2. Standart Tüp Aglütinasyon Testi (STAT veya Wright Testi)

Smith ve Wright tarafından geliştirilen bu yöntem, günümüzde insan brusellozunun serolojisinde rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında en sık kullanılan ve referans olarak kabul edilen testtir. Serum aglütinasyon testi, standart tüp aglütinasyon testi ya da Wright testi gibi farklı adlarla anılmaktadır (51,52). Antijen olarak; S koloni oluşturan *B. abortus* S 99 veya S 1119-3 suşunun ısı ve fenol ile öldürülerek nötral pH'da (pH:7.2-7.4) hazırlanmış tam hücre süspansiyonu kullanılmaktadır. Hasta serumunda S-LPS'ye karşı oluşan tüm antikorlar (IgM, IgG, IgA) tespit edilmektedir. Ancak, test reaksiyonunun nötral değere yakın bir pH'da gerçekleşmesi nedeniyle, STAT IgM antikorlarını daha fazla saptamaktadır. IgM'nin pentamer yapısı aglütinasyon reaksiyonunda iyi kafes formasyonu oluşmasına yol açarak tüp aglütinasyon testindeki duyarlılığın temel olarak IgG tipi antikorları saptayan Rose Bengal testine göre daha yüksek olmasına neden olmaktadır. Fakat, çapraz reaktif mikroorganizmalara karşı oluşan antikorların neden olduğu yalancı pozitiflik, bu testin özgüllüğü ile ilgili en önemli sorundur (23,24,41,52).

Hasta serumunda total antikor titresinin 1/160 ve üzerinde saptanması klinik olarak anlamlıdır (16,41). Hastalığın akut ve konvalesan döneminde alınan serum örneklerinin toplam antikor titresinde dört kat ve üzeri artış olması aktif enfeksiyon lehinedir. Hastalığın güçlü klinik belirtileri olsa da, aglütinasyon testlerinde negatif sonuç alınması brusellozda sık rastlanan bir durumdur (41,53). Bunun nedeni IgG ve IgA tipi blokan antikorların varlığıdır. IgA antikorlarının serumda fazla olması düşük dilüsyonlarda IgG ve IgM antikorlarıyla aglütinasyonu engelleyebileceği için sonucun negatif çıkmasına yol açabilir. Serumun ileri dilüsyonları hazırlanarak prozon fenomeni yani antikor fazlalığına bağlı yalancı negatiflik önlenabilir (24,32). Bu durumda Coombs testi çalışmak gerekir. Ayrıca, STAT'da alınan antikor pozitifliğinde antikoru tipini belirlemek ve enfeksiyonun rölaps-reenfeksiyon ayırımını yapabilmek için 2-ME veya rivanol testleri kullanılmaktadır. Bu maddeler IgM pentamerinin bisülfid bağlarını kırarak aglütinasyonu engeller, sadece IgG'lerin saptanmasını sağlar (8,23,47,).

2.8.2.3. Coombs Testi

Klinik olarak bruselloz belirtileri belirgin olduğu halde yapılan aglütinasyon testlerinde negatif sonuç alınması brusellozda sık rastlanmaktadır. Enfeksiyonun çok erken döneminde veya agammaglobulinemi, aglütinasyon vermeyen antikorların varlığı

veya prozon fenomeni durumunda STAT negatif bulunabilir (24,48,54). Bunun nedeni, antikorların antijenlere bağlandığı halde aglütinasyon reaksiyonu oluşumunu engelleyen mekanizmaların varlığıdır. Blokan antikorlar, sıklıkla hastalığın kronik döneminde ortaya çıkan, özgül olarak antijene bağlanabilmesine rağmen aglütinasyona yol açmayan IgG₁, IgG₂ ve IgA yapısındaki antikorlardır. (48,50,51,52). Blokan antikorların aglütinasyon oluşturmamalarının mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak bu durumun antikorların menteşe bölgesinin çok esnek olması nedeniyle iki veya daha fazla epitopa optimal çapraz bağlanmayı sağlayacak açığı tam olarak verememelerinden kaynaklı olduğu öne sürülmüştür (55). Coombs testi aglütinasyon blokajının ortaya çıkarılmasında kullanılan en iyi testtir. STAT’da aglütinasyon vermeyen tüpler yıkanıp santrifüj edildikten sonra tüplere eklenen IgG yapısındaki anti-human globülin serumu (Coombs) ile aglütinasyon indüklenir. IgG₁, IgG₂ ve IgA saptanır. Antikor titresi 1/320 ve üzeri değerler anlamlı kabul edilir (48,51,55).

2.8.2.4. 2-Merkaptoetanol Testi

Brusellozun akut evresinde ilk önce IgM daha sonra IgG antikorları oluşmaktadır. IgM antikorlarının düzeyi IgG’ye göre daha çabuk düşer (47). Hastalığın kronik döneminde IgG antikorlarının üretimi devam eder ancak birçok olguda IgM antikorları çoğu zaman düşük titrelerde ve bazen de anlamlı düzeyde varlığını sürdürebilir. Bu durumda aglütinasyon sonucunun hangi antikordan kaynaklandığını tespit etmek gerekir (24,48). Bunun için hasta serumunda var olan IgM antikorlarının 2-Merkaptoetanol veya rivanol ile tahrip edilerek serum aglütinasyon deneyleri tekrarlanır. Her iki bileşik de IgM’deki bisülfid bağlarını kırarak ve antikorları depolimerize ederek IgM’nin aglütinasyon etkinliğini yok eder. Bu maddelerle işlem görmüş serumlar kullanarak yapılan testlerde aglütinasyon gözlenmesi, hastalığın aktif olarak sürdüğünü gösteren IgG antikorlarının varlığından kaynaklanmaktadır. Standart tüp aglütinasyon testinde alınan pozitif sonuç, 2-ME testinde negatifleşir ise aglütinasyon IgM kaynaklıdır ve hastalık akut evrededir. Her iki aglütinasyon testinde de (STAT ve 2-ME testi) pozitif sonuç alınması IgG antikorlarına bağlı olup hastalığın kronikleştiği anlamına gelir (47,48,54,56)

2.8.2.5. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

Brusellozda hasta serumundaki IgG, IgM ve IgA antikorları, bakterinin sitoplazmik proteinlerinin antijen olarak kullanıldığı ELISA yöntemi ile de tespit

edilebilir. Bu yöntem özellikle hastalığın kronik döneminde diğer aglütinasyon testlerinden daha duyarlı ve özgül olabilmektedir (32). İmmünglobülin izotiplerini (IgM, IgG ve IgA) saptayabilen bir test olarak hem hastalığın tanısında ve evrenlenmesinde, hem de takibinde kullanılabilir. ELISA, yüksek duyarlılık ve özgüllükte olup dört-altı saat gibi kısa bir sürede kantitatif olarak antikorları saptayabilmektedir. Özellikle nörobruselloz şüphesinde BOS incelemesinde ve sero-sürveyans çalışmalarında tercih edilir (23,32,57).

2.8.3. Moleküler Tanı Yöntemleri

Doğrudan klinik örneklerde *Brucella* türlerinin saptanmasında konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon (Gz-PZR) testleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde *BCSP31* (31-kDa'luk hücre yüzey proteinini kodlar), *BP26* (26-kDa'luk periplazmik proteini kodlar), *16SrRNA* ve *insertion sequence IS711* gibi *Brucella* türlerine spesifik hedef gen bölgeleri kullanılmaktadır (15). Bu yöntemlerin dışında Polimeraz Spiral Reaksiyon (PSR) ve LAMP (Loop mediated isothermal amplification) gibi moleküler yöntemler brusellozun tanısında araştırma laboratuvarlarında kullanılmaktadır. PSR analiz yöntemi LAMP tekniğinin aksine sadece bir çift primere ihtiyaç duyarak amplifikasyon yapabilmektedir (108).

Brusellozun tanısında; bakterinin kan kültürlerinde üreme oranlarının düşük olması ve mikroorganizmanın üremesi için uzun inkübasyon sürelerine ihtiyaç duyulması sebebiyle moleküler testler serolojik testlere göre daha avantajlıdır (16,58). Ayrıca lokalize enfeksiyonlarda, nörobruselloz olgularında, immünsupresif bireylerde ve brusellozun endemik görüldüğü bölgelerdeki nedeni bilinmeyen ateş, pansitopeni ve serolojik testlerin negatif olarak saptandığı durumlarda Gz-PZR oldukça avantajlıdır (58,59). Ancak bu yöntemlerin çoğunda henüz standardizasyon sağlanamadığından hatalı pozitif ve hatalı negatif sonuçlar alınabilmektedir (16). Bu sonuçlara neden olan durumlar aşağıda belirtilmiştir.

2.8.3.1. Moleküler Testlerde Hatalı Negatif Sonuç Alınması

Amplifikasyon yöntemlerinde zaman zaman yanlış sonuçların alınması amplifikasyon öncesi ve sonrasında meydana gelmektedir. Amplifikasyon reaksiyonunun yanlış negatif olarak sonuçlanması; seçilen örneklerin uygun olmaması,

hedef DNA molekülünün uygun şekilde saflaştırılamaması, DNA konsantrasyonunun düşük olması, inhibitör maddelerin varlığı ve amplifikasyon reaksiyonunun herhangi bir aşamasından kaynaklanabilir (60).

Hatalı negatif sonuçların alınabildiği durumlar şunlardır (61,62,64);

2.8.3.1.1. Klinik Örneklerden Kaynaklanan Sorunlar

Seçilen örnek tipi: Tam kan, hemoliz olmuş eritrositlerden açığa çıkan hemoglobin, hemolizli ve lipemik serum örnekleri, antikoagülan olarak kullanılan heparin, parafine gömülü dokularda fikse edici olarak kullanılan formalin DNA izolasyonu aşamasında sorun teşkil eder. Bu problemler ekstraksiyon esnasında çözümlenmelidir. Aksi takdirde uygun olmayan örnekten gelen hücresel atıklar, proteinler ve kimyasal bileşikler, DNA izolasyonu esnasında saflaştırılamaz ise PZR üzerine inhibitör etki yaparak hatalı negatif sonuç alınmasına sebep olur. Plazma ile çalışılması gereken durumlarda antikoagülan madde olarak heparin yerine EDTA (Etilen Diamin Tetraasetik Asit) veya asit sitrat dekstroza tercih edilmelidir (62,63,65).

Örneğin alınış zamanı: Kanda bakterinin veya virüsün yoğunluğunun dalgalanma gösterdiği enfeksiyonlarda, klinik örneğin uygunsuz bir zamanda alınması durumunda hatalı negatiflik ortaya çıkabilir. Bakteriyeminin veya vireminin pik yaptığı, klinik olarak ateş yükselmesinin hemen öncesinde alınan kan örneği değerli materyaldir (65).

Transfer ve saklanma koşulları: Örneklerin işleme alınmadan önceki saklama koşulları ile ilgili farklı sonuçlar alınabilmektedir. İzole edilen DNA'lar eğer kısa sürede kullanılacak ise +4 °C'de saklanabilir. Kan örnekleri DNA analizi için izolasyon öncesinde +4 °C'de üç gün süre ile saklanabilir. Serum örnekleri transfer edilecek ise dondurulmuş olarak kuru buz içerisinde, plazma örnekleri de 2-8 °C'de muhafaza edilerek gönderilebilir. Eritrosit içeren klinik örneklerde eritrositler ayrıştırılmadan dondurma işlemi yapılmamalıdır. Uzun süreli saklamalarda ise klinik örnekler, DNA ve RNA'lar; daha düşük ısılarda (-70 °C) stabil kalabilmektedir. (65,66)

2.8.3.1.2. Hedef Molekölün İzolasyonu ve Saflaştırılmasından Kaynaklanan Sorunlar

Amplifikasyon yöntemlerinin en önemli aşamalarından biri de hücreyi parçalayarak sitoplazma içerisindeki hedef nükleik asitleri serbest hale getirip saflaştırmaktır. Bu amaçla farklı yöntemler ve kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Nükleik asit izolasyonundan sonra saflaştırma ve yoğunlaştırma işlemlerine uyulmadan doğrudan amplifikasyona geçilen durumlarda hatalı negatif sonuçların alınması kaçınılmazdır. Nükleik asit izolasyonunda sıklıkla kullanılan EDTA, sodyum dodesil sülfat (SDS) ve guanidyum hidroklorürün amplifikasyon enzimleri üzerine inhibitör etkileri olabilmektedir. İnhibitörler örneklerin seyreltilmesi, fenol, kloroform veya kloroform/izoamilakol ekstraksiyonu ile sağlanabilir (67). Nükleik asit izolasyonunda hücreyi parçalamada kullanılan kaynatma, alkali lizis ve benzeri çeşitli denatüran ajanlar hedef DNA'nın yapısını bozabilir. Amplifikasyonun hazırlık aşamasında denatüre olmuş hedef moleküller, primerlerle aralarında özgül olmayan bağlanmalar (primer-dimerleri) gerçekleştirmekte, testin duyarlılığını ve özgüllüğünü azaltmaktadır (70).

2.8.3.1.3. Amplifikasyon Aşamasından Kaynaklanan Sorunlar

Hedef molekülün yapısı bozulmuş veya konsantrasyonu çok düşük olduğu durumlarda amplifikasyon ürünleri daha az oluşmakta veya hiç oluşmamaktadır. Reaksiyon tüpündeki maddelerden herhangi biri unutulmuş veya fazla konulmuş olabilir (enzim ve nükleotidlerin unutulması veya KCl, NaCl konsantrasyonları olması gerektiğinden fazla olması vb). Primerlerin baz dizilimi, uzunluğu ve konsantrasyonu uygun olmayabilir. Reaksiyon tüpünde bulunmaması gereken inhibitörlerin varlığı (DNaz, RNaz, eldiven pudrası) hatalı negatifliğe yol açabilir. Ekstrakte DNA 1/10 oranında seyreltilerek (inhibitörler de dilüe olacağından) PZR'nin yalancı negatif sonuç vermesi önlenabilir. En kritik noktalardan biri de amplifikasyon koşullarının optimal olmamasıdır (68-71).

2.8.3.2. Amplifikasyon Reaksiyonlarında Hatalı Pozitif Sonuç Alınması

Hatalı pozitif sonuçlar pozitif örneklerin negatif örneklere bulaşması veya önceki amplifikasyon ürünü amplikonların yeni reaksiyon tüpüne karışmasıyla olabilmektedir (carry-over kontaminasyonu). Önlem olarak laboratuvar, belirli

aralıklarla, amplikonlar veya pozitif kontrol örneklerle kontaminasyon açısından kontrol edilmelidir. Hatalı pozitiflikler basit önlemlerle minimuma indirilebilir (61,62). Moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında ayrı çalışma alanları oluşturularak, yani; örneklerin kabulü, örneklerin işlenmesi, çözelti hazırlama, amplifikasyon ve sonuç gözlemlene odalarının oluşturulması, bir alanlardan diğerine malzeme geçişi ve hava sirkülasyonunun engellenmesi vb önlemler alınarak hatalı pozitiflik oranı büyük ölçüde azaltılmaktadır. Ayrıca günlük olarak; çalışma masaları, pipetleri ve tüp sporlarını taze hazırlanmış %1'lik sodyum hipokloritle temizlemek, distile su ve tamponları otoklavda steril etmek, filtreli pipet uçları kullanmak, yanlış pozitifliklerin önlenmesine büyük ölçüde katkı sağlar. Amplifikasyon tüpleri hazırlanırken önce negatif kontrolleri, sonra klinik örneklerden elde edilen DNA'yı, en son pozitif kontrolleri eklemek hatalı pozitiflik oranını büyük oranda azaltır. İlaveten olası carry-over kontaminasyonu ihtimaline karşı Urasil N-glikozilaz enzimi, fotokimyasal inaktivasyon veya düşük dalga boyunda UV ışınlarından yararlanmak hatalı pozitifliği minimuma indirir (61,62,71).

2.8.3.3. Amplifikasyonu Etkileyen Parametreler ve Koşulların Standardizasyonu

Amplifikasyon hazırlık aşamasında dikkat edilmesi gereken kurallar: Her deney serisi içinde pozitif ve negatif kontrollerin yanında internal ve eksternal kontroller de kullanılmalıdır. Negatif ve pozitif kontroller örnekle beraber işlenmelidir. Hatalı pozitiflik oranı %1'den fazla olmamalıdır. Primerlerin hedef DNA'ya bağlanmalarını engellemek için hazırlık aşamasında amplifikasyon karışımını içeren tüpler buz içinde tutulmalıdır. Amplifikasyon tüpü içerisindeki maddelerin iyice karışması sağlanmalıdır. Miktarı az olan primerler ve enzimin, fazla hacimde hazırlanan reaksiyon karışımı içerisinde homojen hale getirilmesi mümkün olmayabilir. Bu durumda iyi bir homojenizasyon yapılmalıdır. Reaksiyon tüpüne ilk önce kontaminasyon ihtimali en düşük olan nükleaz içermeyen steril su, sonra amplifikasyon tamponu en son primerler ve enzim konulmalıdır (64,65).

Amplifikasyon tüpündeki parametrelerin optimizasyonu: Etkin bir amplifikasyon için klinik örneklerdeki hedef molekülün genellikle 100-400 baz uzunlukta olması istenmektedir. Moleküler yöntemler, hedef nükleik asitteki minimal değişikliklerden bile etkilenebilir. Hedef molekülün yüksek konsantrasyonda olması

duyarlılığı arttırmaktadır. Hedef molekülün sıvısı içerisinde homojen halde bulunması önemlidir (64).

Primerlerin seçimi: Primerlerin uzunluğu 17-28 bazdan oluşmalıdır. Kısa primerler yeteri kadar hedef özgüllüğü göstermemekte, uzun primerler ise maliyetin artmasına neden olmaktadır. Primerlerin baz dizilimleri primer dimerlerinin oluşmasına izin vermemeli, Guanin+Sitozin içeriği %40-60 oranında olmalı ve Tm (melting temperature) yani erime derecesi de 50 °C ve üzerinde olmalıdır. Arzu edilen, iki primerin Tm derecelerinin birbirine yakın olmasıdır. Amplifikasyonda tek tip nükleotidden oluşmuş veya bir nükleotidin daha baskın olduğu primerler kullanılmamalıdır. Tanı amaçlı ticari olarak temin edilen primerler, araştırılan mikroorganizmanın bütün genotipleri için ortak olan, hedef bölgeyi amplifiye edebilecek özellikte olmalı ve konsantrasyonu, genellikle 50 µl'lik reaksiyon tüpünde 0.1-1 µM arasında olmalıdır (65,74).

Enzim miktarı: Reaksiyon tüpü içerisinde 0.5-2.5 IU arasında enzim bulunması (genellikle 1.25 IU) yeterlidir. Enzim miktarının yeterli konsantrasyonda bulunmaması hatalı negatif sonuca yol açar (62).

Magnezyum iyon konsantrasyonu: Magnezyum, Taq DNA polimeraz enziminin performansını etkileyen önemli bir elementtir. Reaksiyon tüpünde yeterli miktarda magnezyum iyonu bulunmaz ise enzim inaktiftir, sonuç olarak hedef DNA kalıbı uzayamaz, reaksiyon çok zayıf veya negatif olarak gözlenir (62,65).

Tampon içeriği: KCI tamponunun reaksiyon tüpü içerisindeki derişiminin 50 mM'den fazla olması Taq DNA polimerazı inhibe eder (75).

Nükleotit konsantrasyonu: Her bir deoksinükleotit trifosfat (dNTP) eşit miktarda olmak üzere reaksiyon tüpünde 50-200 µmol derşimde olması optimaldir. Ancak nükleotid konsantrasyonu; amplifikasyon ürününün uzunluğuna, Magnezyum iyon yoğunluğu ve primer miktarına göre optimize edilebilir (65,72).

Termal siklus parametrelerinin optimizasyonu: Primerlerin baz dizilimi amplifikasyon sikluslarının sıcaklığını belirlemede önemlidir. Bağlanma derecesi; nonspesifik bağlanmalar yani istenmeyen primer-dimer oluşumunu önlemek için yüksek tutulmalıdır. Böylece özgül olmayan bağlanmalar minimuma inerek spesifik ürün miktarı artar. Uzama yaklaşık 70 °C'de optimaldir. Bu sıcaklıkta saniyede 100 bazlık bir

uzama gerçekleşmektedir. PZR amplifikasyonunda çoğunlukla denatürasyon için 92-98 °C'de 30-60 sn, bağlanma için 37-70 °C'de 30-60 sn, uzama için 70-74 °C'de 30-90 sn kullanılmaktadır (72,73,75). PZR yönteminde genellikle 25-40 siklus çoğaltma için yeterli olmaktadır. Belirtilen amplifikasyon programları, farklı cihazlarda yeniden optimize edilmelidir. Herhangi bir moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında standardize edilmiş program, reaksiyon tüp içeriği aynı olsa bile başka bir cihazda farklı sonuçlar verebilmektedir (73).

2.9. Moleküler Tanıda Kullanılan Testlerin Validasyonu

Geçerlilik (Validasyon), cihazın, metodun veya ölçüm prosedürünün belirlenen amaçlara uygunluğunun objektif olarak test edilip yazılı delillerle kanıtlanmasıdır. Analitik metod validasyonu, bir metodun performansını belirlemek için yapılan birtakım değişkenlere göre test etme ve ölçme işlemleridir (77). Laboratuvarlarda verilen pek çok karar, yapılan ölçümlerin sonucuna dayanılarak verilmektedir. Doğru karar verebilmek için analiz edilen sonucunun doğru ve tekrarlanabilir olması gerekir. Standart bir metod laboratuvarında ilk defa uygulanacağı zaman veya kullanılan metotta değişiklik yapıldığı zaman ya da analiz için yeni bir yöntem geliştirildiği durumlarda metod validasyonuna ihtiyaç duyulur (76,79). Ancak geçerliliği belirlenmiş bile olsa bir metod başka bir laboratuvarında farklı kişiler veya farklı cihazlarda kullanıldığında, zamana bağlı olarak metodun performansındaki değişimi belirlemek için validasyon tekrarlanmalıdır (77). Uluslararası kabul gören çeşitli geçerlilik (validasyon) kriterleri mevcuttur. ISO/IEC, US-EPA, US-FDA, cGMP gibi kurumlar tarafından belirlenmiş kriterler kullanılmaktadır (78).

Bir yöntemin performans karakteristikleri için öncelikle aşağıdaki temel geçerlilik parametrelerinin belirlenmesi gerekir (77,78,80,81). Bunlar;

- Doğruluk (Accuracy)
- Kesinlik (Precision)
- Özgüllük (Specifity)
- Doğrusallık (Linearity)
- Gözlenebilme sınırı (LOD; Limit of Detection)
- Tayin sınırı (LOQ; Limit of Quantification)

- Çalışma Aralığı (Range)
- Tutarlılık (Ruggedness)
- Sağlamlık ya da Kararlılık (Robustness)
- Stabilite

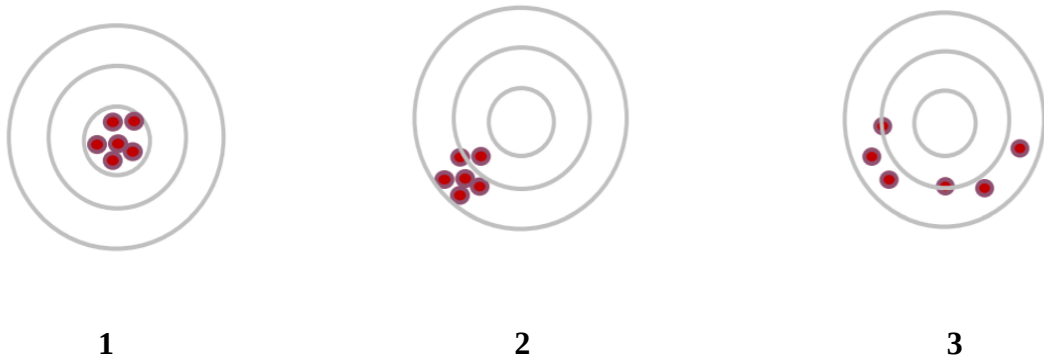
Ancak laboratuvarında geliştirilmiş nükleik asit saptayan CE onaysız, kalitatif ve kantitatif modifiye testlerin yöntem geçerliliğini değerlendirebilmek için asgari düzeyde bazı kriterlerin referans materyaller ile çalışılarak tekrarlanması şarttır (77,81). Bunun için laboratuvarında optimize edilen bir yöntemin doğruluk, kesinlik (tekrarlanabilirlik), duyarlılık ve özgüllük gibi asgari performans göstergeleri çalışılmalıdır (82). Aşağıdaki tabloda örnek sayıları ve değerlendirme kriterleri gösterilmiştir.

Tablo 1: Laboratuvarında geliştirilmiş Nükleik asit saptayan testlerin asgari değerlendirme kriterleri (81).

Değerlendirme Kriterleri	Referans materyal	Nükleik Asit Saptama Testleri	
		KALİTATİF	KANTİTATİF
Doğruluk	Pozitif	3	3
	Düşük pozitif	3	3
	Negatif	3	3
Duyarlılık	Pozitif	10	10
	Düşük pozitif	10	10
Özgüllük	Negatif	20	20
Kesinlik (Çalışma içi 3'er kez)	Pozitif	1	6
	Düşük pozitif	1	3
Kesinlik (Deneyler arası- 3 ayrı günde 1 kez)	Pozitif	1	2
	Düşük pozitif	1	1
Doğrusallık (2 kez tekrar 2 ayrı çalışmada)	Pozitif	-	2 ⁴

2.9.1 Tanımlar

Kesinlik: Aynı homojen örnekten alınan çoğul örnekler için yapılan ölçümler serisinin birbirine yakınlık derecesidir. Aynı örnekten yapılan tekrar çalışmalarında sonuçların tekrarlanabilirliğinin bir ölçüsü, diğer bir ifadeyle kullanılan metodun aynı sonucu verebilme gücüdür. Kesinlik standart sapma ile tanımlanır. Standart sapma ne kadar küçük ise değerler o kadar ‘kesin’dir (77,81). Kesinlik aynı zamanda rastgele hataların bir ölçüsü olarak da kullanılır. Elde edilen veriler kesin olabilir ancak doğru olmayabileceği gibi doğru olup kesin de olmayabilirler. Pratikte tekrarlanan çalışmalardan elde edilen değerlerin birbirine yakınlığını belirlemek gerekir. Bunun için laboratuvar da denenen bir testin kesinliği; deney içi veya run içi (intra-assay) ve deneyler arası (inter-assay) olacak şekilde iki grupta incelenmektedir. Tekrarlanabilir ölçüm sonuçları aşağıdaki şekilde şematize edilmiştir (77,81,83).



Şekil 1. Tekrarlanabilir ölçüm sonuçları şematize edilecek olursa; 1-Doğru ve Kesin, 2-Kesin ama Doğru değil, 3- Hem Kesin değil hem de Doğru değil'dir.

Doğruluk: Ölçülen değer ile gerçek değer arasındaki yakınlığı, uyumu olarak tanımlanır. Bir ölçümün doğruluğu, aynı zamanda onun güvenilirliğini de yansıtır. Ancak, doğruluk hiçbir zaman kesin olarak saptanamaz, çünkü böyle bir tayin için tam olarak doğru değerlere gereksinim vardır. Bu nedenle, verilerin doğruluğu sadece tahmin edilebilir. Bu tahmin, standart örneklerle yapılan analizlere, bilimsel literatüre ve geçmişteki tecrübelerle dayanır. Doğruluğun değerlendirilmesinde referans yöntemle yapılan karşılaştırmada; referans materyal, farklı bir yöntemle daha önce çalışılmış dış kalite kontrol materyali veya değeri referans yöntem ile ölçülmüş hasta materyali kullanılabilir (77,79,81).

Laboratuvarlarda geliştirilen bir metot valide edilirken yöntemin aynı zamanda doğruluğunun da kanıtlanması gerekir. Bunun için seçilen referans materyalin; farklı konsantrasyonlarda pozitif ve negatif örnekleri hazırlanarak test edilir. Örnek sayısı en az 3 yüksek pozitif, 3 düşük pozitif ve 3 negatif olacak şekilde işlenir. Ölçülen değerler, referans değerlerle uyumlu olmalıdır (79,81). Kalitatif testler için doğruluk;

Doğru sonuç sayısı / Toplam sonuç sayısı x 100 olarak hesaplanır.

Özgüllük: Bir testin ölçtüğü gerçek negatiflerin sayısının toplam gerçek negatiflerin sayısına oranıdır. Tanısal amaçlı hastalıkların tespit edilmesinde kullanılan bir test için özgüllük; aranan hastalığın hastada bulunmaması durumunda test sonucunun negatif olma olasılığıdır.

Diagnostik bir testin özgüllüğü, testin bulduğu gerçek negatif sonuç sayısı ile negatif olması gereken sonuç sayısının (hasta olmayan sayısı) karşılaştırılmasıyla hesaplanır. Özgüllüğü yüksek bir tanı kiti veya yöntemin yalancı pozitiflik oranı düşüktür (81,82).

Duyarlılık: Bir testin ölçtüğü gerçek pozitiflerin sayısının toplam gerçek pozitiflerin sayısına oranıdır. Diğer bir deyişle valide edilmiş in-vitro diagnostik bir testin altın standart olarak kabul edilen hakem bir teste göre kıyaslandığında gerçek pozitifliği saptama kapasitesidir. Testin pozitif olarak saptadığı örnek sayısının, toplam gerçek pozitiflerin sayısına bölünmesiyle hesaplanır (77,80,81).

Doğruluk ve kesinlikten çok farklı anlamda olan duyarlılık; konsantrasyondaki küçük bir artışa karşı sinyalde görülen artıştır. Uygulamada duyarlılık bir metodun güvenilir olarak ölçebileceği en küçük konsantrasyondur. Analitik duyarlılık gözlenebilirlik sınırı (LOD: Limit Of detection=detection limit) ve tayin sınırı (LOQ: Limit Of Quantitation) ile verilebilir (77,78).

Mikrobiyal tespit yöntemlerinin geliştirilmesi için kalitatif analiz karakterizasyonunda ilk adım analitik hassasiyet veya tespit sınırını (LOD) belirlemektir. LOD'un optimize edilmesi, bir laboratuvarın önceden belirleyeceği örnek giriş hacimi ve örneğin ekstraksiyonu veya PZR gereksinimleri için bazı ayarlamalar yapılmasını gerektirebilir. LOD; belirli bir mikrobik yoğunlukta bir analitin en az %95'inin tespit edilebildiği en düşük konsantrasyon anlamına gelir (77).

3- GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gerekli Materyaller

3.1.1. Sarf Malzemeler

3.1.1.1. DNA İzolasyon Kitleri

- Thermo Scientific GeneJet Whole Blood genomic DNA Purification mini kit (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Norgen Biotek Blood DNA isolation mini kit (Norgen Biotek Corp., Canada)

3.1.1.2. PZR Master Miksleri

- Maxima SYBR Green 2x PCR Master miks (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Ampliqon Multiplex TEMPase 2x PCR Master miks (Ampliqon, Copenhagen, Denmark)
- QuantiTect Multiplex 2x PCR Master miks (Qiagen, Hilden, Germany)

3.1.1.3. Primerler

- *Brucella* spp. Reverse/Forward primerler (10 pmol)
- *Brucella* spp. Prob (5 pmol)
- *B. melitensis* Reverse/Forward primerler (10 pmol)
- *B. melitensis* Prob (5 pmol)
- GAPDH (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz) Reverse/Forward primerler (10 pmol)
- GAPDH Prob (5 pmol)

3.1.1.4. Konvansiyonel Tanı İçin Gerekli Malzemeler

- Kan kültür şişeleri (BACTEC 9240 Plus aerobic/F culture vials, Beckton Diskinson, USA)
- Üreme sinyali veren kan kültür şişelerinden pasaj için kullanılacak Kanlı ve Çikolatamsı agarlar (Oxoid, UK)
- Biyokimyasal testler için kullanılan sarf malzemeler ve besiyerleri: (Katalaz deneyi için hazırladığımız %3'lük H₂O₂ solüsyonu, oksidaz reaksiyonu için test stripleri (Sigma-Aldrich, USA), üreaz aktivitesi için üre agar (Oxoid, UK) ve H₂S üretimi için Kligler Iron Agar (Oxoid, UK)

-Monospesifik *Brucella* antiserumları (A ve M antijenlerinin tespitine yönelik THSK'den tedarik edilen, lam aglütinasyon için antiserumlar)

-Rose-Bengal Antijeni (THSK)

-STAT için *B. abortus* antijeni (THSK febril antijenleri)

-Coombs testi için Anti-Human globülin (THSK)

3.1.2. Cihazlar

-Ev tipi buz dolabı

- +4 °C'lik numune saklama dolabı (KLEO)

- -80 °C'lik derin dondurucu (Thermo Scientific, Forma 88000 Series)

- -20 °C'lik derin dondurucu (Uğur)

-Vorteks-spin cihazı (Thermo Scientific, MySpin 6)

-Isı bloğu (Eppendorf marka)

-CO₂'li Etüv (Nüve, EC 160)

-Santrifüj cihazı (HERMLE, Z216 MK)

-Thermal cycler cihazı 1 (Rotor-gene, Corbett RG 6000, Australia)

-Thermal cycler cihazı 2 (BIO-RAD, CFX-96 C1000 Touch Real-time system)

-Klas II Biyogüvenlik kabini UV'li (Labogene, SCANLAF MARS)

-PCR çalışma kabini UV'li (Thermo Scientific, HERAGUARD ECO)

3.2. Gz-PZR Yönteminin Optimizasyon Çalışmaları

3.2.1. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması ve Sulandırılması

Tez çalışmasında kontrol suşu olarak *B. melitensis* ATCC 23456 kullanıldı. Bu standart suş süspansiyonu THSK Genel Müdürlüğü Ulusal Yüksek Riskli Patojenler Referans Merkez Laboratuvarı'nda 10⁸ cfu/ml konsantrasyonda hazırlanmış ve ısı ile öldürüldükten sonra tez çalışmalarında kullanılmıştır. Bakteri süspansiyonları hazırlanıp belli konsantrasyonlarda dilüe edilirken brusella negatif serum ve tam kan kullanıldı. Negatif serumlar; brusellozun tanısında CDC'nin olası tanı veya kesin tanı kriterlerine uymayan ve laboratuvarımıza brusella dışı tetkikler için gönderilen serum örneklerinden toplandı (41). Bu serumlar önce Rose Bengal testi ile taranıp negatif oldukları tespit edildikten sonra DNA izolasyonu ve PZR ile negatiflik doğrulamaları gerçekleştirildi. Tam kan örnekleri de mikrobiyoloji laboratuvarında çalışan araştırma görevlilerinden

gönüllülük esasıyla alındı. Bu numuneler de serum örneklerinde olduğu Bruselloz açısından RBT ile tarandı; negatiflikleri PZR konfirme edildi.

Öncelikle steril serum fizyolojik içerisinde 10^8 cfu/ml konsantrasyonda *Brucella* bakterisi içeren süspansiyon, negatif serum ve tam kan ile 2 seri halinde 1/10 kat dilüe edilerek 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 ve 10^1 cfu/ml'lik derişimleri hazırlandı. Bunun için 10^8 cfu/ml konsantrasyondaki bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak üzerine 900 µl negatif hasta serumu ilave edildi ve 10^7 cfu/ml'lik stok elde edildi. Bu işlem 1/10 kat dilüsyonlar şeklinde 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 ve 10^1 cfu/ml konsantrasyonlar elde edilene kadar uygulandı. Daha sonra her bir seri ve dilüsyondan DNA izolasyon çalışmalarına geçildi.

3.2.2. DNA İzolasyonu

Thermo scientific GeneJet Whole Blood genomic DNA Purification mini kit (Thermo Fisher Scientific, USA) ve Norgen Biotek Blood DNA isolation mini kit (Norgen Biotek Corp., Canada) kullanılarak her bir seri ve dilüsyondan ayrı ayrı DNA izolasyonu yapıldı. Tam kan ve serum örnekleri ile dilüe edilen bakteri süspansiyonlarından Thermo scientific GeneJet Whole Blood genomic DNA Purification kit ile DNA izolasyonu yapıldı (www.thermoscientific.com/onebio). Ancak, Norgen Biotek Blood DNA isolation mini kit sadece tam kandan DNA izolasyonu amaçlı üretilmiş olduğundan serumla hazırlanan örneklerin ekstraksiyonunda bu kit kullanılmadı (www.norgenbiotek.com). İki ayrı üretici firmanın ekstraksiyon protokolü izlenerek örneklerden DNA izolasyonu yapıldı.

3.2.2.1. Thermo scientific GeneJet Whole Blood genomic DNA pürifikasyon kit protokolü

1. 1.5 mL'lik steril santrifüj tüplerinin her birine 200 µL *Brucella* bakterisi içeren serum örneği veya tam kan eklendi.
2. Üzerine 20 µL proteinaz K solüsyonu ilave edilip 15 sn vortekslendi. Daha sonra 400 µL Lizis solüsyonu eklendikten sonra tekrar 15 sn vorteks yapıldı.
3. Örnekler 56 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

4. 200 µL % 96'lık etanol eklenerek tekrar 15 sn vortekslendi.
5. Bu karışımın hepsi 2 mL'lik spin kolon içine transfer edildi.
6. 8000 rpm'de (6000 g) 1 dk santrifüj edildi.
7. Spin kolon'un altındaki koleksiyon tüp kısmı atıldı. Spin column tekrar kit ile beraber temin edilen steril yeni bir koleksiyon tüpüne konuldu.
8. Üzerlerine 500 µL Wash Buffer 1 (Etanol eklenmiş) solüsyonu eklendikten sonra 1 dk 10.000 rpm'de (8000 g) santrifüj edildi.
9. Spin kolon tekrar 2 mL'lik yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirildi.
10. Üzerine 500 µL Wash Buffer 2 (Etanol eklenmiş) solüsyonu eklendi ve 14.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek yıkama yapıldı.
11. Alttaki tüp atılarak spin kolon 1,5 mL'lik steril santrifüj tüpüne yerleştirildi.
12. Daha sonra, 50 µL Elution buffer tamponu kolon içerisine bırakıldı.
13. 2 dk oda sıcaklığında inkübasyona alındı.
14. 8000 rpm'de 1dk santrifüjden sonra alttaki tüpte toplanan DNA solüsyonu moleküler çalışmalar için -80°C'de saklandı.

3.2.2.2. Norgen Biotek Blood DNA isolation mini kit protokolü

1. 1.5 mL'lik steril santrifüj tüplerinin her birine 20 µL proteinaz K solüsyonu ilave edilip üzerine 200 µL *Brucella* bakterisi içeren tam kan eklendi. 15 sn vortekslendi.
2. Daha sonra 300 µL Lizis solüsyonu eklendikten sonra tekrar 15 sn vorteks yapıldı.
3. Örnekler 55 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. Üzerine 110 µL %96'lık etanol eklendi. 10 sn vorteks yapıldı.

5. Bu karışımın hepsi 2 mL'lik kitin kendi spin kolonu içerisine transfer edildi.
6. 8000 rpm'de (6000 g) 1 dk santrifüj edildi.
7. Spin kolon'un altındaki koleksiyon tüp kısmı atıldı. Kit ile beraber temin edilen steril yeni bir koleksiyon tüpüne konuldu.
8. Üzerlerine 500 µL WN solüsyonu (Etanol eklenmiş) eklendikten sonra 1 dk 8000 rpm'de (6000 g) santrifüj edildi.
9. Spin kolon tekrar 2 mL'lik yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirildi.
10. Üzerine 500 µL Wash Solution A (Etanol eklenmiş) solüsyonu eklendi ve 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek yıkama yapıldı.
11. Altındaki tüp atılarak spin kolon 1,5 mL'lik steril santrifüj tüpüne yerleştirildi.
12. Daha sonra, 50 µL Elution buffer tamponu kolon içerisine bırakıldı.
13. 1-2 dk oda sıcaklığında inkübasyona alındı.
14. 8000 rpm'de 1dk santrifüjden sonra altındaki tüpte toplanan DNA solüsyonu moleküler çalışmalar için -80 °C'de saklandı.

3.2.3. Farklı Amplifikasyon Mikslerinin Saptayabileceği En Düşük DNA Konsantrasyonunun Araştırılması

Üç ayrı ticari firmanın hazırlamış olduğu amplifikasyon master mikslerinin EDSL'sini belirlemeye yönelik çalışmalar gerçekleştirildi. Kullanılan amplifikasyon miksleri;

- Maxima SYBR Green 2x PCR Master miks (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Ampliqon Multiplex TEMPase 2x PCR Master miks (Ampliqon, Copenhagen, Denmark)
- QuantiTect Multiplex 2x PCR Master miks (Qiagen, Hilden, Germany)

İlk uygulama, test maliyetini düşük tutmak amacıyla probsuz monopleks kurulan Maxima SYBR Green 2x PCR Master miks (Thermo Fisher Scientific, USA) ile

gerçekleştirildi (84). İkinci aşamada duyarlılık ve özgüllüğü arttırmak için prob bazlı iki ayrı ticari firmaya ait PCR master miksleri denendi. Multipleks kurulan bu reaksiyon denemelerinde Ampliqon Multiplex TEMpase 2x PCR Master Mix (85) (Ampliqon, Copenhagen, Denmark) ve QuantiTect Multiplex 2x PCR Master Mix'lerin (86) (Qiagen, Hilden, Germany) performansları araştırıldı.

Negatif serum ve tam kan ile 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 cfu/ml konsantrasyonda dilüe edilerek hazırlanan örnekler kitin ekstraksiyon protokolüne tabi tutulduktan sonra izole edilen DNA'lar ile monopleks ve multipleks olmak üzere üç ayrı master miks ile Gz-PZR kuruldu. Thermal cycler sistemleri olarak laboratuvarımızda mevcut olan Rotor-gene (Corbett RG 6000, Australia) ve BIO-RAD (CFX-96 C1000 Touch Real-time system) cihazlarında reaksiyonlar değerlendirildi. Deneylerde *Brucella* türlerinin tamamını yakalayabilecek primerler ile ülkemizdeki brusella enfeksiyonlarının %99'undan sorumlu olan *B. melitensis*'e özgü hedef bölgelere bağlanan primer ve proplar kullanıldı (15). Ayrıca, deney içi olası inhibitör varlığını kontrol etmek (internal kontrol) amacıyla ökaryotik hücrelerde ortak olan gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) enzim geni için spesifik olan primer ve proplar denendi (87). Kullanılan primer ve proplar Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. *Brucella* spp., *Brucella melitensis* ve GAPDH'in saptanması için mGz-PZR'de kullanılan oligonükleotid primer ve proplar (15,87).

HEDEF BÖLGE	PRİMER VE PROBLAR
<i>Brucella</i> spp.	FP: 5'-GCTCGGTTGCCAATATCAATGC-3' RP: 5'-GGGTAAAGCGTCGCCAGAAG-3' Prob: 5'-Joe-AAATCTTCCACCTTGCCCTTGCCATCA-Tamra-3'
<i>B. melitensis</i>	FP: 5'-AACAAGCGGCACCCCTAAAA-3' RP: 5'-CATGCGCTATGATCTGGTTACG-3' Prob: 5'-Fam-CAGGAGTGTTCGGCTCAGAATAATCCACA - Tamra-3'
GAPDH (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz)	FP: 5'-CCACCCATGGCAAATTCC-3' RP: 5'-TCGCTCCTGGAAGATGGTG-3' Prob: 5'-Rox-TGGCACCGTCAAGGCTGAGAACGT-BHQ2-3'

Kısaltmalar: FP; forward primer, RP; reverse primer, 6-FAM: 6-carboxyfluorescein; HEX: 6-hexachlorofluorescein; BHQ1: Black Hole Quencher 1; BHQ2: Black Hole Quencher 2

3.2.3.1. Maxima SYBR Green Master miks Kullanılarak Yapılan Optimizasyon Çalışmaları

Daha önce serum ve tam kan ile dilüe edilen bakteri süspansiyonu Thermo Scientific GeneJet Whole Blood genomic DNA Purification kit (tam kan ve serumdan DNA izolasyonu için) ve Norgen Biotek Blood DNA isolation mini kit (sadece tam kandan ekstraksiyon için) kullanılarak DNA izolasyonu yapıldıktan sonra Maxima SYBR green 2x PCR master miks ile monopleks Gz-PZR çalışması yapıldı. Prob kullanılmayan bu deneyde reaksiyon tüpü içeriği ve reaksiyon koşulları aşağıda belirtilmiştir.

Amplifikasyon tüpü içeriği:

2x Maxima SYBR green PCR master miks	12,5µl
<i>B. melitensis</i> Reverse primer 10 pmol	1µl
Forward primer 10 pmol	1µl
Distile su	8 µl

Toplam hacim: 22,5µl amplifikasyon miks + 2,5µl DNA =25µl

Amplifikasyon koşulları: Master miksın prospektüsünde belirtilen amplifikasyon için belirtilen değerlerde modifikasyonlar yapılarak optimum koşullar belirlendi (84). Bunun için kit prospektüsünde belirtilmiş olan 60 °C’de 30 sn bağlanma ısısı yerine 65 °C ve 72 °C’de 30 sn’lik uzama süresi yerine 20 sn’lik bir uzama zamanı verilerek Rotor-gene cihazında 45 siklus şeklinde reaksiyon gerçekleştirildi. Son olarak 72 °C’de beş dakika ilave uzama süresi verildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra spesifik olmayan bağlanma ve uzamadan meydana gelen sinyallerin değerlendirilmesinde erime eğrisi analizi yapılarak doğru sonuçlar kaydedildi. Amplifikasyon koşulları ve süreleri;

95 °C	10 dk ilk denatürasyon	
95 °C	15 sn denatürasyon	} 45 siklus
65 °C	30 sn bağlanma	
72 °C	20 sn uzama	

72 °C 5 dk ilave uzama zamanı verilerek değerlendirildi.

3.2.3.2. Ampliqon TEMPASE Multiplex 2x PCR Master miks kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmaları

Bu çalışmada *Brucella* spp. primer/prob, *B. melitensis* primer/prob ve GAPDH primer/probları kullanılarak her bir DNA konsantrasyonu için mGz-PZR gerçekleştirildi. Reaksiyon başına kullanılan Revers (R) primer ve Forward (F) primer konsantrasyonu 10 pmol/μl olarak belirlendi. Daha düşük konsantrasyonlardaki DNA'nın amplifikasyonunu saptamaya yönelik eklenen işaretli oligonükleotid (prob) konsantrasyonu ise 5 pmol/μl olarak belirlendi. Her bir reaksiyon tüpü; içerisinde birer μl hacimde *Brucella* spp., *B. melitensis* ve GAPDH'e ait primer ve prob, 12,5 μl 2x master miks ve 4 μl hedef DNA molekülü olacak şekilde toplam hacim 25,5 μl olarak belirlendi.

Amplifikasyon tüpü içeriği:

2x Master Miks	12,5μl
<i>Brucella</i> spp. R primer (10 pmol)	1μl
<i>Brucella</i> spp. F primer (10 pmol)	1μl
<i>Brucella</i> spp. prob (5 pmol)	1μl
<i>B. melitensis</i> R primer (10 pmol)	1μl
<i>B. melitensis</i> F primer (10 pmol)	1μl
<i>B. melitensis</i> prob (5 pmol)	1μl
GAPDH Primer R primer (10 pmol)	1μl
GAPDH Primer F primer (10 pmol)	1μl
GAPDH prob (5 pmol)	1μl

21,5 μL+4 μl DNA = 25,5 μl total volüm

Amplifikasyon koşulları: Kit prospektüsünde belirtilen amplifikasyon koşulları ve kullanılan primerlerin T_M dereceleri dikkate alınarak termal siklus parametreleri

belirlendi. Buna göre 95 °C’de 10 dk ilk denatürasyonu takiben; 45 siklus boyunca 95 °C’de 20 sn denatürasyon, 60 °C’de 50 sn bağlanma ve 72 °C’de 50 sn uzama ve sinyal toplama gerçekleştirildi.

Amplifikasyon koşulları;

95 °C	10 dk ilk denatürasyon	
95 °C	20 sn denatürasyon	} 45 siklus
60 °C	50 sn Bağlanma	
72 °C	50 sn uzama ve sinyal toplama	

olacak şekilde kaydedildi.

3.2.3.3. QuantiTect multiplex 2x PCR master miks kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmaları

Prob kullanılan bu çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki örneklerden izole edilen DNA’lar ile kurulan reaksiyonlarda en düşük saptama limitine ulaşılması amaçlandı. Ampliqon PCR master miks ile gerçekleştirilen çalışmalarda olduğu gibi bu master miks ile kurulan deneylerde de her bir amplifikasyon tüpü; içerisinde her birinden 1 µl hacimde *Brucella* spp., *B. melitensis* ve GAPDH’e ait Reverse ve Forward primerler ile prob, 12,5 µl QuantiTect 2x master miks ve 4 µl hedef DNA molekülü olacak şekilde total volüm 25,5 µl olarak belirlendi. Her biri farklı konsantrasyonda DNA içeren serum ve tam kandan izole edilmiş örnekler için ayrı ayrı mGz-PZR kuruldu. Tüp içeriği ve konsantrasyonlar aşağıda gösterildiği gibidir.

Amplifikasyon tüpü içeriği:

2x Master Miks	12,5µl
<i>Brucella</i> spp. 10 pmol R	1µl
<i>Brucella</i> spp. 10 pmol F	1µl
<i>Brucella</i> spp. prob 5 pmol	1µl
<i>B. melitensis</i> 10 pmol R	1µl

<i>B. melitensis</i> 10 pmol F	1µl
<i>B. melitensis</i> prob 5 pmol	1µl
GAPDH Primer 10 pmol R	1µl
GAPDH Primer 10 pmol F	1µl
GAPDH prob 5 pmol	1µl

21,5 µL+4 µl DNA = 25,5 µl total volüm

Amplifikasyon koşulları: Master miksin prospektüsünde belirtilen amplifikasyon koşullarında değişiklikler yapılarak reaksiyon gerçekleştirildi (86). İlk denatürasyon aşaması kit prospektüsünde belirtilen protokole göre 94 °C’de 60 sn’den aynı sıcaklıkta 20 sn’ye düşürülerek modifiye edildi. Bağlanma ve uzama aşamaları ise birleştirilerek 60 °C’de 90 sn olacak şekilde 45 siklus boyunca gerçekleştirildi. Kullanılan farklı problemlerdeki işaretli boyaaların her biri farklı kanallarda ışıma yaparak toplanan sinyaller cihaz tarafından kaydedildi (FAM kanalındaki *B. melitensis*’e ait amplifikasyon sinyalleri yeşil renkte, HEX kanalında *Brucella* spp.’ye ait sinyaller mavi renkte, TEXAS RED kanalında GAPDH’e ait sinyaller kırmızı renktedir).

Amplifikasyon koşulları;

95 °C 15’ ilk denatürasyon

94 °C 20 sn denatürasyon

60 °C 90 sn bağlanma ve uzama

}
}

45 siklus olacak şekilde

değerlendirildi.

3.3. mGz-PZR Yöntemi için Validasyon Çalışmaları

Literatürde belirtildiği gibi doğruluk, kesinlik (tekrarlanabilirlik), duyarlılık parametreleri düşük pozitif ve yüksek pozitif örneklerle test edildi. Özgüllük çalışması bruselloz tanı kriterlerine uymayan hastalardan alınan 20 adet negatif serum ile yapıldı. Optimize ettiğimiz yöntem ile en düşük saptama limitine ulaştıktan sonra validasyon çalışmalarına geçildi. Optimize edilen methodun validasyon çalışmaları tablo 3’te gösterilen asgari kriterler referans alınarak gerçekleştirildi. Bunun için negatif serum ile

dilüe edilerek belli sayıda yüksek pozitif, düşük pozitif (10^4 ve 10^3 cfu/ml) ve negatif örnekler hazırlandı. Daha sonra tüm örneklerin DNA izolasyonu yapılarak mGz-PZR yöntemi ile doğruluk, duyarlılık ve tekrarlanabilirlik çalışmaları (deney içi ve deneyler arası) yapıldı. Ancak; literatürde brusellozun tanısı için henüz referans bir metot bulunmadığından yöntemimizin doğruluk, kesinlik ve duyarlılık parametreleri tablo 3'te belirtilen düşük pozitif ve yüksek pozitif örnekler ile test edildi.

Yüksek pozitiflik kriterinin belirlenmesinde; nükleik asit saptama testlerinde saptama limiti değerinden $1\log_{10}$ daha yüksek, düşük pozitifliğin belirlenmesinde ise saptama limiti değeri veya bu değer ile $1\log_{10}$ yükseklik değeri arası kabul edilmektedir (81). Yapılan çalışmaların sonuçlar değerlendirilerek yöntemimizin performansı ve temel geçerliliği (validasyon) belirli bir saptama limiti değerinde sağlandı.

Tablo 3: CE onaysız laboratuvar yapımı Nükleik asit saptayan kalitatif modifiye testlerde asgari düzeyde gerekli validasyon parametreleri (81)

Kontrol Kriterleri	Kontroller	NÜKLEİK ASİT SAPTAMA TESTLERİ (KALİTATİF)
Doğruluk	Pozitif ^a	3
	Düşük pozitif ^b	3
	Negatif	3
Duyarlılık	Pozitif ^a	10
	Düşük pozitif ^b	10
Özgüllük	Negatif	20
Kesinlik (Çalışma içi 3'er kez)	Pozitif ^a	1
	Düşük pozitif ^b	1
Kesinlik (Deneyler arası- 3 ayrı günde 1 kez)		
	Pozitif ^a	1
	Düşük pozitif ^b	1

^a: Nükleik asit saptayan test yada test sistemlerinde LOD'un $1\log_{10}$ üzeri konsantrasyonu

^b: nükleik asit saptama testlerinde LOD veya bu değer ile $1\log_{10}$ üzerindeki değerler arasındaki konsantrasyon

3.3.1. Validasyonu Yapılan mGz-PZR Yönteminin Etkinlik Çalışmaları

Bu aşamada klinik olarak bruselloz şüphesi olan hasta örnekleri ve pozitif üreme sinyali veren kan kültür şişelerinde bakteri varlığının araştırılması konvansiyonel yöntemler ile beraber çalışılmıştır. Moleküler tanıya geçmeden önce şüpheli klinik örnekler geleneksel yöntemlerle rutin bakteriyoloji laboratuvarında araştırıldı. Tüm hastaların serolojik sonuçları ve kültür üremeleri değerlendirilerek, konvansiyonel yöntemler ile valide edilen moleküler yöntem karşılaştırıldı.

3.3.1.1. Hasta Örneklerinin Toplanması

Çalışmaya Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği'ne bruselloz şüphesi ile başvuran hastalar dahil edildi. Çalışmaya dahil edilme kriteri olarak; hastaların bruselloz kliniğinin yanında kan kültüründe *Brucella* üremesinin tespit edilmesi ve/veya serolojik testlerin en az birinde anlamlı pozitiflik saptanması (STAT için antikor titresi 1/160 ve üzeri, Coombs testi için antikor titresi 1/320 ve üzeri) olarak belirlendi (11,60).

Hastalardan öncelikle rutin serolojik inceleme için anti-koagülansız tüpe alınan kan örnekleri oda ısısında yaklaşık 10-15 dk bekletildikten sonra 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serum ayrıştırıldı. Ayrıştırılan serumlar serolojik tetkikler ve moleküler çalışmalar için kullanıldı. Kan kültürü için hastalardan alınan örnekler aseptik şartlarda kan kültür şişesine 10 ml inoküle edilip laboratuvarımıza gönderilmiştir. Kan kültürü bruselloz kliniği yanında ateş veya fokal bulguları olan hastalardan, serolojiye ek olarak istenmiştir. Moleküler çalışmalar için serum örnekleri DNA izolasyonu yapıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

Çalışmamızın örnek sayısının yetersiz olması durumunda, istatistiksel olarak değerlendirme yapılabilmesi için laboratuvarımızda incelenen 27 hastanın klinik örneklerine ilaveten başka bir proje kapsamında toplanan bruselloz ön tanılı 30 hastaya ait serum örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Bu serumlar; Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği'ne bruselloz şüphesiyle başvuran hastalara aittir. Hastaların *Brucella* seroloji sonuçları ve kan kültürü üremeleri serum örnekleri ile beraber moleküler tanı amacıyla laboratuvarımıza gönderilmiştir.

3.3.1.2. Konvansiyonel Yöntemler

3.3.1.2.1. Kültür

Kan kültür şişelerinin inkübasyonu için BACTEC 9240 (Plus aerobic/F culture vials, BD) sistemi kullanıldı. Kan kültür şişesinde üreme sinyali olan örnekler, Koyun kanlı agar ve çikolata agara ekildi. Konvansiyonel tanı yöntemleri ile (35-37 °C’de %5-10 CO₂’li ortamda üreme, üreaz aktivitesi, H₂S üretimi ve *Brucella* polivalan anti-serumlar ile lam üzerinde aglütinasyon) suşların cins düzeyinde tayini yapıldı (47,59).

3.3.1.2.2. Serolojik Testler

Brusellozun serolojik tanısı için RBT, STAT ve Coombs testi gerçekleştirildi. Kullanılan test prosedürleri üretici firma önerileri doğrultusunda aşağıdaki gibi uygulandı (88).

Rose Bengal Testi prosedürü: (T.C. Sağlık Bakanlığı THSK)

Çalışmada; *B. abortus* S99 suşunun Rose Bengal boyası ile boyanmış antijeni, steril serum fizyolojik (SF) ve otomatik pipet ve pipet uçları (10-200 µL) kullanıldı.

- 1) Teste başlamadan önce serum örnekleri, kontrol serumları, SF ve test antijeninin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.
- 2) Test kartının üzerine serum örneğinden, pozitif ve negatif kontrollerden 50 µL bırakıldı.
- 3) Üzerine 50 µL RB antijeni damlatıldı.
- 4) Pipet ucu kullanılarak serum ve antijenin karışması sağlandı.
- 5) Kartlar 100 rpm’de rotator ile veya elle dairesel hareket yaptırılarak antijen ve serumun karışması sağlandı.
- 6) Dört dakika içinde antijen antikor reaksiyonuna bağlı iri taneli kümeleşmelerin gözlenmesi pozitif, şeffaf renkli homojen bir görünüm ise negatif olarak değerlendirildi.

Standart Tüp Aglütinasyon Testi prosedürü:

Bu testte hasta serumu, *B. abortus* S-99 ya da S 1119-3 suşlarından hazırlanmış *Brucella* antijeni, 5 ml'lik deney tüpleri, inkübatör ($36\pm1^{\circ}\text{C}$), otomatik pipet ve uygun pipet uçları (100-1000 μL) ile steril SF kullanıldı.

- 1) Teste başlamadan önce serum örnekleri (kontrol serumları da dahil), SF ve test antijeninin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.
- 2) Örnek için 9 test tüpü spora yerleştirildi ve üzerlerine hastanın numarası ve titreler yazıldı.
- 3) Aynı işlem pozitif kontrol serumları için de yapıldı.
- 4) İlk tüpe 950 μL ve diğer tüplere ise 500 μL SF konuldu.
- 5) İlk tüpe 50 μL hasta serumu (pozitif kontroller için de aynı) konularak vortekslendi.
- 6) İlk tüpten 500 μL alınıp ikinci tüpe aktarıldı, daha sonra iyice vorteks yapıldıktan sonra bu işlem yedinci tüpe kadar devam ettirilerek hasta serumunun 1/2 kat dilüsyonları elde edildi. En son yedinci tüpten 500 μL dışarıya atıldı. Böylece 1/20 ile 1/1280 arasında değişen dilüsyonlar hazırlandı.
- 7) Sekizinci tüpe negatif kontrol serumu konuldu. Dokuzuncu tüpe ise sadece antijen eklendi (antijen kontrol).
- 8) Tüplere 500 μL boyasız *B. abortus* S-99 antijen süspansiyonu eklendi ve böylece 1/40-1/2560 titrede son dilüsyonlar elde edilmiş oldu.
- 9) En az 20 saniye elle hafifçe çalkalanarak serum ve antijenin karışması sağlandı.
- 10) Örnekler 37°C 'lik inkübatörde veya su banyosunda (titreşimsiz ortamda) 48 saat inkübe edildi.
- 11) İnkübasyon sonrası her bir tüp aglütinoskop altında incelenerek dantela şeklinde aglütinasyon olup olmadığı değerlendirildi.

Coombs Testi prosedürü:

- 1) Bu testte STAT (Standart tüp aglütinasyon testi) uygulaması ile aglütinasyon veren tüpler not edildi ve testten çıkartıldı.
- 2) Aglütinasyon vermeyen tüpler 2000 rpm’de 20 dk santrifüj edildi
- 3) Süpernatant atıldı, çökelti üzerine 500 µL SF eklendi ve pipetleme yapılarak karıştırıldı.
- 4) Üç kez santrifügasyon ve yıkama yapılarak bu işlem tekrarlandı.
- 5) Çökelti üzerine 450 µL SF eklenerek yeniden süspanse edildi.
- 6) Tüplerin üzerine 50 µL Coombs serumu (anti-human globulin) eklendi.
- 7) Tekrar inkübatöre kaldırılarak 24 saat sonra aglütinasyon olup olmadığı yeniden değerlendirildi. Aglütinasyon gözlenen tüplerin titreleri not edildi.

3.3.1.3. *Brucella* Üremesi Olan Kan Kültür Şişeleri

AEAH Enfeksiyon Hastalıkları kliniğinin bruselloz şüphesi olan hastalara ait laboratuvarımıza gönderdiği kan kültür şişelerinden pozitif üreme sinyali alınanlarda mGz-PZR çalışması yapıldı. Kan kültür şişelerinden alınan örneklerle mGz-PZR uygulamadan önce DNA izolasyonu için Thermo scientific GeneJet Whole Blood genomic DNA Purification mini kit ve Norgen Biotek Blood DNA isolation kit protokolleri uygulandı. DNA izolasyonu için kan kültür şişelerine herhangi bir ön işlem yapılmadı. Uzun inkübasyona rağmen üreme sinyali alınmayan kültür şişelerinden de DNA ekstraksiyonu yapıp mGz-PZR çalışıldı.

3.4. Sonuçların Analizi ve İstatistik

Çalışmada yer alan kategorik değişkenler sayı (%) ile ifade edilmiştir. PZR ile kültür üremesi sonuçları McNemar testi, diğer test sonuçları ki-kare testleri ile karşılaştırılmış; PZR’ye ait duyarlılık ve Wilson score güven aralığı (%95 GA) hesaplanmıştır. PZR ile kültür üreme sonucu ve serolojik test sonuçları arasındaki uyum Cohen kappa istatistiği (κ) ile incelenmiştir. Kappa indeksi (κ), standart hata (SH)

değeri ile birlikte verilmiştir. κ değeri Fleiss ve ark.'nın önerileri doğrultusunda yorumlanmıştır ($\kappa < 0.40$: düşük uyum, $0.40 < \kappa < 0.75$ orta-iyi uyum, $\kappa > 0.75$ yüksek uyum) (89). Araştırılan mGz-PZR yönteminin; serolojik yöntemler ve kültür ile kıyaslanmasında istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edilmiştir. Wilson score güven aralığı, RStudio Ver. 1.0.136 açık kaynak kodlu yazılımda PropCIs paketinin scoreci fonksiyonu ile elde edilmiştir. Diğer istatistiksel analizler ve hesaplamalar IBM SPSS Statistics 21.0 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.) programında yapılmıştır.



4-BULGULAR

4.1. Gz-PZR yönteminin optimizasyon işlemlerine ait sonuçlar

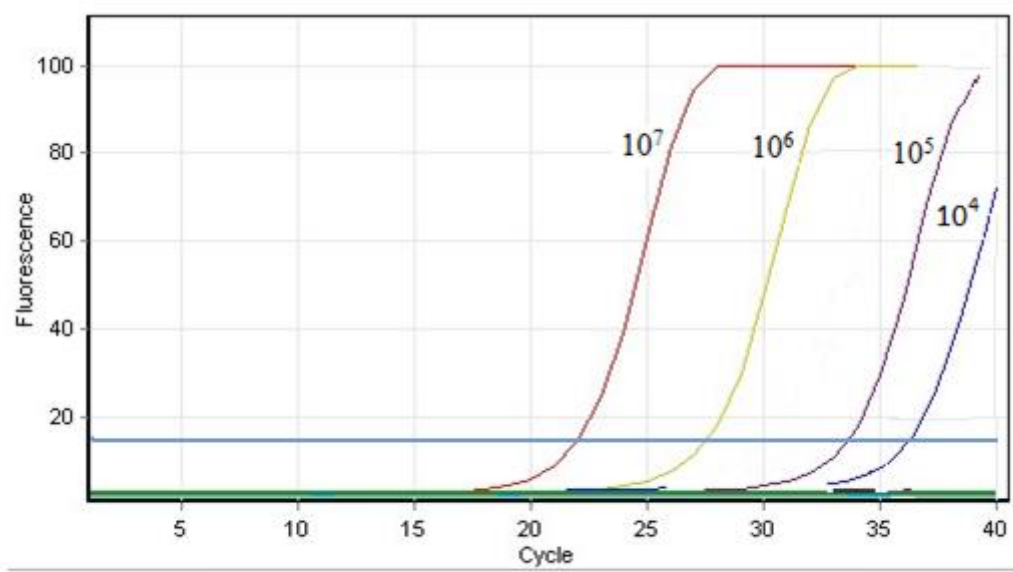
4.1.1. Farklı amplifikasyon master miksleri ile yapılan çalışmalar

Üç ayrı ticari PZR master miks ile yapılan optimizasyon denemelerinde, reaksiyon sonuçları değerlendirildi. Ekstraksiyon kiti olarak; serum ve tam kan örnekleri için Thermo scientific GeneJet Whole Blood genomic DNA Purification kit kullanıldı.

4.1.1.1. Maxima SYBR Green Master Miks kullanılarak yapılan Gz-PZR sonuçları

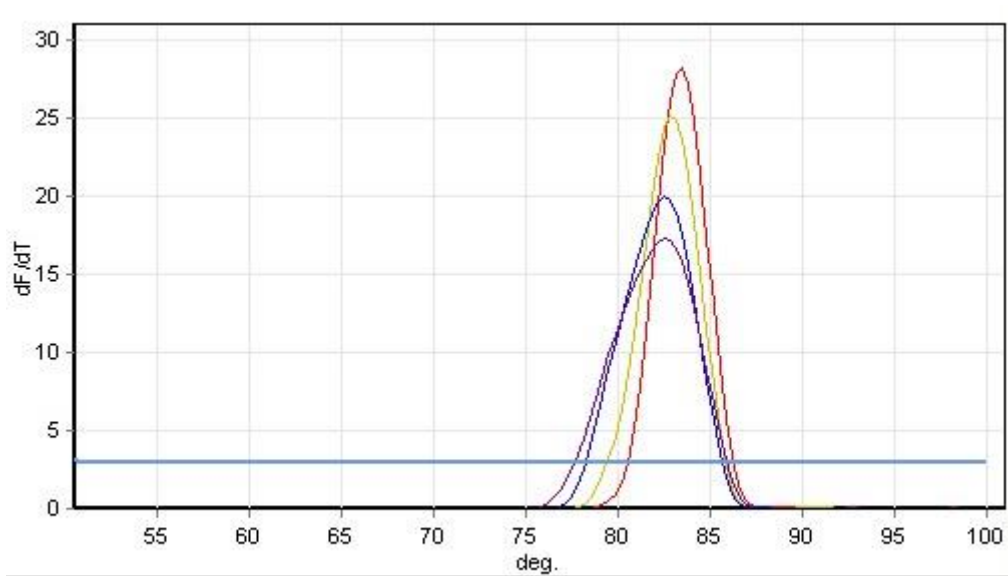
Bakteri yoğunlukları 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 cfu/ml olarak hazırlanan serum ve tam kan ile dilüe edilmiş örneklerden serum ve tam kandan DNA izolasyonu yapmaya uygun olan Thermo scientific GeneJet Whole Blood genomic DNA Purification kit ile DNA izolasyonu yapıldıktan sonra, Gz-PZR reaksiyonları kuruldu. Amplifikasyon sonrasında C_T ve erime eğrisi değerlerine bakıldı. Bakteri yoğunluğu ile paralel olarak, konsantrasyonu fazla olan bakteri süspansiyonlarından daha fazla DNA ve buna bağlı amplifikasyon grafiğinde sola kayan, daha kısa sürede amplifiye olmuş düşük C_T değeri (cycle threshold) kaydedildi.

Şekil 2’de gösterilmiş olan amplifikasyon grafiğinde kontrol serumu ile dilüe edilmiş 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 cfu/ml konsantrasyonlarda bakteri süspansiyonu içeren örneklerden ekstrakte edilen ve amplifiye olan DNA’ların C_T değerleri yaklaşık olarak sırasıyla 23, 28, 33 ve 37 olarak saptandı. Bakteri yoğunluğu 10^4 cfu/ ml’den daha düşük konsantrasyonda (10^3 ve 10^2 cfu/ml) bakteri içeren örneklerden herhangi bir sinyal alınamadı. Aynı deney tam kan ile dilüe edildiğinde yine benzer sonuçlar bulundu (Şekil 4). Deneyler iki ayrı thermal cycler cihazında tekrar edildi. Alınan amplifikasyon sinyallerinin *Brucella* bakterisine özgü olup olmadığını anlamak için yapılan erime eğrisi analizi sonucunda anlamlı amplifikasyon sinyali veren örneklerin hepsinde ortak erime eğrisi kaydedildi (Şekil 3).



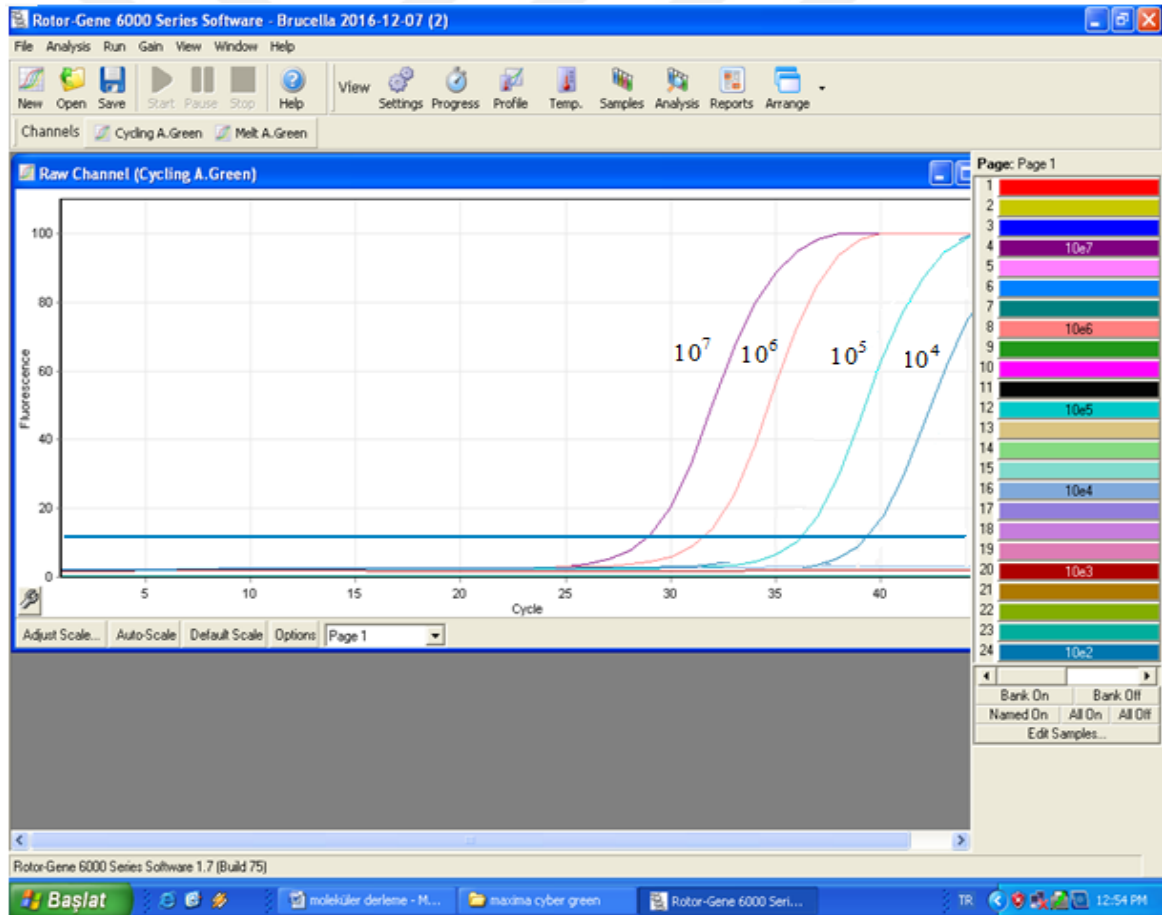
Şekil 2. Rotor-gene, Corbett RG 6000 Thermal cycler cihazında; serum ile dilüe edilen 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 cfu/ml konsantrasyonlarda Maxima SYBR Green 2x Master Miks ile yapılan monopleks Gz-PZR sonuçları.

Reaksiyonun erime eğrisi analizi incelendiğinde amplifiye olan 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 cfu/ml derişime sahip örneklerin hepsi ortak bir erime eğrisi grafiğı sergiledi. Bu reaksiyonda erime derecesi 84 °C olarak saptandı. Aşağıda amplifiye olan DNA'ların erime eğrisi analizi gösterilmiştir (Şekil 3).



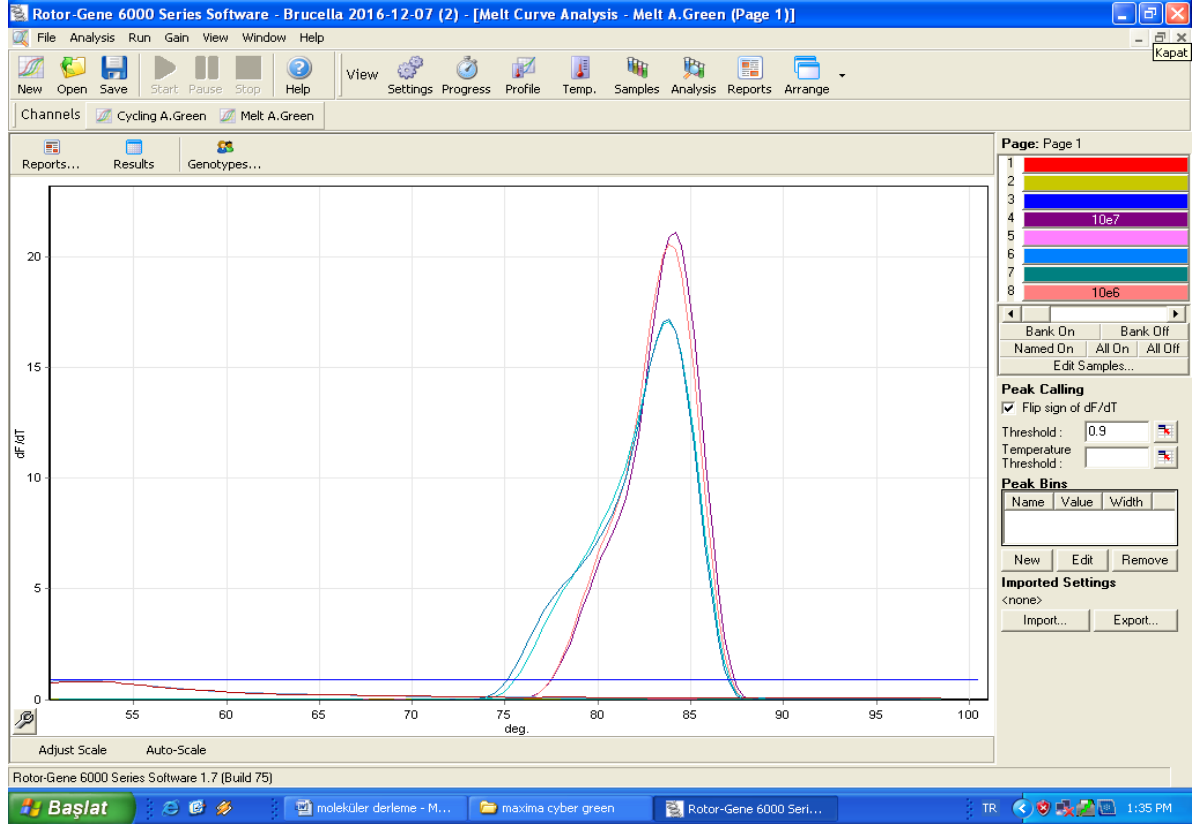
Şekil 3. $10^7, 10^6, 10^5, 10^4$ cfu/ml konsantrasyonlarda Maxima SYBR Green 2x Master Miks ile monopleks uygulanan Gz-PZR erime eğrisi analizi sonuçları. (ROTOR GENE, Corbett RG 6000)

Aynı yoğunlukta bakteri içeren tam kan ve serum ile dilüe edilerek hazırlanmış örneklerin, Maxima SYBR Green 2x Master miks ile ROTOR GENE, Corbett RG 6000 thermal cyclers cihazında monopleks uygulanan reaksiyonlarının performansları benzer bulundu (Şekil 2 ve 4). Tam kan ile 10^4 cfu/ml'den daha düşük konsantrasyonda hazırlanmış örneklerde sinyal alınamadı. Amplifiye olan DNA'ların C_T değerleri tam kan ile çalışıldığında yaklaşık olarak sırasıyla 28, 32, 37 ve 39 olarak saptandı. Saptama limiti prob kullanılmayan bu reaksiyonlarda 10^4 cfu/ml olup tam kan ve serum örnekleri için aynı performansı sergiledi.



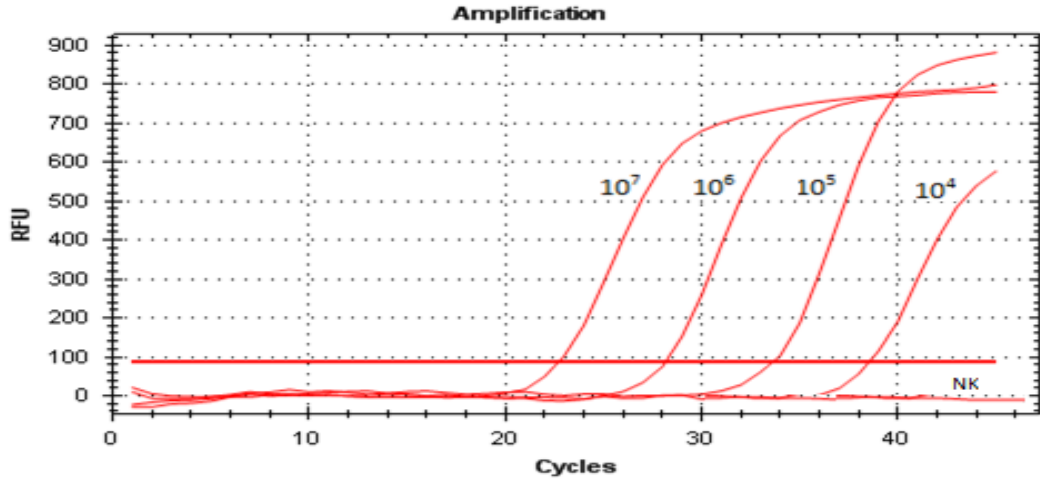
Şekil 4. Tam kan ile $10^7, 10^6, 10^5, 10^4$ cfu/ml konsantrasyonlarda hazırlanmış, Maxima SYBR Green 2x Master Miks ile kurulan monopleks Gz-PZR sonuçları. (ROTOR GENE, Corbett RG 6000)

Reaksiyonun erime eğrisi analizine bakıldığında; çoğalan ampikonların erime sıcaklığı 84 °C olarak ölçülmüştür (Şekil 5). Amplifiye olan tüm DNA'ların ($10^7, 10^6, 10^5, 10^4$ cfu/ml) erime derecesi pikleri ortaktır.



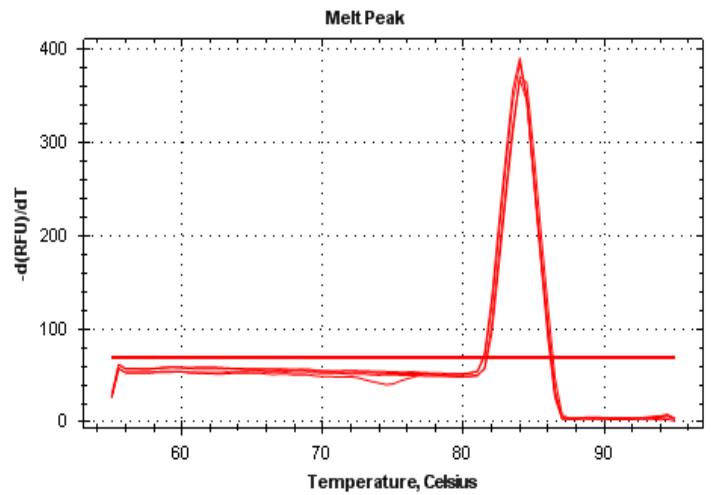
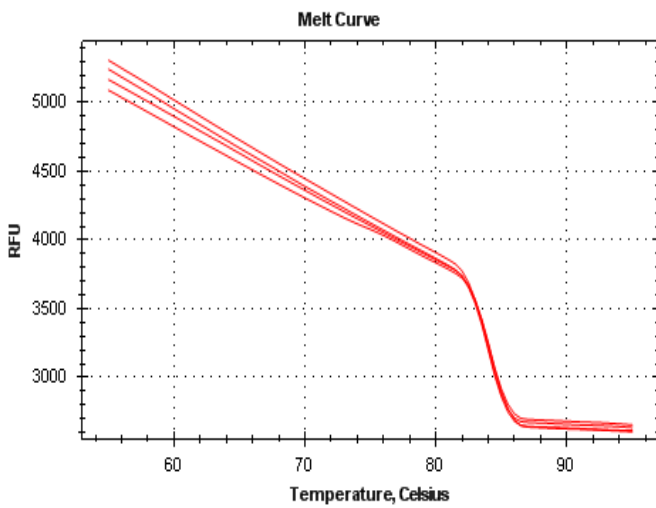
Şekil 5. Tam kan ile dilüe edilmiş $10^7, 10^6, 10^5, 10^4$ cfu/ml konsantrasyonlardaki örneklerin erime eğrisi analizi sonuçları. (ROTOR GENE, Corbett RG 6000)

Aynı deney BIO-RAD, CFX-96 C1000 Touch Real-time system cihazında tekrarlandı. Kurulan reaksiyonlarda 10^4 cfu/ml'den daha düşük yoğunlukta bakteri içeren örneklerde amplifikasyon gözlenmedi. $10^7, 10^6, 10^5, 10^4$ cfu/ml konsantrasyonlardan elde edilen DNA'lar ile gerçekleştirilen amplifikasyonun C_T değerleri yaklaşık olarak sırasıyla 23, 28, 34 ve 39 olarak belirlendi (Şekil 6)



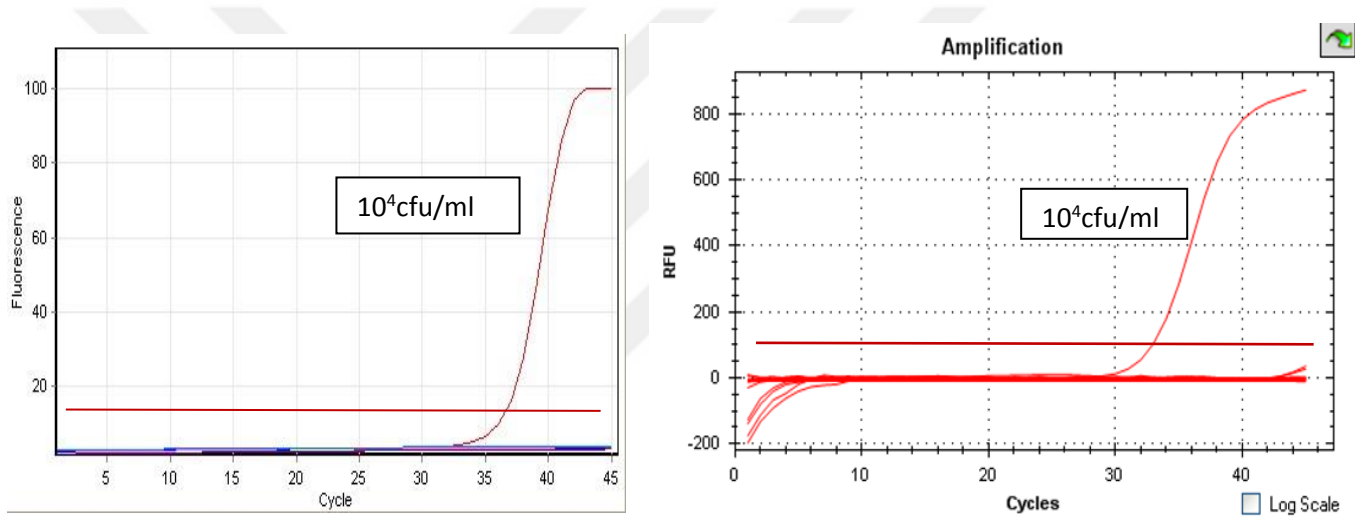
Şekil 6. BIO-RAD, CFX-96 C1000 Touch Real-time system cihazında tam kan ile dilüe edilen 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 cfu/ml konsantrasyonda Maxima SYBR Green 2x Master Miks ile monopleks kurulmuş Gz-PZR sonuçları.

Oluşan ürünlerin primer-dimerlerin oluşturduğu nonspesifik bağlanmalardan ayırt etmek için yapılan erime eğrisi analizleri bu cihazda da test edildi (Şekil 7). Amplikonların T_M dereceleri (Melt temprature, erime derecesi) Rotor-Gene cihazında olduğu gibi 84 °C olarak belirlendi.



Şekil 7. 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 cfu/ml derişimde Maxima SYBR Green 2x Master Miks ile yapılan Gz-PZR erime eğrisi analizi sonuçları

Bakteri derişimi 10^4 , 10^3 , 10^2 cfu/ml olan tam kan ve serum katılarak hazırlanmış örnekler, Rotor gene ve Bio-rad Thermal cycler cihazlarında üç defa tekrarlandı. Prob kullanılmayan monopleks çalışılan bu Gz-PZR’de tam kan ve serum örnekleri için daha düşük saptama limitine ulaşılması amaçlandı. Ancak, iki cihazda da 10^4 cfu/ml’nin altında sinyal alınamadı. Dolayısıyla çalışmamızın farklı cihaz ve farklı klinik materyallerde saptama limiti değerlerinde farklılık gözlenmedi. Ancak tam kandan yapılan amplifikasyon grafikleri incelendiğinde Bio-rad ve Rotor gene cihazında C_T değerleri sırasıyla 34 ve 36,5 olarak belirlendi (Şekil 8).



Şekil 8. 10^4 , 10^3 , 10^2 cfu/ml konsantrasyonlarda (tam kan ile) Maxima SYBR Green 2x Master Miks kullanarak, Rotor gene Corbett RG 6000 ve Bio-rad CFX-96 C1000 Touch Real-time system cihazlarında yapılan Gz-PZR sonuçları.

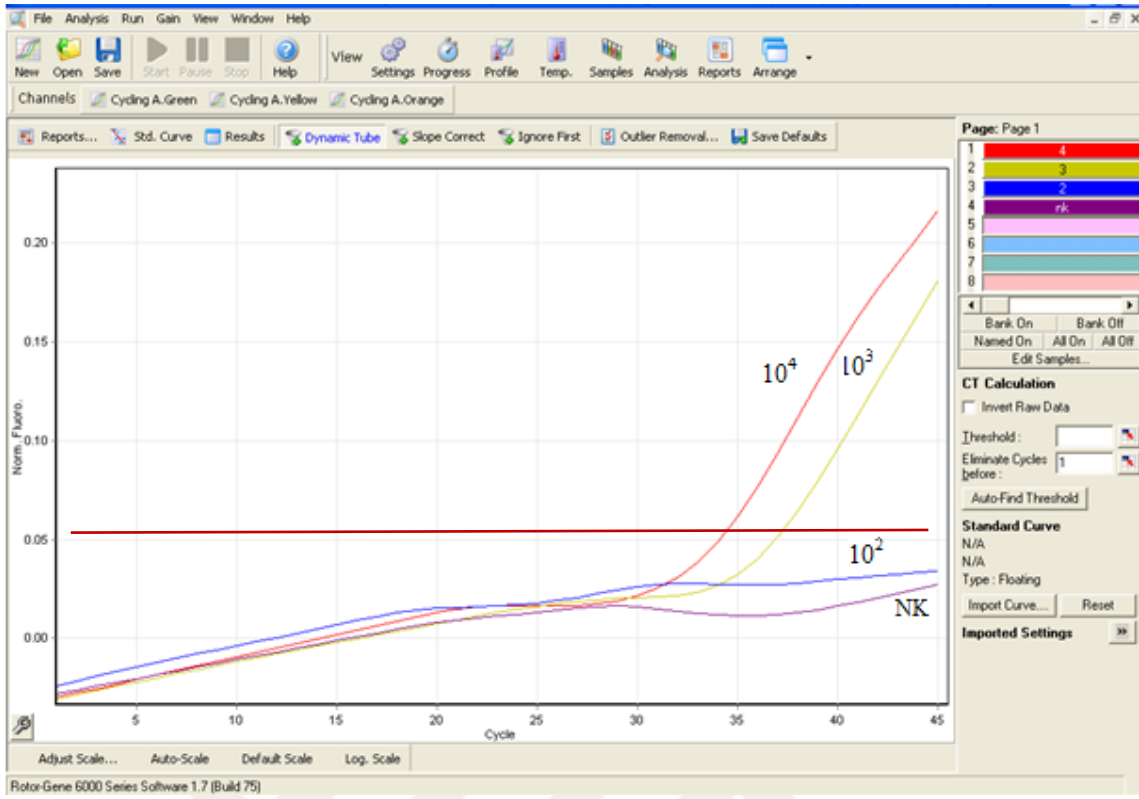
Sonuç olarak; Maxima SYBR Green 2x Master Miks ile monopleks olarak gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarında en düşük saptama limiti tam kan ve serum katılarak dilüe edilen örneklerde her iki cihazda da 10^4 cfu/ml bulundu. Duyarlığın artırılması ve daha düşük konsantrasyonlarda *Brucella* DNA’sını saptayabilmek için işaretli oligonükleotidlerin kullanıldığı bundan sonraki çalışmalarda prob bazlı Ampliqon multiplex Tempase 2x Master miks ve Quantitect multiplex 2x master miksleri ile mGz-PZR çalışmaları tekrarlandı.

4.1.1.2. Prob temelli Master Miksler ile yapılan mGz-PZR sonuçları

Prob temelli master miksler kullanıldığında, tam kan ve serum ile hazırlanmış örneklerde, daha düşük saptama limitine ulaşılarak duyarlılığın arttığı gözlemlendi. Quantitect multipleks 2x PCR Master miks ve Ampliqon multipleks Tempase 2x PCR Master mikslerin kullanıldığı çalışmada 10^3 cfu/ml konsantrasyonda anlamlı sinyal alındı. Çalışma; iki farklı ticari firmaya ait DNA izolasyon kitleri ve PCR master miksleri ile tekrarlandı.

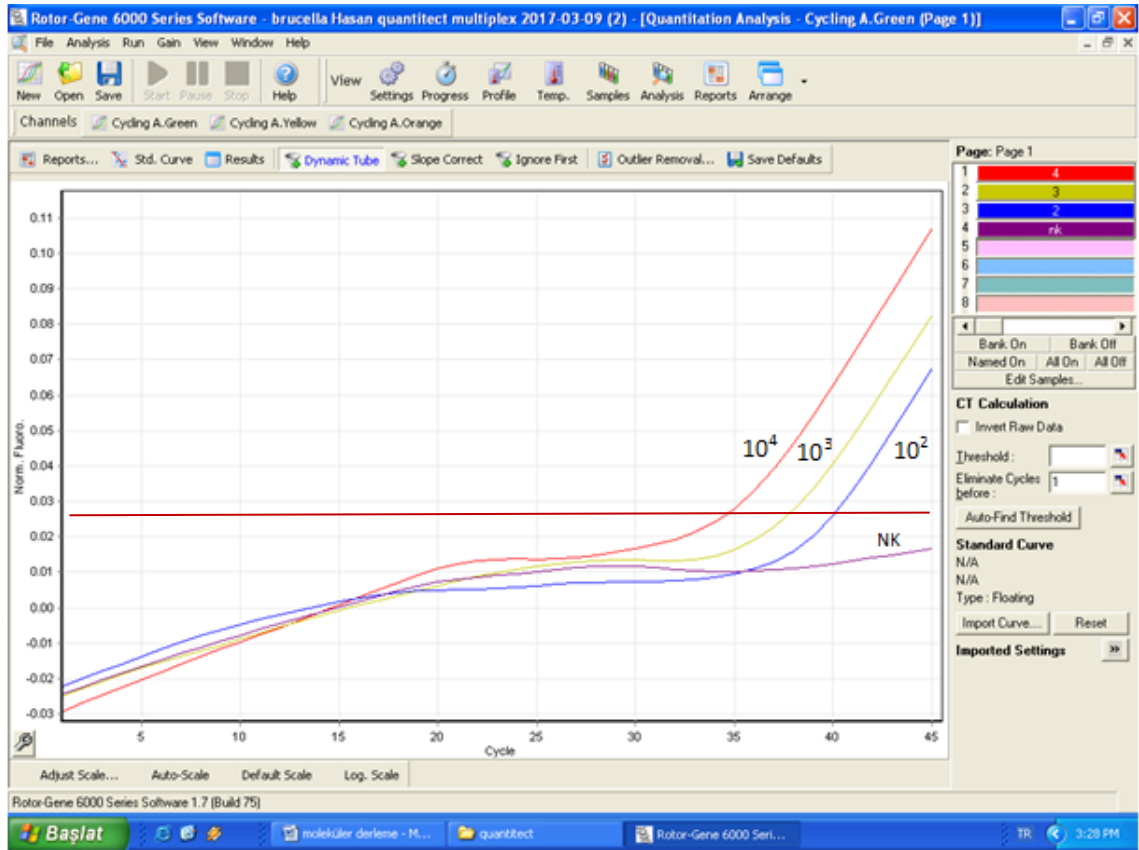
Thermo Scientific DNA izolasyon kit -Ampliqon Tempase PCR master miks ile yapılan çalışmalar: (Tam kan ve serum üzerinde yapılan çalışmalar)

Deney $10^4, 10^3, 10^2$ cfu/ml derişimde bakteri katılarak hazırlanan örneklerde, Thermo Scientific DNA izolasyon kit kullanarak ekstrakte edilen DNA'lar ile tekrarlandı. Rotor gene Corbett RG 6000 cihazında, Ampliqon Tempase 2x master miks ile kurulan reaksiyonlar sonucunda tam kan ve serum ile hazırlanan örneklerde benzer sonuçlar gözlemlendi. Serum ve tam kan eklenerek dilüe edilen 10^4 ve 10^3 cfu/ml konsantrasyonda *B. melitensis* bakterisi içeren örneklerden izole edilen DNA'lar ile gerçekleştirilen reaksiyonda anlamlı sinyal gözlenirken, 10^2 cfu/ml bakteri içeren örnekte amplifikasyon gözlenmedi (Şekil 9).



Şekil 9. Serum ile hazırlanan ve sırasıyla 10^4 , 10^3 , 10^2 cfu/ml konsantrasyonlardan elde edilmiş DNA'ların Ampliqon Tempase 2x master miks ile Rotor gene Corbett RG 6000 cihazında kurulan mGz-PZR sonuçları. (Kırmızı eğri 10^4 cfu/ml, sarı eğri ise 10^3 cfu/ml derişimdeki örneklerden izole edilen DNA'lara aittir.)

Deney aynı cihazda ikinci kez tekrarlandı. Gerçekleştirilen ikinci tekrar denemesinde 10^2 cfu/ml konsantrasyondaki örnekten izole edilen DNA'nın amplifiye olduğu gözlemlendi. Bakteri yoğunluğu 10^2 cfu/ml olarak hazırlanan numuneler (serum ve tam kan) ekstrakte edildiğinde reaksiyon başına ortalama 2 kopya DNA kalıbı içermektedir. Ancak prob kullanılmasına rağmen bu konsantrasyonda her zaman sinyal alınamadı. Aşağıda (şekil 10) 10^4 , 10^3 , 10^2 cfu/ml derişimdeki örneklere ait mGz-PZR amplifikasyon grafiğı gösterilmiştir. Bu reaksiyonda 2 kopya DNA amplifiye edildi. C_T değerleri amplifiye olan 10^4 , 10^3 , 10^2 cfu/ml örnekler için sırasıyla 35, 38 ve 40 olarak belirlendi.

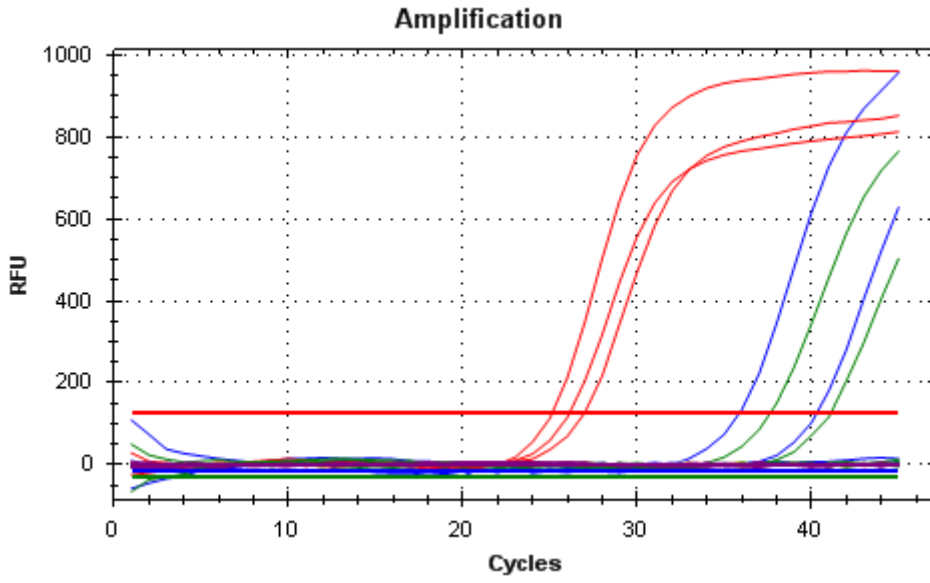


Şekil 10. Serum ile hazırlanan ve sırasıyla 10^4 , 10^3 , 10^2 cfu/ml konsantrasyonlardan elde edilmiş DNA'ların Ampliqon Tempase 2x master miks ile Rotor gene Corbett RG 6000 cihazında kurulan mGz-PZR sonuçları. (Kırmızı eğri 10^4 , sarı eğri 10^3 ve mavi eğri 10^2 cfu/ml derişimdeki örneklere aittir)

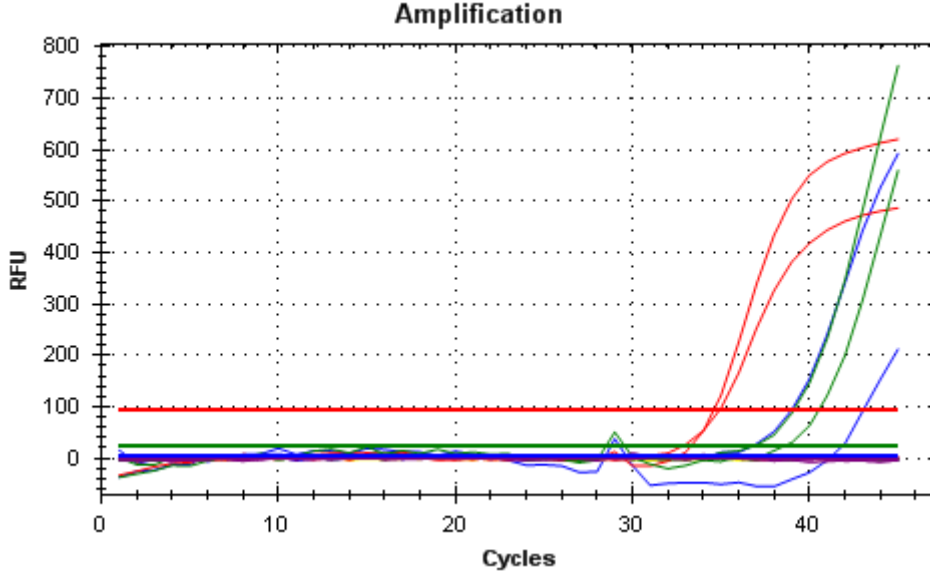
Deneyin BIO-RAD thermal cycler cihazındaki etkinliği ve saptama limiti Ampliqon Multiplex TEMPase 2x Master miks ile tekrarlandı. BIO-RAD cihazında tam kan ve serumdan izole edilen DNA'lar ile kurulan reaksiyonlarda 10^4 ve 10^3 cfu/ml bakteri içeren örneklerde amplifikasyon sağlandı. *Brucella* spp. ve *B. melitensis*'e ait sinyallerde C_T değerleri sırasıyla 10^4 cfu/ml için yaklaşık 35-37, 10^3 cfu/ml için ise 40-41 olarak belirlendi (Şekil 11). BIO-RAD cihazında ilk denemede, ekstrakte edilen 10^2 cfu/ml konsantrasyondaki serum örneklerinde amplifikasyon gözlenmesine karşın tam kan örneklerinde reaksiyonun inhibitör kontrolü olan GAPDH sinyali dışında sinyal alınamadı. Reaksiyonun negatif kontrolü örneklerle beraber işlendi. Aynı deney bu defa negatif kontrol, 10^3 ve 10^2 cfu/ml bakteri süspansiyonu içeren örnekler ile tekrarlandı. Serum ile hazırlanan 10^2 cfu/ml örneğinde ikinci denemede de amplifikasyon

sağlanırken, tam kan ile aynı derişimde hazırlanan örnekte üçüncü denemede sinyal alındı.

C_T değerleri, 10^3 cfu/ml örneğinde *Brucella* spp için 39, *B. melitensis* için 38, 10^2 cfu/ml örnek için sırasıyla 42 ve 40 olarak belirlendi (Şekil 12). BIO-RAD thermal cyclers cihazında gerçekleştirilen reaksiyonlar Rotor gene cihazındaki sonuçlar ile benzer bulundu. Reaksiyonun amplifikasyonuna ait grafikler şekil 11 ve 12’de gösterilmiştir.



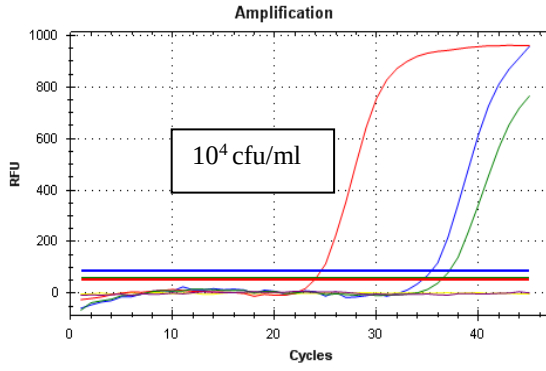
Şekil 11. BIO-RAD cihazında; negatif kontrol, 10^4 , 10^3 ve 10^2 cfu/ml yoğunlukta tam kan ile hazırlanmış örneklerin Amplikon master miks ile çalışılan mGz-PZR sonuçları



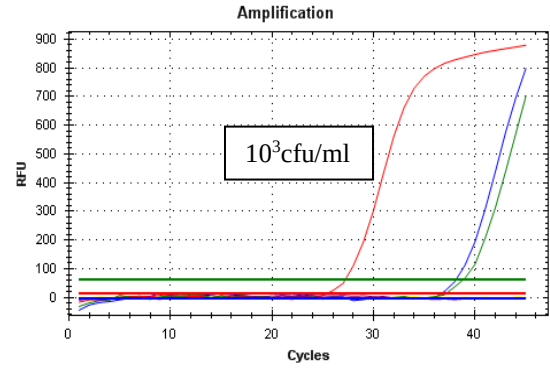
Şekil 12. BIO-RAD cihazında; negatif kontrol, 10³ ve 10² cfu/ml yoğunlukta serum ile hazırlanmış örneklerin Ampliqon master miks ile programlanan mGz-PZR sonuçları

Thermo Scientific DNA izolasyon kit -Quantitect master miks ile yapılan çalışmalar

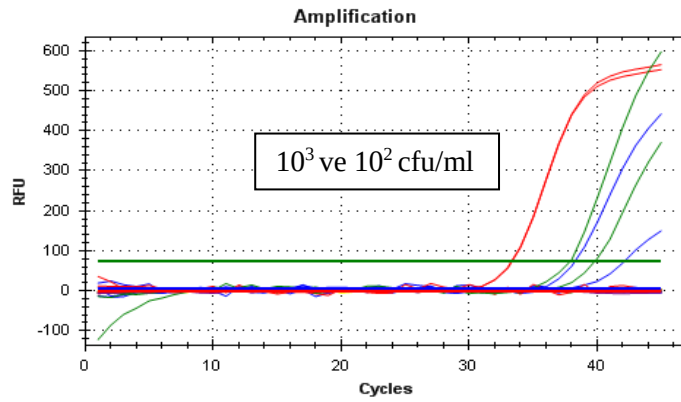
Daha düşük saptama limitine ulaşılması amaçlanan optimizasyon denemelerinde bu kez Quantitect multiplex 2x PCR master miks kullanarak çalışmalar tekrarlandı. Yine 10⁴, 10³, 10² cfu/ml konsantrasyonda örnekler serum ve tam kan ile hazırlandı. Bu çalışmada da ilk denemede 10² cfu/ml bakteri içeren örneklerden serumda amplifikasyon gözlenirken tam kan ile dilüe edilen örnekte GAPDH sinyali dışında herhangi bir sinyal alınmadı. Bakteri yoğunluğu 10⁴ ve 10³ cfu/ml olan örneklerde iki ayrı master miks ve iki farklı cihazda her zaman anlamlı sinyal alındı. Kurulan tüm reaksiyonlarda, negatif kontroller örneklerle beraber işlendi. Aşağıda sırasıyla 10⁴, 10³ cfu/ml yoğunlukta tam kan ile hazırlanmış örneklere ait amplifikasyon grafikleri gösterilmiştir. Şekil 13'te gösterilen grafikte *Brucella* spp.ve *B. melitensis*'e ait C_T değerleri sırasıyla 10⁴ cfu/ml için 34-36, 10³ cfu/ml için 38-38,5 olarak belirlendi. Optimizasyon çalışmaları 10⁴, 10³ ve 10² cfu/ml dilüsyonlarında tekrarlandı.



Reaksiyon 1



Reaksiyon 2



Reaksiyon 3

Şekil 13. Amplifikasyon grafikleri 3 ayrı reaksiyonda sırasıyla **Reaksiyon 1:** 10^4 ve Negatif kontrol, **Reaksiyon 2:** 10^3 ve Negatif kontrol, **Reaksiyon 3:** 10^3 , 10^2 cfu/ml ve Negatif kontrol. Tam kandan hazırlanmış örneklerin BIO-RAD cihazında Quantitect Multiplex 2x PCR master miks ile yapılan mGz- PZR sonuçları (Kırmızı sigmoidal eğriler GAPDH sinyallerine aittir. Mavi eğriler *Brucella* spp., yeşil eğriler ise *B. melitensis*'e ait amplifikasyon sinyalleridir. GAPDH: inhibitör kontrol, NK: negatif kontrol)

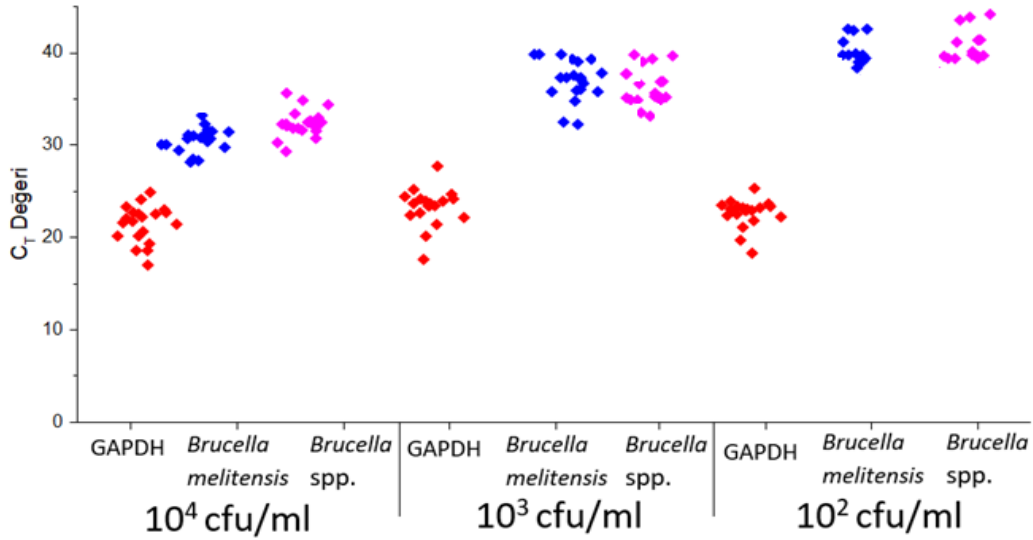
Sonuç olarak; Bio-rad ve Rotor-Gene cihazlarında Quantitect multiplex 2x master miks kullanarak serum ve tam kan ile hazırlanmış örneklerde 10^3 cfu/ml derişimde her zaman amplifikasyon sağlandı. Daha düşük yoğunluktaki dilüsyonlarda (10^2 cfu/ml) ise serum ile çalışıldığında çoğunlukla amplifikasyon gerçekleşti. Ancak tam kan örneklerinde bazı çalışmalarda sinyal alınmasına karşın deneylerin çoğunda sonuçlar negatifti.

Thermo DNA izolasyon kiti ile ekstrakte edilen 10^4 , 10^3 ve 10^2 cfu/ml bakteri içeren serum ve tam kan örneklerinde, Quantitect ve Ampliqon master miksleriyle farklı zamanlarda yapılan 10'ar çalışmanın sonuçları Tablo 4'te gösterilmiştir. Thermo Scientific kit ve iki ayrı master miks kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde C_T değerleri 10^4 cfu/ml derişimdeki örneklerde *Brucella* spp. ve *B. melitensis* için 30.75 ile 36.30 arasında değişmektedir. Thermo-Ampliqon kombinasyonunun denendiği 10^4 cfu /ml konsantrasyonda tam kan ve serumdan elde edilen amplifiye olmuş DNA'ların C_T değerleri ortalaması *B. melitensis* için sırasıyla 34.65 ve 33.15'tir. Derişimi 10^3 cfu /ml örnekler için sırasıyla 37.63- 37.25, 10^2 cfu/ml örnekler için ise sırasıyla 41.02- 40.25 olarak hesaplandı. Thermo ekstraksiyon kiti-Quantitect master miks kombinasyonu ile çalışıldığında 10^4 , 10^3 ve 10^2 cfu/ml derişimde hazırlanan tam kan ve serum örnekleri Thermo kit ile DNA izolasyonu yapıp mGz-PZR reaksiyonu kurulduğunda *B. melitensis* için C_T değeri ortalaması sırasıyla; 33.36-32.47, 37.07-36.55 ve 40.75-39.15'tir. GAPDH ve *Brucella* spp. için de farklı dilüsyonlarda ayrı master miksler ile kurulan reaksiyonlarda C_T değerleri ortalaması hesaplandı. Amplifikasyon tüpü içerisinde düşük konsantrasyonda DNA kalıbı (10^2 cfu/ml) içeren örneklerinin negatif olması durumunda aynı reaksiyon ikinci kez tekrar edildi.

Bakteri yoğunluğu 10^2 cfu/ml olan 10'ar adet hazırlanmış numuneler, Ampliqon master miks ile çalışıldığında ilk denemede tam kan için altı (%40), serum örneklerinde yedi (%70) pozitif olarak kaydedildi. Sadece GAPDH sinyali alınan tam kan ve serum örneklerin ikinci defa tekrarlanan reaksiyonunda tam kan için üç, serum için ise sadece bir örnekte *Brucella* spp.'nin amplifiye olduğu gözlemlendi. Toplam pozitiflik bu durumda tam kan için %70 ve serum örneklerinde ise %80 bulundu. Quantitect master miks kullanıldığında toplam pozitiflik serum örneklerinde %80, tam kan örneklerinde ise %70 olarak saptandı. Farklı master miksler ile kurulan reaksiyon denemelerinde amplifiye olan *Brucella* primerleri ile internal kontrol primerlerinin C_T değerlerinin grafiksel dağılımı şekil 14'te gösterilmiştir.

Tablo 4: Thermo Scientific DNA izolasyon kit kullanılarak yapılan 10 ayrı mGz-PZR sonuçları

Amplifikasyon Master miks	10 ⁴ cfu/ml (n=10)			10 ³ cfu/ml (n=10)			10 ² cfu/ml (n=10)		
Ampliqon 2x Master miks	B.mel.	Brucella spp.	GAPDH	B.mel.	Brucella spp.	GAPDH	B.mel.	Brucella spp.	GAPDH
Tam kan									
C_T değeri ort.	34.65	34.02	22.96	37.63	36.92	23.05	41.02	40.42	22.87
Total pozitiflik	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	4/10	7/10	10/10
Serum									
C_T değeri ort.	33.15	32.92	25.26	37.25	36.82	24.94	40.25	39.72	25.04
Total pozitiflik	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	7/10	8/10	10/10
Quantitect 2x Master miks									
Tam kan									
C_T değeri ort.	33.36	33.06	22.27	37.07	36.32	22.96	40.75	39.45	23.03
Total pozitiflik	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	7/10	5/10	10/10
Serum									
C_T değeri ort.	32.47	32.22	23.28	36.55	36.12	25.26	39.15	39.96	24.04
Total pozitiflik	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	8/10	7/10	10/10

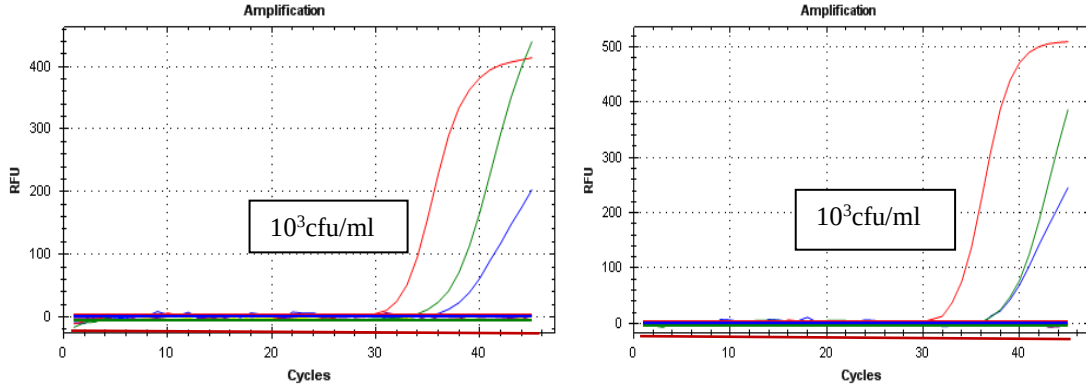


Şekil 14. Thermo DNA izolasyon kiti ve farklı master master miksler (Ampliqon ve Quantitect) ile kurulan reaksiyonlarda C_T değerlerinin grafiksel dağılımı. * Kümelenmiş kırmızı kareler GAPDH, mavi kareler *B. melitensis* ve pembe kareler *Brucella* spp.'yi simgelemektedir.

Norgen Biotek DNA izolasyon kit-Quantitect master miks ve Ampliqon Tempase master miks ile yapılan çalışmalar (sadece tam kan örneklerinde yapılan alışmalar)

Norgen Biotek Blood DNA isolation mini kit'in sadece tam kandan DNA izolasyonuna olanak sağlaması dolayısıyla bu kit ile yapılan çalışmalar tam kan ile gerçekleştirilmiştir (www.norgenbiotek.com). Tam kan rnekleri Norgen DNA izolasyon kiti ile işlendikten sonra iki ayrı master miks ve farklı thermal cycler cihazlarında etkinlikleri araştırıldı. Stok olarak 10^4 cfu/ml bakteri içeren karışım 1/10 kat dilüe edilerek 10^3 , 10^2 cfu/ml'lik örnekler hazırlandı. Her bir dilüsyondan kit protokolleri dikkate alınarak DNA ekstraksiyonu yapıldı. Ekstrakte edilen DNA'lar ve reaksiyonun negatif kontrolü ile birlikte Quantitect 2x Master miks ve Ampliqon master mikslerin kullanıldığı deneyler eş zamanlı Rotor gene ve Bio-rad cihazında iki seri halinde çalışıldı. Aynı deney gün içerisinde ikinci kez cihazlarda tekrarlandı. Her iki cihazda da mililitrede 10^4 ve 10^3 cfu/ml derişimdeki örneklerde her zaman amplifikasyon gözlendi. Ancak mililitrede 10^2 cfu/ml bakteri içeren tam kan örneğinden izole edilen DNA'ların amplifikasyonu thermal cycler cihazlarının ikisinde de ilk denemede her zaman sağlanamadı.

Quantitect 2x Master miks kullanılan reaksiyonun C_T değerleri 10^4 cfu/ml için Rotor gene cihazında *Brucella* spp. ve *B. melitensis* için sırasıyla 37 ve 37.5 olarak, BIO-RAD cihazında ise sırasıyla 37 ve 36 olarak tespit edildi. Ampliqon master miks ile kurulan reaksiyonda *B. melitensis* için C_T değeri iki cihazda da sırasıyla 36.75 ve 37.5 olarak belirlendi. BIO-RAD cihazında Ampliqon ve Quantitect master mikslerinin kullanıldığı reaksiyonda *B. melitensis* için C_T değeri 10^3 cfu/ml olan örnekte sırasıyla 40 ve 38 olarak kaydedildi. Aşağıda (şekil 15) aynı cihazda farklı master miksler ile negatif kontrol ve 10^3 cfu/ml yoğunluktaki örneğin amplifikasyon grafiği gösterilmiştir.



1. Reaksiyon

2. Reaksiyon

Şekil 15. Negatif kontrol ve 10^3 cfu/ml yoğunluktaki örneklerinin amplifikasyon grafiği
1.Reaksiyon: Ampliqon Tempase Master miks ile, **2.Reaksiyon:** Quantitect 2x Master miks ile BIO-RAD cihazında gerçekleştirilen mGz- PZR grafikleridir.

Norgen DNA izolasyon kit ile 10^4 , 10^3 ve 10^2 cfu/ml bakteri içeren tam kan örnekleri her bir konsantrasyondan 10'ar adet hazırlanıp DNA izolasyonu yapıldı. İki ayrı prob temelli master miks ile çalışıldığında 10^4 ve 10^3 cfu/ml konsantrasyonda her zaman amplifikasyon sağlandı. Fakat Ampliqon master miks kullanıldığında derişimi 10^2 cfu/ml olan 10 adet örneğin altısında *Brucella* spp. ve *B. melitensis* amplifiye olurken ikinci denemede negatif olan dört örnekten birinde sadece *Brucella* spp., bir tanesinde de sadece *Brucella melitensis* amplifiye oldu. Toplam pozitiflik bu derişimde Ampliqon master miks ile %70 olarak bulundu. Quantitect master miks ile gerçekleştirilen amplifikasyonda ise 10^2 cfu/ml derişimdeki 10 adet örneğin beşinde *B. melitensis* ve *Brucella* spp. amplifiye olurken, negatif olarak saptanan numunelerin ikinci denemesinde üç örnekte pozitiflik bulundu. Pozitif bulunan üç örneğin birinde *Brucella* spp. ve *B. melitensis* primerleri amplifiye olurken diğer ikisinde sadece *Brucella* spp. primerlerinin çoğaldığı gözlemlendi. Total pozitiflik oranı bu konsantrasyonda (10^2 cfu/ml) %80 olarak bulundu. *B. melitensis* için C_T değerleri ortalaması yüksek konsantrasyondan (10^4 cfu/ml) başlayarak Ampliqon ve Quantitect master miks için sırasıyla 35.07-34.37, 38.83-37.74 ve 41.40-40.90 olarak hesaplandı. Ayrıca internal kontrol ve *Brucella* spp. için C_T değerleri ortalaması hesaplandı. Toplam reaksiyon sayıları ve C_T değerleri ortalaması tablo 5'te gösterildiği gibidir.

Tablo 5: NORGEN Biotek DNA izolasyon kit kullanılarak yapılan 10 ayrı mGz-PZR sonuçları

Amplifikasyon Master miks	10 ⁴ cfu/ml (n=10)			10 ³ cfu/ml (n=10)			10 ² cfu/ml (n=10)		
Ampliqon 2x Master miks	B.mel.	Brucella spp.	GAPDH	B.mel.	Brucella spp.	GAPDH	B.mel.	Brucella spp.	GAPDH
Tam kan									
C_T değeri ort.	35.07	34.09	26.93	38.83	37.42	26.35	41.40	41.52	26.82
Total pozitiflik	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	7/10	7/10	10/10
Quantitect 2x Master miks									
Tam kan									
C_T değeri ort.	34.37	34.56	26.21	37.74	37.01	25.86	40.90	40.63	25.73
Total pozitiflik	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	6/10	8/10	10/10

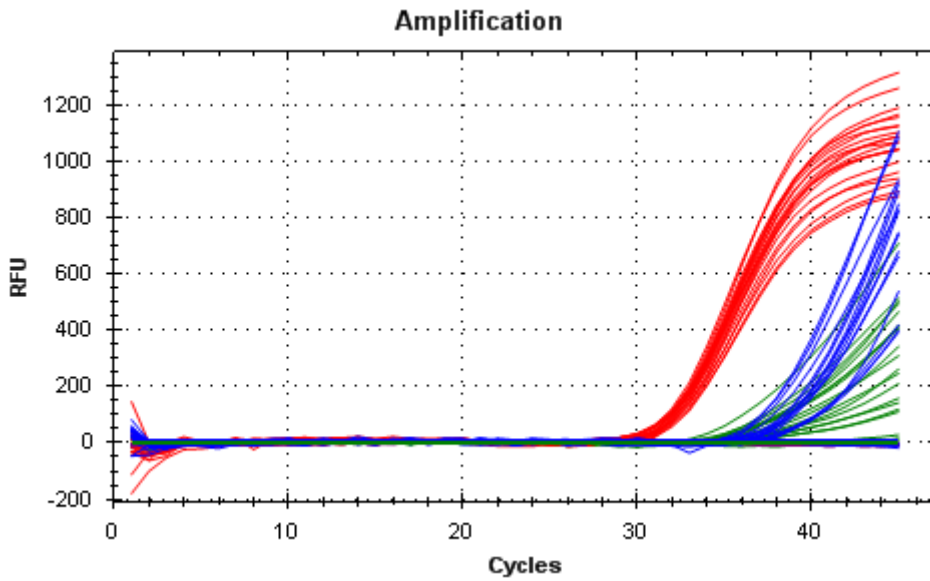
4.2. Prob Temelli mGz-PZR Yönteminin Validasyon Çalışmaları

Validasyon çalışmalarına geçmeden önce yukarıda gerçekleştirilen en düşük saptama limitinin belirlenmesine yönelik *Thermo-Ampliqon* ve *Thermo-Quantitect* kombinasyonu kitler ile master mikslerin kullanıldığı tüm çalışmalarda reaksiyonlar arasında belirgin bir fark gözlenmedi. Bu yüzden Ampliqon master miksin maliyet olarak Quantitect master miksten daha ucuz olması ve Thermo Scientific DNA pürifikasyon kitinin tüm klinik örneklerden DNA izolasyonuna olanak sağlaması nedeniyle, yöntemimizin validasyon çalışmaları Thermo Scientific kit ve Ampliqon master miks ile serum örneklerinde yapılmıştır. Yöntem validasyonu; genel bilgiler bölümünde sunulmuş olan ve Tablo 3'te de bahsedildiği gibi kalitatif nükleik asit saptayan testlerde asgari düzeyde gerekli kriterler baz alınarak sağlandı. Validasyon çalışmalarında yüksek pozitif olarak 10⁴ cfu/ml derişimde negatif serum katılarak hazırlanmış *Brucella* bakterisi içeren örnekler, düşük pozitif olarak da 10³ cfu/ml derişimdeki örnekler referans alındı. Bunun sebebi; bu konsantrasyonlarda hazırlanan örneklerin DNA izolasyonu yapıldıktan sonra farklı cihazlar ve farklı master miksler ile prob kullanarak gerçekleştirilen amplifikasyon reaksiyonlarında her zaman %100 pozitiflik saptamış olmamızdır.

Thermo DNA izolasyon kiti ve Ampliqon PCR master miks ile yapılan validasyon çalışmaları

4.2.1. Duyarlılık ve Özgüllük kriterlerinin validasyonu

Thermo-Ampliqon kombinasyonu ile gerçekleştirdiğimiz yöntemin duyarlılık çalışmasında; 10 adet yüksek pozitif (10^4 cfu/ml) ve 10 adet düşük pozitif (10^3 cfu/ml) örnekler ile internal kontrol ve negatif kontrol örnekleri aynı reaksiyon koşullarında işlendi. Yapılan deney sonucunda yüksek pozitif ve düşük pozitif DNA kopyası içeren numunelerin hepsinde amplifikasyon gözlemlendi. Bu örneklerin C_T değerlerinin 34 ile 40 arasında değiştiği belirlendi. Aşağıdaki grafikte 10 adet yüksek pozitif, 10 adet düşük pozitif ve negatif kontrol örnekleri Thermo kit ile ekstrakte edildikten sonra Ampliqon master miks ile gerçekleştirilen amplifikasyon gösterilmiştir. (Şekil 16)



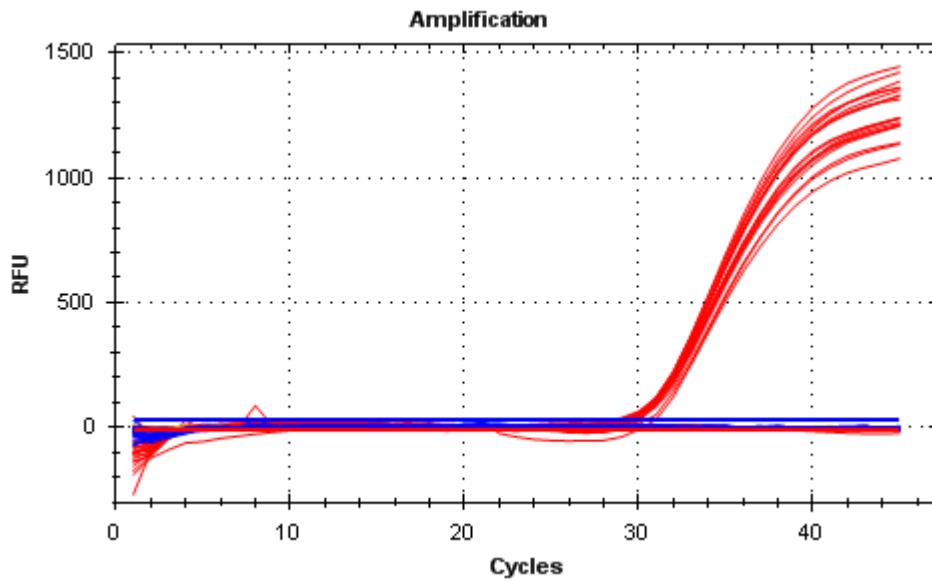
Şekil 16. 10 yüksek pozitif (10^4 cfu/ml), 10 düşük pozitif (10^3 cfu/ml) örnekler ile kaydedilen mGz-PZR sonuçları (n=20)

Yöntemin duyarlılık çalışmaları ve validasyonu simüle serum örneklerinde pozitif kontrol örnekleri ile yapıldı. Brusellozun laboratuvar tanısında referans alınabilecek standart bir metot bulunmadığından valide edilen yöntemin duyarlılığı düşük pozitif yani 10^3 cfu/ml sınır değeri dikkate alınarak değerlendirildi. Bu sınır değerine göre yöntemin duyarlılığı yüksek bulunmuştur.

Yöntemimizin özgüllük çalışmalarında kullanılan serum örnekleri CDC'nin bruselloz tanı kriterleri referans alınarak değerlendirildi (41).

Klinik materyalin DNA izolasyonu Thermo Scientific GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification kit kullanılarak sağlandı. Daha sonra ekstraksiyon ürünü DNA'lar ile mGz-PZR kuruldu. Sonuç olarak 20 adet negatif serum ekstrakte edilip kurulan reaksiyonda sadece internal kontrol olan GAPD'e ait amplifikasyon eğrileri kaydedildi. Dolayısıyla herhangi bir *carry-over* kontaminasyonu veya yalancı pozitiflik saptanmadı. Özgüllüğün değerlendirilmesi için bruselloz kliniği bulunmayan serolojik ve PZR testleri ile negatif olduğu konfirme edilen hastaların serum örnekleri tekrar çalışılmıştır. Kurulan reaksiyon sonucunda yöntemimizin özgüllüğü %100 olarak belirlendi.

Aşağıda Thermo DNA izolasyon kiti ve Ampliqon master miks kullanarak yöntemin özgüllük çalışmasına ait amplifikasyon grafiği gösterilmiştir (Şekil 17).



Şekil 17. Özgüllük kriterinin değerlendirilmesinde; Thermo DNA izolasyon kiti ve Ampliqon Master miks kullanarak yapılan mGz-PZR sonuçları (**n=20**)

4.2.2. Doğruluk ve Kesinlik Kriterlerinin Belirlenmesi

Doğruluğun valide edilmesinde düşük pozitif, yüksek pozitif ve negatif olmak üzere üç parametre tek çalışmada (run) analiz edildi. Yüksek pozitif (10^4 cfu/ml) örnekten üç adet, düşük pozitif (10^3 cfu/ml) ve negatif örneklerden de üçer adet hazırlandı. Daha sonra örnekler Thermo kit yardımıyla DNA izolasyonu yapıp mGz-PZR kuruldu. Yüksek pozitif ve düşük pozitif olarak hazırlanan örneklerin hepsinin amplifikasyonu sağlandı. Negatif olarak hazırlanan üç adet örneğin amplifikasyonunda sadece internal kontrol pozitif olarak bulundu.

Kesinlik çalışması; deney içi (run içi) ve deneyler arası (farklı günlerde gerçekleştirilen run) olarak gerçekleştirildi. Deney içi tekrarlanabilirlikte yüksek pozitif (10^4 cfu/ml) ve düşük pozitif örnekler (10^3 cfu/ml) aynı çalışmada üçer adet tek reaksiyonda çalışıldı. Aynı reaksiyonda üç adet yüksek pozitif, üç adet düşük pozitif ve bir adet negatif kontrol olarak çalışılan örneklerden sadece altı tanesi (üç yüksek pozitif ve üç düşük pozitif) pozitif bulundu.

Deneyler arası tekrarlanabilirlik çalışmalarında ise yüksek pozitif ve düşük pozitif örnekler üç ayrı günde birer adet hazırlanıp reaksiyon tamamlandı. Farklı günlerde kurulan düşük pozitif ve yüksek pozitif örnekler her zaman pozitif olarak saptandı. Kurulan deneylerin her aşamasında reaksiyonun negatif kontrolü örneklerle beraber işlendi. Doğruluk ve kesinlik parametreleri düşük pozitif yani 10^3 cfu/ml sınır değeri standart alınarak belirlendi. Yöntemimizin deney içi ve deneyler arası tekrarlanabilirlik kriterlerinin geçerliliği tablo 6'da gösterildiği üzere sağlanmıştır.

Tablo 6. Yöntemimizin Validasyon Sonuçları

Kontroller

Doğruluk	<i>B. melitensis</i>	<i>Brucella</i> spp.	GAPDH (İnternal kontrol)	Toplam
Pozitif (n=3)	3/3	3/3	3/3	3/3
Düşük pozitif (n=3)	3/3	3/3	3/3	3/3
Negatif (n=3)	0/3	0/3	3/3	3/3*
Duyarlılık**				
Pozitif (n=10)	10/10	10/10	10/10	10/10
Düşük pozitif (n=10)	10/10	10/10	10/10	10/10
Özgüllük				
Negatif (n=20)	0/20	0/20	20/20	20/20*
Kesinlik				
Deney içi 3'er kez				
Pozitif (n=1)	3/3	3/3	3/3	3/3
Düşük pozitif (n=1)	3/3	3/3	3/3	3/3
Kesinlik				
Deneyler arası (3 ayrı günde 1'er kez)				
Pozitif (n=1)	1/1	1/1	1/1	3/3
Düşük pozitif (n=1)	1/1	1/1	1/1	3/3

*: Reaksiyonda sadece GAPDH amplifiye olmuştur.

**: Brusellozun tanısında kesin sonuç verebilecek referans bir yöntem olmadığından, duyarlılık çalışmaları simule örnekler üzerinde yapılmıştır.

4.3. Valide Edilen Yöntemin Bruselloz Şüpheli Hasta Örneklerindeki Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Çalışmaya; Ankara Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği'ne Kasım 2016-Haziran 2018 tarihleri arasında bruselloz şüphesiyle başvuran ve en az bir serolojik test sonucu pozitif olan 27 hasta ile Erzurum Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları bölümüne bruselloz kliniği ile başvuran 30 hasta olmak üzere toplam 57 hasta dahil edildi. Hastaların yaşı 33 ay ile 66 yıl arasında değişmekteydi. Hastaların yaş ortalaması $25,85 \pm 18,97$ 'dir. Hastaların 34'ü (%59,6) erkek, 23'ü (%40,4) kadındı. Kırk bir hastanın kan kültürü sonucu mevcuttu. Kan kültürü istemi olmayan veya kan kültüründe negatiflik tespit edilen hastalardan STAT antikor titresi $\geq 1/160$ veya Coombs antikor titresi $\geq 1/320$ olan 36 (%63,1) hasta muhtemel tanılı olarak değerlendirildi. STAT antikor titresi $< 1/160$ ve Coombs titresi $< 1/320$ olarak belirlenen hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

4.3.1 Seroloji ve Kan Kültürü Pozitifliği Saptanan Hastalar

Kan kültürü istemi olan 41 hastanın 21'inde (%51,2) üreme tespit edildi. Tüm pozitif kan kültürlerinde konvansiyonel tanı testleri ile *Brucella* spp. identifiye edildi.

Kan kültürleri negatif bulunan 20 hastanın dördünün STAT antikor titresi 1/160'ın altında bulundu. Bu hastaların birinde STAT'da aglütinasyon gözlenmezken geriye kalan üç hastanın ise STAT antikor titresi 1/80 olarak belirlendi. Kan kültürü negatif olan 16 hastanın STAT titresi $\geq 1/160$ olarak kaydedildi.

Kan kültüründe *Brucella* üremesi saptanan 21 hastanın dördünde STAT antikor titresi 1/160'ın altında bulunurken kalan 17 hastanın STAT antikor titresi $\geq 1/160$ olarak tespit edildi. Kan kültür istemi olmayan 16 hastanın dokuzunda STAT titresi $\geq 1/160$, yedisinde ise $< 1/160$ olarak bulundu. Tüm hastaların RBT'si pozitif ve Coombs testi antikor titresi $\geq 1/320$ olarak kaydedildi.

Çalışmaya dahil edilen tüm hastalara ait *Brucella* seroloji sonuçları ve kan kültürü sonuçları Tablo 7'de gösterilmiştir. Buna göre hastaların kan kültür pozitifliği oranı %51,2, STAT ve Coombs testlerinde ise saptanan anlamlı pozitiflik oranı sırasıyla, %73,7 ve %100 olarak tespit edildi.

Tablo 7. Çalışmaya dahil edilen 57 klinik örneğin kan kültürü ve serolojik test sonuçları

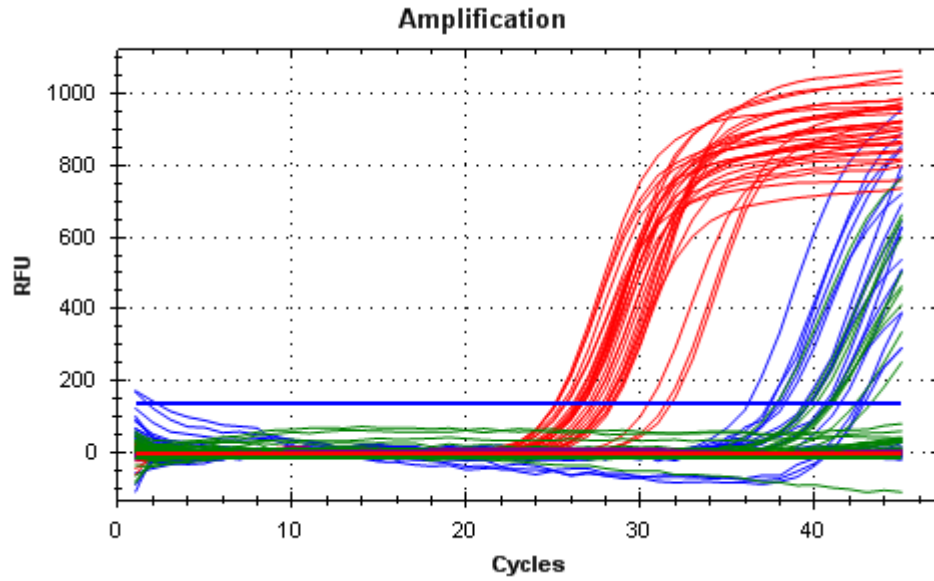
	Kan kültürü n=41 (%)	STAT n=57 (%)	Coombs test n=57 (%)
Pozitif	21 (51.2)	42 (73.6)	57 (100)
Negatif	20 (48.8)	15 (26.4)	0 (0)
Toplam	41	57	57

4.3.2. Hasta örnekleri üzerinde çalışılan mGz-PZR sonuçları

Toplamda 57 hastaya ait serum örneklerin 33'ünde (%57,8) mGz-PZR ile *B. melitensis* identifiye edildi. Kan kültüründe konvansiyonel yöntemlerle *Brucella* üremesi tespit edilen hastaların serum örneklerinde mGz-PZR yönteminin diagnostik etkinliği değerlendirildiğinde; kültür pozitif 21 hastanın serum örneklerinin tamamında

(%100) *B. melitensis* için mGz- PZR pozitif bulundu. Ayrıca kan kültüründe üreme olmayan 20 hastanın 12'sinin serum PZR'si pozitif olarak kaydedildi. Bu hastaların serolojik sonuçları incelendiğinde; iki hastanın STAT titresi $<1/160$ ve diğer 10 hastanın STAT antikor titresi $\geq 1/160$ olduğu gözlemlendi. Kan kültürü ve serum PZR'si pozitif olmasına rağmen dört hastanın STAT sonucu $1/160$ 'ın altında tespit edildi. Kan kültürü alınmayan 16 hastanın serum örnekleri analiz edildiğinde hastaların hiçbirinde PZR pozitifliği saptanmadı. Serum PZR pozitifliği kan kültürü pozitif olan hastalarda, negatif olanlara göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0.001$). Aynı hastaların serum PZR pozitifliği ile kültür üreme sonucu arasındaki uyum Cohen kappa istatistiği (κ) ile incelendiğinde Kappa indeksi ile 0.406 bulundu. Bu oran iki parametre arasında iyi uyum sergiledi.

Aşağıda 30 hastanın amplifikasyon grafiği gösterilmiştir (Şekil 18).



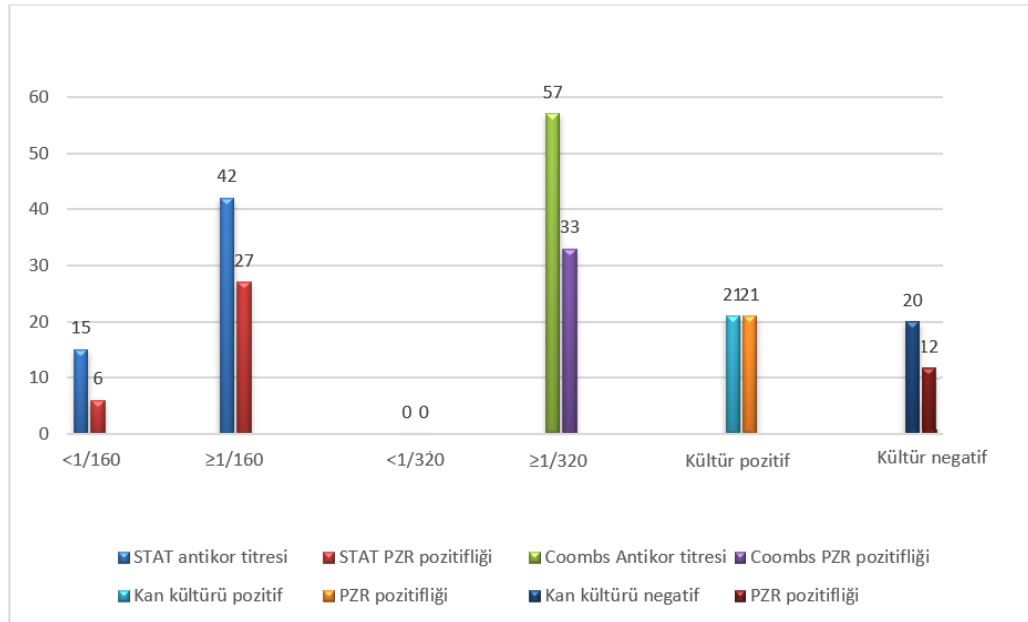
Şekil 18. PZR pozitif bulunan 24 hastanın amplifikasyon grafiği. (Kırmızı sigmoidal eğriler internal kontrol GAPDH, Mavi eğriler *Brucella* spp., yeşil eğriler *B. melitensis*'e aittir.)

Hastaların serum PZR pozitifliği ile konvansiyonel tanı testleri karşılaştırıldığında; konvansiyonel yöntemlerle pozitif bulunan örneklerdeki mGz-PZR pozitifliği oranı, negatif örneklere göre daha yüksek bulundu. (Tablo 8, Şekil 19)

Tablo 8: mGz-PZR ile konvansiyonel tanı testlerinin karşılaştırılması

Testler	mGz- PZR pozitifliği: n (%)
Kan kültürü (n=41)	
Negatif (n=20)	12 (60)*
Pozitif (n=21)	21 (100)
STAT (n=57)	
Negatif (n=15) (<1/160)	6 (40)**
Pozitif (n=42) (≥1/160)	27 (64.3)***
Coombs' test (n=57)	
Negatif (n=0) (<1/320)	0 (0)
Pozitif (n=57) (≥1/320)	33 (57.8)

*: Kan kültürü negatif, mGz-PZR pozitif olan 12 hastanın serolojik testlerinden en az biri anlamlı pozitifdir (STAT veya Coombs). **PZR pozitif, STAT antikor titresi <1/160 olan altı hastanın dördü aynı zamanda kan kültürü pozitif, ikisi kan kültürü negatif bulunmuştur. ***PZR pozitif, STAT titresi ≥1/160 olan 27 hastanın 17'sinde kan kültüründe *Brucella* üremesi tespit edilmiştir. Diğer 10 hastanın ise kan kültüründe üreme tespit edilmemiştir.

**Şekil 19.** mGz-PZR pozitifliği ve serolojik testlerin grafiksel dağılımı

4.3.3. Üreme sinyali veren Kan kültür şişeleri üzerinde yapılan mGz-PZR sonuçları

Serum örneklerinde olduğu gibi aynı DNA izolasyon protokolü kültür şişesinden alınan örneklerle de uygulandı. Rutin bakteriyoloji laboratuvarında kan kültür şişesinde *Brucella* üremesi tespit edilen dokuz hastanın doğrudan şişeden alınan örneklerine DNA izolasyon protokolü uygulanmasıyla ekstrakte edilen DNA'ların moleküler analizi sonucunda tüm şişelerden mGz-PZR yöntemi ile *B. melitensis* izole edildi. Ayrıca; kan kültürü üreme sinyali alınmayan iki hastanın kültür şişesinden kör pasaj yapıldı. İlaveten üreme sinyali alınmayan kan kültür şişesinden mGz-PZR çalışıldı ve sonucun negatif olduğu konfirme edildi.

Kan kültüründe üreme saptanan hastalardan biri nörobruselloz hastasıydı. Bu hastanın laboratuvarımızda rutin serolojik tetkikleri yapıldı (Hastanın BOS örneği kan kültür şişesine ekilerek laboratuvarımıza gönderilmiştir). Ayrıca bu hastanın serum ve BOS örneğinden yapılan mGz-PZR sonucu pozitif bulundu. Bir hastanın da sadece eklem sıvısında *Brucella* üremesi tespit edildi (Sinoviyal sıvı aseptik şartlarda alınıp kan kültür şişesine ekilerek laboratuvarımıza ulaştırılmıştır). Eş zamanlı olarak doğrudan üreme sinyali veren kan kültür şişelerinden DNA izolasyonu sağlanıp reaksiyon kurulmuştur. Eklem sıvısı kültürü *Brucella* pozitif bulunan hastanın aynı zamanda serum PZR sonucu da pozitif bulunmuştur.

Brucella üremesi olan hastaların kan kültür şişesinden alınan örnekleri Thermo DNA izolasyon kiti dışında Norgen kit ile de çalışılmış ve iki kitin de kan kültür şişesi üzerindeki performansları değerlendirilmiştir. Ampliqon master miks ile gerçekleştirilen amplifikasyon sonucunda Norgen DNA izolasyon kitinin performansı kısmen daha iyi bulundu. Ancak Thermo ekstraksiyon kitinin DNA izolasyon protokolünde yer alan yıkama ve seyreltme aşamalarında yapılan modifikasyonlar neticesinde her iki ekstraksiyon kitinin kan kültür şişeleri üzerindeki etkinliği benzer bulundu.

5-TARTIŞMA

Bruselloz sıklıkla atipik ve nonspesifik semptomlar şeklinde kendini gösteren zoonotik bir enfeksiyon hastalığıdır. Tanı için hastanın klinik verileri ve geçmişi önemlidir. Bununla birlikte, brusellozun tek başına klinik bulgularla teşhis edilmesi önerilmemekte tanıda ağırlıklı olarak laboratuvar testlerine ihtiyaç duyulmaktadır (23,24).

İnsan brusellozunun klinik yönetimi, tedavisi ve takibi problemlidir. Rutin tanı sıklıkla kültür ve seroloji ile konmaktadır. Ancak STAT veya diğer serolojik yöntemler için antikor titresinde kesin bir sınır değer belirlemek zordur ve bu durum bazı tanısal sorunları da beraberinde getirmektedir (90). Ayrıca, brusellozlu hastalarda antikor titresini ile bakteriyel yük arasında açık bir ilişki yoktur. Çoğu sağlıklı bireyde geçmişte tekrarlayan maruziyete bağlı olarak ve endemik bölgelerdeki asemptomatik hastalarda 1:80-1:160 titrelerde aglütininler bulunabilir. Diğer taraftan hastalığın erken bakteriyemik döneminde titreler çok düşük olabileceğinden STAT sonuçları negatif veya 1:40-1:80 dilüsyonlarda seyredabilmektedir (23,24,90). İlâveten; brusellozun endemik olarak görüldüğü bölgelerdeki hasta grupları, kullanılan tanı testlerinin özgüllüğünün düşük olması, persistan enfeksiyonlar, nükseden vakalar ile *Francisella tularensis*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella* spp., *Moraxella phenylpyruvica* ve *Yersinia enterocolitica*'ya karşı oluşan antikorlarla meydana gelen çapraz reaksiyonlar, tanı testlerinde ciddi sorun teşkil etmektedir (23,41).

Standart tüp aglütinasyon testlerindeki en önemli yalancı negatiflik durumu komplike ve kronik olgularda görülmektedir (16,58). Vakaların yaklaşık %4,7-6'sında rastlanan blokan antikorların varlığı STAT'da yalancı negatifliğin en sık sebeplerinden biridir (88). İlâveten; özellikle kronik olgularda, bazen akut evrede de olmak üzere, hasta serumunda antikor fazlalığına bağlı olarak düşük sulandırımelerde aglütinasyonun maskelenmesi (prozon fenomeni) %1,5-6 oranında görülmekte ve bu durum tüp aglütinasyon testlerinde yalancı negatifliğe sebep olmaktadır. Ayrıca *B. canis* enfeksiyonu ve agammaglobulinemi de STAT ve diğer serolojik testlerdeki yalancı negatiflik nedenlerindendir (16,59,88).

Brusella enfeksiyonlarının tanısında kültür altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak mikroorganizmanın yavaş üreme özelliği, uzun inkübasyon süresi, enfeksiyonun evresi ve antibiyotik tedavisi gibi pek çok faktörün kültür duyarlılığını azalttığı belirtilmektedir. Ayrıca kültür, laboratuvar kaynaklı bulaş riskini artırmakta ve otomatize kan kültür sistemlerinin uygulanmadığı laboratuvarlarda etkenin üretilmemesi durumu gibi sorunlar ortaya çıkmaktadır (8,23,58).

Konvansiyonel tanıda karşılaşılan bütün bu olumsuzluklar ve serolojik testlerin hastalığın teşhisinde yetersiz kalması sebebiyle moleküler tanı tekniklerine ihtiyaç duyulmuştur. Bu teknikler bruselloz tanısındaki sorunları gidermek için iyi bir seçenektir. Literatürde *Brucella* bakterilerini tür düzeyinde saptayabilmek için birçok araştırmacı tarafından PZR çalışmaları yapılmıştır (15,16). Moleküler tanı ile ilgili yapılan bu çalışmalarda; yeni vakaların teşhis, tedavi ve takibinde Gz-PZR nihai karar vermek için iyi bir alternatif olabilmektedir. Bu yöntemler relaps ve yeni enfeksiyonlar arasında ayırım yapamamasına rağmen, şüpheli serolojik sonuçları veya klinik semptomları olan hastalarda daha yararlı bir izleme aracıdır (11,16,59). Moleküler teknikler ayrıca brusellozun erken ve doğru tanısında klinisyenlerin daha bilinçli davranmasına yardımcı olmaktadır.

Gz-PZR avantaj olarak post amplifikasyon işlemleri gerektirmez. Diğer testler ile kıyaslandığında; tanı için gerekli süreyi kısaltır, duyarlılığı artırır ve bakteriyel DNA yükünü nicelleştirebilir (90,91). Ancak çoğu PZR temelli yöntemlerin duyarlılığı ve özgüllüğü değişkendir. Yapılan çalışmalarda moleküler yöntemlerin kültür ve serolojik testlerden daha duyarlı olduğu kabul edilse de standardizasyonu tam olarak sağlanamamıştır (8,16,58).

Biz bu çalışmada brusellozun hızlı, duyarlı ve spesifik tespiti için standardize bir Gz-PZR yönteminin optimizasyonu ve validasyonunu amaçladık. Bruselloz şüphesi olan hastaların güvenilir teşhisinde; cihaz+ekstraksiyon kiti+amplifikasyon kiti+primerler ve reaksiyon basamakları açısından optimize ettiğimiz bir Gz-PZR protokolünün etkinliğini seroloji ve kültür yöntemleri ile karşılaştırarak değerlendirdik. Bu protokolün konvansiyonel tanı testlerinin yerine kullanılabilirlik olasılığını ve rutin klinik laboratuvarlarda bruselloz için diagnostik etkinliğinin artırılabilirliğini araştırdık. İlaveten Gz-PZR yönteminin bulaşıcılık riski yüksek patojenlerin kolay tespiti ve diagnostik laboratuvarlarda kullanılabilirliğini inceledik.

Literatürdeki bazı çalışmalarda, ticari olarak farklı ekstraksiyon protokolleri ve farklı hedef gen bölgelerine spesifik primerlerin kullanılması sonucunda Gz-PZR yönteminin duyarlılık ve özgüllüğünün değiştiği kaydedilmiştir (58, 92). Garshasbi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada İran'ın Zanzan bölgesinde bruselloz epidemiyolojisi değerlendirilmiştir. Çalışmada insan serum örneklerinde *Brucella* spp.'nin varlığı farklı hedef gen bölgeleri ve primerler kullanılarak araştırılmış, PZR'nin duyarlılığı ve özgüllüğü STAT ile karşılaştırılmıştır. STAT pozitif ve negatif bulunan toplam 180 serum örneğinin 133'ü (%73,8) *bcs31* gen bölgesini hedefleyen B4 ve B5 primerleri ile kurulan PZR testinde pozitif bulunmuş; aynı çalışmada IS711 gen bölgesini hedefleyen *B. abortus* spesifik primerler kullanıldığında PZR pozitifliği %63,8 (115/180) olarak tespit edilmiştir. PZR'si pozitif bulunan 133 serum örneğinin 128'i STAT pozitif, 52'si ise negatif bulunmuştur. STAT antikor titresi $\geq 1/160$ ve üzerinde olan 106 serum örneğinin 102'si (%96,22) PZR pozitif, STAT'si 1/160 titrenin altında olan 22 örneğin 21'i (%95,45) ve STAT sonucu negatif olan 52 hastanın 10'u (%19,23) PZR pozitif bulunmuştur. Sonuç olarak STAT'nin hakem test olarak kabul edildiği bu çalışmada PZR'nin tür düzeyinde duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %82 ve %80,7 bulunmuştur. Bu gözlem neticesinde, araştırmacıların önerileri doğrultusunda; bruselloz hastalarının STAT titresi 1:160'ın altında anlamlı olabileceği ve düşük titrelerin gözardı edilmemesi gerektiği savunulmuştur (92). Ancak başka bir çalışmada, 1:160 STAT titresinin, özellikle brusellozun endemik görüldüğü bölgelerde aktif enfeksiyonun göstergesi olmadığı belirtilmiştir (36,93).

STAT ve PZR'nin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada; insan tam kan ve serum örneklerinde *Brucella* DNA'sını saptamak için *bcs31* genini hedefleyen primerler kullanılmış ve gerçekleştirilen PZR analizlerinin duyarlılık ve spesifiteleri sırasıyla tam kanda %50 ile %100, serumda %60 ile %100 bulunmuştur (95). Bizim gerçekleştirdiğimiz deneylerde, *bcs31* gen bölgesini hedefleyen primerler ve Taqman problemleri sayesinde mGz-PZR yönteminin duyarlılığı serum ve tam kan örneklerinde 10^3 cfu/ml sınır değeri referans alındığında %100 bulunmuştur. Ancak bruselloz tanısında referans bir metodun bulunmamasından dolayı yöntemimizin duyarlılığı klinik örneklerde kesin olarak belirlenmemektedir. EDSL'si belirlenmiş cut-off değerlerinde yüksek duyarlı olduğu söylenebilir. Klinik örneğin mililitresinde 10^2 cfu/ml ve altında bakteri bulunması durumunda yöntemin duyarlılığı %80'in altına inecektir. Tanıda altın standart kültür referans alındığında; yöntemimiz kültür pozitif hastaların tamamını

doğru olarak tespit edebilmiştir. Ancak bruselloz kliniği yanında kan kültürü negatif olan hastaların valide ettiğimiz yöntem ile PZR sonuçları pozitif olabilmektedir. Bu yüzden duyarlılığın yüzdesi hakkında kesin bir şey söylenemez.

Zerva ve arkadaşları; klinik örneklerden PZR ile *Brucella* DNA'sını saptadıkları bir çalışmada, serum örneklerinin (%94) tam kan örneklerinden (%61) daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Yöntemin özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır (94). Diğer taraftan Queipo- Ortuño ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada kandan DNA ekstraksiyonu için ticari bir kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılırken, serumdan DNA izolasyonunda kaynatma metodu kullanılmıştır. Serum ve kandan izole edilen DNA'ların amplifikasyonunda Cp (cross point) değerleri farklılık göstermiştir. Sonuç olarak çalışmada tam kan örneklerinin, *Brucella* DNA'sının izolasyonunda daha uygun olduğu savunulmuştur (96). Bizim çalışmamızda optimize edilen yöntem ile Thermo Scientific DNA izolasyon kiti kullanarak tam kan ve serum örneklerinden yapılan amplifikasyonlarda C_T değerleri arasındaki fark çok az bulundu. Genel olarak aynı konsantrasyonda hazırlanmış numuneler değerlendirildiğinde serum örneklerinin ortalama iki C_T değeri daha önce amplifiye olduğu kaydedildi.

İnsan brusellozunun çoğu diagnostik çalışmaları tam kan örnekleri ile yapılmasına rağmen, hemoglobin ve diğer bileşiklerin inhibitör etkileri nedeniyle serum en sık tercih edilen klinik örnektir. Alikhani ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, bruselloz kliniği bulunan 50 hastanın serum ve tam kan örnekleri PZR ile analiz edilmiş, bu hastaların aynı zamanda kan kültürleri de alınarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Tüm hastaların STAT antikor titresi $\geq 1/160$ olarak kaydedilmiştir. Hastaların sadece yedisinde kan kültüründe *Brucella* spp üremiştir. Toplamda 11 (%22) tam kan ve 17 (%34) serum örneğinin PZR sonucu pozitif olarak kaydedilmiştir. Kan kültürü negatif olan 43 hastanın; 10'unda (%23,3) serum PZR pozitif, 4'ünde tam kan PZR testi sonucu pozitif bulunmuştur. Bu çalışma neticesinde serum örneklerinin moleküler analizlerdeki duyarlılığı tam kana göre yüksek bulunmuştur (97). Bizim kurduğumuz reaksiyonlarda kan kültürü negatif olup brusella antikor titreleri yüksek olan 20 hastanın 12'sinde (%60) mGz-PZR pozitifliği saptandı. PZR pozitif bulunan 12 hastanın 10'unda STAT titre $\geq 1/160$, ikisinde ise antikor titresi $\leq 1/160$ olarak belirlenmiştir. Kan kültüründe *Brucella* üremesi tespit edilen 21 hastanın hepsinde serum mGz-PZR sonucu pozitif bulunmuştur.

Bir çalışmada, Mohseni ve arkadaşları, bruselloz şüpheli 100 hastanın serum örneğinde ELISA, PCR ve STAT yöntemlerini karşılaştırmışlardır. Bu örneklerin yarısı STAT ile $\geq 1/160$ titrede pozitif bulunmuştur. STAT pozitif 50 örneğin 49'u aynı zamanda ELISA testinde de pozitif bulunmuştur. Toplamda 100 serum örneğinde PZR ile %45 pozitiflik saptanmış ve bu 45 hastanın tamamında ELISA ve STAT titreleri pozitif bulunmuştur (98).

Morata ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, PCR-ELISA kombinasyonu yöntemin bruselloz tanısında %94,9 duyarlılığa ve %96,5 özgüllüğe sahip olduğu ve dolayısıyla tanıda tercih edilen yöntem olarak önerildiği bildirilmiştir. İlaveten PZR'nin sadece bir teşhis yöntemi olarak değil, aynı zamanda terapötik tepkinin değerlendirilmesinde de kullanılabileceği belirtilmiştir (99).

Brusellozun tanısında kan, kemik iliği ve diğer doku örneklerinden *Brucella* spp.'nin izolasyonu "altın standart" olarak kabul edilir (8,9,91). Yapılan bazı çalışmalarda brusellozlu çocuklarda etkenin kan kültüründe üretilme oranının %23,5 ile %59,7 arasında değiştiği belirtilmiştir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada kan kültüründe üreme oranı %19 olarak rapor edilmiştir (100). İki otomatik kan kültürü sisteminin performansını araştıran başka bir çalışmada, *Brucella* spp.'yi BACTEC 9240 sisteminin %52,9, BacT/ALERT sisteminin ise %82,3 oranında tespit edebildiği bildirilmiştir. Türkiye'den 91 hastada yapılan bir çalışmada kan kültürü pozitifliği %31 olarak saptanmıştır (101,102). Bizim çalışmamızda ise kan kültürü mevcut olan 41 hastanın 21'inde (%51,2) kan kültüründe *Brucella* spp. üredi ve bu hastalar “kesin bruselloz” olarak kabul edildi.

Brusellozda kan kültürlerinin duyarlılığı hastalığın fokal ve kronik olgularında azalmaktadır (16,58). Bu yüzden bakterinin lenf düğümleri, karaciğer veya dalaktan izolasyonu sağlanmalıdır. Ayrıca serolojik tanıda kullanılan testlerin spesifite sorunu vardır. Hastaların antikor titreleri genellikle tam iyileşme vakalarında bile tedaviden sonraki dönemlerde uzun süre pozitif kalabilmektedir (58,93). Mitka S. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, akut bruselloz ve relaps olgularında PZR testlerinin tanısallık değeri ve hızlı tanıdaki performansı, konvansiyonel tanı testleri ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada bcsp31, omp2 ve bp26 hedef bölgelerine ait primerler ile ayrı ayrı PZR analizleri yapılmış ve akut fazda PZR'nin duyarlılığı %74 olarak bulunmuştur. Çalışmada, akut ve tekrarlayan formlardaki bruselloz tanısında PZR

analizlerinin özgüllüğü %100 bulunmuştur. Brusellozda uygun antibiyotik tedavisine rağmen nüks riskinin yüksek olması nedeniyle, nüks olgularını belirlemek ve yeterli tedaviyi sağlamak için bir yıl boyunca hastaların takip edilmesi gerektiği bildirilmiştir (11).

Yayımlanan bazı makalelerde brusellozun fokal komplikasyonu mevcut olan hastalarda PZR'nin kültürden daha duyarlı olduğu kanıtlanmıştır (58,99). Morata P. ve arkadaşları fokal tutulumu olan 32 bruselloz hastasının enfeksiyon bölgelerinden topladıkları 34 klinik örneğin %97'sinde PZR ile pozitiflik saptamışlardır. Ancak örneklerin kültürü yapıldığında sadece %29,7 oranında *Brucella* spp. izolatu üretilebilmiştir. Optimize ettiğimiz protokol ile gerçekleştirilen çalışmada sadece bir hastanın enfeksiyon odağından alınıp kan kültür şişesine ekilen sinoviyal sıvı örneğinde *Brucella* spp izole edildi. Bu hastanın aynı zamanda eklem sıvısı ve serumundan yapılan moleküler incelemede mGz-PZR ile *Brucella melitensis* identifiye edildi. Enfeksiyon odağından alınan klinik numunenin mikrobiyal yükü daha fazla olduğundan eklem sıvısı örneğinden yapılan PZR'de seruma göre daha düşük C_T değerinde amplifikasyon gözlemlendi.

Tabibnejat M. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma ile kan örneklerinde *Brucella* varlığı araştırılmıştır (97). Bu deneysel çalışmaya klinik olarak bruselloz şüphesi bulunan ve serolojik testlerde pozitiflik saptanan toplam 100 hasta dahil edilmiştir. Bu hastalarda etken bakteri BACTEC 9050 (Becton Dickinson, USA) kan kültür sistemi ile üretilmiştir. Tam kandan DNA izolasyonu için Qiagen Kit Company (Qia Amp Mini Kit) kullanılmıştır. Kan numunelerinin moleküler analizinde, spesifik *eryD* transkriptaz geni ve *bcsp31* geni hedef alınarak iki ayrı PZR deneyi ile araştırılmıştır. Örneklerin sadece %39'unda kan kültüründe üreme saptanmış olup rastgele seçilen 23 kültür pozitif kan örneğinin hepsi PZR ile pozitif bulunmuştur. Ancak kültür negatif bulunan 14 örneğin 13'ünde de PZR ile pozitiflik saptanmıştır. Çalışmaya dahil edilen bizim hastalarımızın kan kültürlerinde %51,2 oranında üreme saptanmış olup kan kültürü pozitif olan dokuz hastanın serum ve doğrudan kan kültür şişesinden alınan örneklerinde de PZR pozitifliği kaydedilmiştir.

Çin'de gerçekleştirilen Wang W. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada brusellozun endemik olduğu bölgelerde, kan transfüzyonu ile hastalık geçişinin potansiyel riski araştırılmıştır. Bu çalışmada RBT, STAT, ELISA ve Western Blot

olmak üzere dört serolojik test ile qPZR ve seminested PZR karşılaştırılmıştır. Kashi bölgesi kan merkezinden toplanan 3896 plazma örneğinin 135'i (%3,5) RBT pozitif, 120'si (%3,1) STAT pozitif bulunmuştur. RBT pozitif 135 plazma örneğinin 39'u *B. melitensis* açısından ELISA pozitif bulunmuştur. ELISA pozitif 39 örneğin 25'inde rBP26 ve rOMP31 bölgesine karşı antikor pozitifliği WB testi ile doğrulanmıştır. Ayrıca tüm serolojik testlerde pozitiflik tespit edilen hastalardan 15'inin plazma qPZR ve nested-PZR sonucu pozitif bulunmuştur. Serolojik ve moleküler yöntemlerle pozitif bulunan örneklerin tamamı RBT ile pozitif olarak saptanmış olup Rose Bengal testinin duyarlılığı %100 olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak RBT'nin brusellozun endemik olduğu bölgelerdeki kan transfüzyon merkezlerinde tarama amaçlı uygulanması gerektiği belirtilmiştir (37).

PZR yöntemlerinin, etken bakterinin hızlı ve hassas şekilde tespit edilmesine olanak sağlamak ve erken dönemde uygun antibiyotik tedavisine başlamak için önemi vurgulanmıştır. PZR'nin seroloji veya kültüre dayalı yöntemlerle karşılaştırıldığı birçok çalışmada, PZR'nin daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu kaydedilmiştir (16,58). Queipo-Ortuno ve arkadaşları bir çalışmada 50 bruselloz ön tanılı hastanın periferik kan örneklerini toplamış ve tüm örneklerde PZR ile pozitiflik tespit etmişlerdir. Moleküler analizleri yapılan bu hastaların %30'unda kan kültürü negatif bulunmuş, %16'sında STAT titre $\leq 1/160$ ve Coombs antikor titresi $\leq 1/320$ olarak belirlenmiştir. Çalışmada PZR'nin duyarlılığı ve özgüllüğünü sırasıyla %100 ve %98,3 olarak saptamışlardır (95,96). Ancak Hajia ve arkadaşları ayrı bir çalışmada; uygulanan tanı yöntemleri ve klinik özelliklerine göre 110 bruselloz tanılı hastanın serolojik testleri PZR ile karşılaştırılmış ve ELISA, STAT ve PZR sonuçları sırasıyla 92, 42 ve 51 hastada pozitif bulunmuştur. Hastaların 16'sında *B. abortus*, 35'inde ise *B. melitensis* tespit edilmiştir. Sonuç olarak çalışmada test edilen tüm yöntemlerin, brusellozun doğru teşhisini sağlamak için kullanılması gerektiği bildirilmiş ve ELISA'nın diğer testlere göre duyarlılığı daha yüksek bulunmuştur (103). Diğer bir çalışmada M.G Alvarez-Ojeda ve arkadaşları bruselloz şüpheli 92 hastanın klinik örneklerinde PZR, seroloji ve kan kültürü testlerinin duyarlılığı ve özgüllüğünü karşılaştırmışlardır. Hastaların 23'ünde PZR ile pozitiflik saptanmış olup PZR testinin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla RBT ile karşılaştırıldığında %44,68 ve %95,56, STAT ile kıyaslandığında %51,61 ve %88,52, 2-ME testi ile karşılaştırıldığında ise %53,57 ve %87,50 olarak bulunmuştur. PZR testi; *Brucella* spp.'nin izole edildiği kültür ile mukayese edildiğinde yöntemin

duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %100 ve %80,23 olarak kaydedilmiştir (104). Bizim analizlerimizde kan kültüründe *Brucella* üremesi saptanan hastaların tamamında serum PZR sonucu pozitif bulundu.

Nükleik asitlerin izotermal amplifikasyonuna dayanan başka moleküler analizler de geliştirilmiştir. Loop aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP), klinik örneklerde *Brucella* spp. dahil olmak üzere birçok bakteriyel patojenin saptanmasında yaygın olarak kullanılan izotermal amplifikasyon analizlerinden biridir. Bu yöntemler özellikli bir laboratuvar koşulları ve thermal cycler cihazı gerektirmeyen yüksek özgüllükte daha yüksek miktarlardaki DNA'yı hızla sentezleyebilmektedir. Bunun dışında yeni bir moleküler teknik olan Polimeraz Spiral Reaksiyon (PSR) yöntemi özellikle hayvan brusellozunun tanısında kullanılmaya başlanmıştır (108). PSR, 60-65 °C aralığındaki izotermal koşullar altında hızlı, spesifik ve yüksek duyarlılıkta hedef DNA'yı çoğaltabilmektedir. Hindistan'da gerçekleştirilen Das ve arkadaşlarının PSR analiz yönteminin geliştirilmesini amaçladıkları bir çalışmada *Brucella* spp.'nin varlığı IS711 gen bölgesini hedef alan spesifik primerler kullanılarak araştırılmıştır. Optimize ettikleri PSR yöntemini, Gz-PZR ve konvansiyonel PZR ile karşılaştırarak metodun duyarlılığını incelemişlerdir. Klinik örneklerle geçmeden önce *B. abortus* S99 ve *B. abortus* S19 kontrol suşları kullanılarak üç ayrı moleküler testin saptama limitini belirlemişlerdir. Hayvan Hastalıkları Araştırma ve Teşhis Merkezi patoloji laboratuvarından temin edilen 56 fetal abort hayvanının mide içeriği çalışmaya dahil edilmiştir. Isı yardımıyla inaktive edilen numune fenol-kloroform ekstraksiyonu yapılarak DNA izolasyonu sağlanmıştır. Sonuç olarak toplamda 56 klinik örneğin 25'inde hem PSR hem de Gz-PZR ile pozitiflik saptanmıştır. Ancak örneklerin sadece 20 tanesinde konvansiyonel PZR ile amplifikasyon gözlenmiştir. Çalışmada PSR yönteminin sensitivitesi Gz-PZR ile eşit bulunmuştur. Ayrıca belli konsantrasyonlarda pozitif kontrol suşları ile yapılan optimizasyon denemelerinde PSR yönteminin LOD'u 11,8 fg (fikogram) bulunurken konvansiyonel PZR yönteminde 1,18 pg (pikogram) bulunmuştur. PSR'ın daha düşük konsantrasyondaki genomik DNA'yı çoğaltabilmesi neticesinde yöntemin konvansiyonel PZR'ye göre 100 kat daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak PSR testinin kolay uygulanabilir olması ve düşük maliyeti nedeniyle bulaşıcı hastalıkların tanısında diğer moleküler yöntemlere tercih edilebilir, denilmiştir (108).

Queipo-Ortuno ve arkadaşlarının bir çalışmasında, 62 aktif brusellozlu hastalardan toplanan 60 serum örneğinde SYBR green I tabanlı Gz-PZR testi ve erime eğrisi analizi (amplifikasyonu takiben amplikonların spesifikliğini doğrulamak için) gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın amacı LightCycler tabanlı bir Gz-PZR analizi geliştirmek ve bu analizin serum örneklerinde *Brucella* DNA'sının saptanmasındaki tanısal etkinliğini değerlendirmektir. Çalışmanın intra-assay ve inter-assay varyasyon katsayıları sırasıyla %1,3 ve %6,4 bulunmuş ve tespit sınırı 5 fg (bir genom eşdeğeri) olarak tespit edilmiştir. LightCycler PZR testi, aktif brusellozlu 60 hasta ve 65 negatif kontrol grubu karşılaştırılarak 62 serum numunesinde analiz edildiğinde %91,9 duyarlı ve %95,4 spesifik bulunmuştur. Sonuç olarak; analiz tekrarlanabilir, kolayca standardize edilebilir ve 2 saat içerisinde brusellozunun teşhisi için umut verici ve pratik bir yaklaşım oluşturabilir, denilmiştir (110). Bizim çalışmamızda kantitatif PZR çalışılmamış, SYBR green I içeren master miks ile 10^4 cfu/ml bakteri içeren simüle serum örneklerinde her zaman amplifikasyon gözlenmiştir.

Brucella DNA'sının kalitesi ve saflığı özellikle multipleks PZR yöntemleri için oldukça önemlidir. Herhangi bir klinik numunede var olan inhibitörün uzaklaştırılamaması ve DNA'nın saf olarak izole edilememesi moleküler tekniklerin kullanımını sınırlandırabilir. Bazı çalışmalarda diğer organik vücut sıvı veya doku örnekleri kullanılmış olmasına rağmen, en yaygın kullanılan örnekler kan veya serumdur (94). İnsan kan örneklerinde amplifikasyon için uygun *Brucella* DNA miktarının optimize edilmesi için geliştirilmiş izolasyon yöntemleri mevcuttur. Bu yöntemler amplifikasyon için saf DNA'nın izole edilmesi, inhibitörlerin uzaklaştırılması ve buna bağlı olarak amplifikasyonun yalancı negatifliğinin önlenmesinde etkilidir. Yanlış negatif reaksiyonlar EDTA, RNase veya DNase, hemoglobin, heparin, fenol, poliaminler, bitki polisakkaritleri, eldiven pudrası, kalsiyum aljinat ve klinik örnekte bulunan başka bir inhibitör reaktif ile gerçekleştirilebilir. Numune kontaminasyonu veya amplikon taşınmasından kaynaklanan yanlış pozitif reaksiyonlar da dikkat edilmesi gereken hususlardan biridir (58,65). Bu çalışmada, brusellozun erken tespiti için Taqman prob tabanlı kalitatif bir mGz-PZR protokolünün optimizasyon ve validasyonunu sağladık. Yöntemin performansını ve validasyonunu değerlendirerek bu metodun mevcut diagnostik testlerle beraber bruselloz şüpheli hastaların klinik örneklerindeki etkinliğini inceledik. Bizim çalışmamızda *carry-over* kontaminasyonuna bağlı herhangi bir yalancı pozitiflik tespit edilmedi. Ancak kan kültür şişesinden alınan

örneklerin DNA izolasyonunda hemogloblin ve bifazik kültür vasatından gelen inhibitörlere bağlı yalancı negatiflik tespit ettik. Saflaştırma protokollerinde yıkama ve dilüsyon aşamalarında gerçekleştirdiğimiz modifikasyonlar ile yalancı negatifliğin önlenmesine katkıda bulunduk.

Brusellozun tedavisi sırasında bakteriyel DNA yükünde meydana gelen belirgin azalma literatürde bazı çalışmalarda açıkça belirtilmiştir. Klinik semptomlarla birlikte tedavi edilen bireylerde *Brucella* DNA'sının saptanması, kronik hastalığın ortaya çıktığını destekleyebilir (105). Herhangi bir klinik semptomu olmayan hastalarda *Brucella* DNA'sının belirlenmesi, brusellozun varlığına işaret etmez, çünkü yakın zamanda tedavi görmüş olan birçok kişi hala pozitif Gz-PZR sonuçlarına sahip olabilir (90,105).

Birçok çalışma, *Brucella* DNA yükünü, hastalığın farklı evrelerinde analiz etmiştir. Queipo-Ortuño ve ark. daha önce bruselloz tanısı almış 46 hasta ve 64 sağlıklı kontrol grubunu çalışmaya dahil etmişlerdir. Bu çalışmada 46 hastanın serum örneklerinde LightCycler kantitatif PZR ile DNA yükü belirlenmiş ve aktif brusellozlu hastalar ile tedavi görmüş hastaların klinik örneklerinde kantitatif PZR'nin etkinliği araştırılmıştır. Sonuç olarak bakteriyel DNA yükünün belirlenmesi ve amplifikasyonu için en iyi cut-off değeri serum örneklerinde 10^3 kopya/ml olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, söz konusu kesme noktası, aktif brusellozu olan pozitif hastaların yaklaşık %86'sını kapsamıştır (106). Bizim çalışmamızda konsantrasyonu belli pozitif kontrol suşu, bruselloz negatif serum örneklerine katılarak DNA izolasyonu sağlanmıştır. Serum örneklerinde yaklaşık 10^3 cfu/ml dilüsyondan ekstrakte edilen bakteriyel DNA örneklerinin tamamında, mGz-PZR yöntemi ile pozitif sonuç alınmıştır. Bu konsantrasyon, yöntemimizin validasyon çalışmalarının değerlendirilmesinde düşük pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu açıdan düşünüldüğünde; yöntemimiz 10^2 cfu/ml'nin üzerinde bakteri içeren klinik örneklerle güvenli şekilde uygulanabilir.

Optimize ettiğimiz analiz, reaksiyon başına 2- 3 kopya kadar düşük DNA'yı amplifiye edebildi. Bu deneyin sonuçları, LOD'u reaksiyon başına 1-10 kopya arasında olan önceki çalışmaların moleküler analizleri ile karşılaştırılabilir (90,106). Bizim sonuçlarımıza dayanarak, klinik belirtileri ve semptomları olan hastalar ya da brusellozun endemik görüldüğü bölgelerde nedeni bilinmeyen bir ateş durumunda, bruselloz tanısı için *bcsp31* genini hedef alan moleküler testleri önerebiliriz. Bu hedef

gen bölgesi, nadir türlerin ve biyotiplerin neden olduğu yanlış negatif sonuçların önlenmesine yardımcı olabilir. Epidemiyolojik veriler de göz önünde bulundurularak ikinci bir gen hedefi tanıyı doğrulayacaktır. Redkar ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada test edilen *B. abortus* ve *B. melitensis*'e özgül analizler, en sık görülen biyotürleri tanımlayabilmiştir. *B. suis*'e ait verilerinin azlığı nedeniyle, bu türün tespitinde herhangi bir tavsiyede bulunulmamıştır (107).

Bu çalışmada, optimize edilen kalitatif bir TaqMan mGz-PZR testi sayesinde insan serum örneklerinde *Brucella* DNA'sının varlığı ve testin tanısal etkinliği araştırıldı. İlaveten; yöntemin kan kültür şişelerindeki üreme sinyalinin *Brucella* bakterisine ait olup olmadığı ve brusellozdan sorumlu bakteri türünün tespitindeki başarısı değerlendirildi. Kan kültüründe *Brucella* üremesi saptanan örneklerin tamamında mGz-PZR yöntemiyle *Brucella* spp ve *B. melitensis* spesifik primer ve problemleriyle pozitif sonuç alınmıştır. Sonuçlarımız mGZ-PZR yönteminin, ülkemizde yaygın olarak görülen *Brucella melitensis* türünü başarılı bir şekilde tanımladığını göstermiştir. Bu çalışmayla, uzun zaman alan ve laboratuvar kaynaklı bulaş riski bulunan konvansiyonel yöntemlere alternatif olabilecek oldukça hassas, spesifik ve kolay uygulanabilir olmasının yanında 6 saatten daha kısa sürede klinisyene güvenilir sonuç sağlayabilecek bir protokolün optimizasyonu sağlanmıştır.

6-SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, kan kültürü ve diğer konvansiyel yöntemlerdeki kısıtlamalar brusellozun kesin tanısını güçleştirmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleri, pratik, hassas, spesifik ve göreceli olarak ucuz yöntemler olup, laboratuvar personelinin kontaminasyon riskini düşüren avantajlı yöntemlerdir. Özellikle tür düzeyinde tanıya da olanak sağlayan mGz-PZR yöntemi, sadece hastalığın akut dönemdeki tanısı için değil, aynı zamanda relaps olgularının erken tespiti, hastalığın klinik seyrinin belirlenmesi ve tedavi sonrası izlemi için de yararlı bir araçtır. Ancak, literatürde yer alan çalışmalar, brusellozun moleküler tanısı için henüz bir konsensus sağlanamadığını ortaya koymakta; moleküler yöntemlerle yapılan çalışma sonuçlarının örneğin türüne, DNA izolasyon protokolüne, Gz-PZR yöntemine ve amplifikasyon koşullarına bağlı olarak değiştiği gözlenmektedir.

Brucella bakterisinin hücre içi bir bakteri olması nedeniyle, mikrobiyal yoğunluğun serum örneklerine göre tam kan örneklerinde daha yüksek olduğu bilinmektedir. Ancak bakterinin kanda geçici olarak bulunabilmesi veya tam kan ve kan kültür şişelerinde bulunan inhibitörler nedeniyle, brusellozun moleküler tanısında sorunlarla karşılaşmaktadır. Bizim çalışmamızın sonuçları serum örneklerinin PZR ile tanıda uygun örnekler olduğunu göstermiştir. Ancak, çalışmamız, tam kan ve kan kültür şişesi örnekleri için de NORGEN DNA izolasyon kitinin güvenle kullanılabileceğini açığa çıkarmıştır. *Brucella* üremeli kan kültür şişesinden Thermo Scientific kit ile yapılan ekstraksiyonlarda ise, inhibitörlerin uzaklaştırılması için ekstraksiyon protokolünde yıkama sayısının artırılması ve izole edilen DNA'nın 1/10 oranında seyreltilmesi gibi modifikasyonlar ile tanısal sorunların aşılabildiği gösterilmiştir.

Farklı ticari DNA izolasyon kitleri, farklı mGz-PZR master miksleri ve farklı PZR reaksiyon koşullarını test ettiğimiz kalitatif çalışmamız sonucunda, yaklaşık 10^2 cfu/ml'lik saptama limitinde örneklerin yarıdan fazlasında pozitif sonuç alınabilmektedir. Yapılan optimizasyon ve validasyon çalışmaları, yöntemimizin etkin, güvenilir, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir metod olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Bu çalışmanın sonuçları, seroloji ve moleküler tekniklerin eşzamanlı olarak kullanımı ile brusellozun tanısında karşılaşılan sınırlamaların üstesinden gelinebileceğini ortaya koymuştur.

TEŞEKKÜR...

Mevcut kaynaklarını araştırma projeleri için finanse eden Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri ofisine desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

(Bu tez çalışmasında kullanılan tüm sarf malzemeler 4759 proje no ve 2018-35 ilan numarası ile AYBÜ Rektörlüğü BAP birimi tarafından karşılanmıştır.)

7- KAYNAKLAR

1. Bayram Y, Korkoca H, Aypak C, Parlak M, Cikman A, Kilic S, Berktaş M. Antimicrobial Susceptibilities of *Brucella* Isolates from Various Clinical Specimens. *Int J Med Sci* 2011; 8(3):198-202.
2. Çerekçi, A., Kılıç, A., Bayraktar, M., Uyanık, M.H., Yaşar, E., Esen, B. “İnsan Kaynaklı *Brucella* İzolatlarının Tanımlama ve Tiplendirmesinde Konvansiyonel Yöntemler ile Gerçek Zamanlı Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Karşılaştırılması”, *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(3): 392-400
3. Dal, T., Celen, M.K., Ayaz, C., Dal, M.S., Kalkanlı, S., Mert, D., Yildirim, N., Aktas, E., Arserim, N. Brucellosis a major problem: A Five years experience, *Acta Medica Mediterranea*, 2013; 29: 665
4. Mehmet Uluğ, Nuray Can-Uluğ. Brusellozlu 78 Olgunun Değerlendirilmesi *Klinik Dergisi* 2010; 23(3): 89-94
5. Alavi, S.M., and Alavi, L. Treatment of brucellosis: a systematic review of studies in recent twenty years, *Caspian J Intern Med*. 2013; 4(2): 636–641.
6. Yüce A, Alp-Çavuş S. Türkiye’de bruselloz: Genel bakış. *Klinik Derg*. 2006; 19(3): 87-97.
7. Alptekin N, Bilgiç A. Brusellozis. *Türkiye Klinikleri Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Dergisi*. 2003; 3(3): 97-106.
8. Geresu MA, Kassa GM, A Review on Diagnostic Methods of Brucellosis. *J Veterinar Sci Techno* 2016; 7: 323.
9. Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory based diagnosis of brucellosis—a review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification. *Clin Lab*. 2003;49(9-10):487-505.

10. Techniques for the brucellosis laboratory. Editörler: Alton, G. G.; Jones, L. M.; Angus, R. D.; Verger, J. M. France: Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). 1988; Sayfa:34–36.
11. Mitka S, Anetakis C, Souliou E, Diza E, Kansouzidou A. Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods. J Clin Microbiol 2007;45(4):1211-8.
12. Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Sanborn MR. Preliminary development of a diagnostic test for using polymerase chain reaction. J Appl Bacteriol, 1990; 69: 216–227.
13. Herman L, De Ridder H. Identification of *Brucella* spp. By using the polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol, 1992; 6: 2099-101.
14. S O'Leary, M Sheahan, T Sweeney. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. Research in Veterinary Science. 2006;81: 170–176.
15. William S. Probert, Kimmi N. Schrader, Nhi Y. Khuong, Susan L. Bystrom and Margot H. Graves, Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis* J Clin Microbiol. 2004 Mar; 42(3): 1290–1293.
16. Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. Expert Rev Mol Diagn. 2004;4(1):115-123.
17. Selim Badur, Betügül Öngen, Hakan Abacıoğlu, Enfeksiyon Patogenezi ve Bağışıklık (2 Cilt Takım) Akademi Yayınevi -2015
18. Murray Tıbbi Mikrobiyoloji, A. Dürdal US, Ahmet Başustaoğlu Türkçe çeviri - 2016
19. Doganay GD, Doganay M. *Brucella* as a potential agent of bioterrorism. Recent Patents Anti-Infect Drug Disc. 2013 Apr;8(1):27–33.

20. American Academy of Pediatrics. Brucellosis. In: Pickering LK, Baker CJ, Kimberlin A, David W, Long SS, editors. Red Book: 2012 Report of the Committee on Infectious Diseases. 29th edition. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics; 2012. p. 256–8.
21. Brucellosis in Humans and Animals. Editors: Corbel MJ, Elberg SS, Cosivi O, 2006.
22. Memish ZA, Balkhy HH. Brucellosis and international travel. J Travel Med. 2004 Feb;11(1):49–55.
23. Brucellosis in humans and animals 2006. Editors: Corbel MJ, Elberg SS, Cosivi O, <http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf>
24. Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition Edited by Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, James H. Jorgensen, Marie Louise Landry, and Michael A. Pfaller Atlas yayıncılık 2009.
25. Ocon P, Reguera J M, Morata P, Juarez C, Alonso A, Colmenero J D. Phagocyte cell function in active brucellosis. Infect Immun. 1994; 62:910–914.
26. J. Ariza, J. Corredoira, R. Pallares, P. Fernandez-Viladrich, G. Rufi, M. Pujol, F. Gudiol, Characteristics of and risk factors for relapse of brucellosis in humans, Clin Infect Dis. 1995; 20 (5): pp. 1241-1249
27. J.D. Colmenero, J.M. Reguera, F. Martos, D. Sanchez-Mora, M. Delgado, M. Causse, A. Martín-Farfán, C. Juarez, Complications associated with *Brucella melitensis* infection: A study of 530 cases, Medicine (Baltimore). 1996;75(4): 195-211.
28. Maria Laura Boschioli, Safia Ouahrani-Bettache, Vincent Foulongne, Sylvie Michaux-Charachon, Gisele Bourg, Annick Allardet-Servent, Chantal Cazevieille, Jean Pierre Liautard, Michel Ramuz, David O'Callaghan, The *Brucella suis virB* operon is induced intracellularly in macrophages PNAS February 5, 2002; 99 (3):1544-1549

29. Rodrigo Sieira, Diego J. Comerci, Daniel O. Sanchez and Rodolfo A. Ugalde, A Homologue of an Operon Required for DNA Transfer in *Agrobacterium* Is Required in *Brucella abortus* for Virulence and Intracellular Multiplication, *Journal of Bacteriology*, Sept. 2000; 182(17): 4849-55
30. Boschirolì, M.-L., Foulongne, V., & O'Callaghan, D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Current Opinion in Microbiology*, February 2001; 4(1): 58–64.
31. Campbell, G. A., & Adams, L. G. The long-term culture of bovine monocyte-derived macrophages and their use in the study of intracellular proliferation of *Brucella abortus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1992; 34:(3-4), 291–305.
32. Jawetz Melnick & Adelbergs, *Medical Microbiology*, 27 edition, Lange medical book-2016
33. Işııkay S., Yılmaz K., Işııkay N., Balci O., Özarslan K., Yılmaz F. and Okumuş S., Evaluation of 21 Cases with Brucellosis. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 2013; 33: 785–91.
34. Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL. Human brucellosis. *Lancet Infect Dis*. 2007 Dec;7(12):775– 86.
35. Yagupsky P. Pediatric brucellosis: an (almost) forgotten disease. *Adv Exp Med Biol*.2011;719:123–32.
36. Mantur BG, Amarnath SK, Shinde RS. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. *Indian J Med Microbiol*. 2007 Jul;25(3):188–202
37. Wenjing Wang, Qingyu Liao, Xiaoxia Wu, Shuiping Hou, Yuanzhi Wang, Jingbo Wu, Chuanwei Shen, Shouyi Chen, Jean- Pierre Allain, Chengyao Li, Potential risk of blood transfusion- transmitted brucellosis in an endemic area of China, *Transfusion AABB*. March 2015;55(3): Pages 586-592
38. Hasim, O., Dalgic, N. 2013. "A Clinical and Laboratory Evaluation of 32 Cases of Brucellosis", *Çocuk Enfeksiyon Dergisi/ J Pediatr Inf* 2013; 7:61-7

39. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Summary of notifiable diseases--United States, 2010. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2012 Jun 1;59(53):1–111.
40. Bal A, Gürçay E, Ünlüsoy D, Çınar C, Çakıcı A. Brusellozda kas iskelet sistemi komplikasyonları. Trakya Üniv Tıp Fak Derg. 2008; 25(1): 20-5.
41. CDC; Centers for Disease, Control and Prevention, Brucellosis Reference guide: Exposure, Testing and Prevention 2016
42. Tsolia, M., Drakonaki, S., Messaritaki, A., Farmakakis, T., Kostaki, M., Tsapra, H., Karpathios, T. 2002. “Clinical features, complications and treatment outcome of childhood Brucellosis in central Greece”, Journal of Infection 44(4):257-62
43. Mehmet Uluğ, Nuray Can-Uluğ, Brusellozlu 78 Olgunun Değerlendirilmesi, Klimik Dergisi 2010; 23(3): 89-94
44. Selim Öncel, Brusella Enfeksiyonları: Değerlendirme ve Yönetim, Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi Eylül 2016, Cilt 2, Sayı 3, s.25-30
45. Roiz MP, Peralla FG, Valle R, Arjona R. Microbiological Diagnosis of Brucellosis. J Clin Microbiol. 1998 Jun;36(6):1819.
46. Gazapo E, Gonzalez Lahoz J, Subiza JL, Baquero M, Gil J, de la Concha EG. Changes in IgM and IgG antibody concentrations in brucellosis over time: importance for diagnosis and follow-up. J Infect Dis. 1989 Feb;159(2):219-25.
47. Prof. Dr. Hakkı Bilgehan. Klinik Mikrobiyoloji Tanı; Güncelleştirilmiş Üçüncü Baskı. Barış Yayınları-2009
48. Nielsen K, Yu WL. Serological diagnosis of brucellosis. Prilozi 2010; 1: p.65-89.
49. Al Dahouk S, Nöckler K. Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy. Expert Rev. Anti Infect Ther 2011;9(7):833-45.

50. Diaz R, Casanova A, Ariza J, Moriyón I. The Rose Bengal test in human brucellosis: a neglected test for the diagnosis of a neglected disease. *P Lo S Negl Trop Dis*. 2011;5(4): e950.
51. Araj GF. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36:S 12-17.
52. Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis-a review of the literature. Part II: serological tests for brucellosis. *Clin Lab*.2003;49(11-12):577-89.
53. Elżbieta Monika Galińska, Jerzy Zagórski Brucellosis in humans- Etiology, diagnostics, clinical forms Literature Review in *Annals of agricultural and environmental medicine*. AAEM. June 2013; 20(2):233-8.
54. Bilgehan H. Antijen-antikor ilişkilerine bağlı inceleme yöntemleri: Bruselloz tanısında aglütinasyon (Wright deneyi) *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. 5. Baskı, Barış Yayınları, İzmir. 2009, p. 223-228
55. Kılıç S. Bruselloz: Mikrobiyolojik Tanı. *Türkiye Klinikleri J Infect Dis Special Topics* 2012;5(1):46-66
56. Brucella. Sentinel Level Clinical Laboratory Guidelines for Suspected Agents of Bioterrorism and Emerging Infectious Diseases. American Society for Microbiology (ASM).
57. Özdemir M, Feyzioglu B, Kurtoglu MG, Dogan M, Dagi HT, et al. A comparison of immuncapture agglutination and ELISA methods in serological diagnosis of brucellosis. *Int J Med Sci* 2011; 8(5):428-432.
58. Navarro E, Segura JC, Castaño MJ, Solera J. Use of Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction to Monitor the Evolution of *Brucella melitensis* DNA Load During Therapy and Post-Therapy Follow Up in Patients with Brucellosis. *Clin Infect Dis*, 2006; 42 (9): 1266-73.
59. Çeken S, Kaygusuz S, Kılıç D, Ağalar C. Akut bruselloz tanısında polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin kullanımı. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2015; 72(2): 91-98.

60. Waleed Abu al-soud and Peter Radstrom, Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells J Clin Microbiol 2001 Feb; 39(2): 485–493.
61. Roux K.H., Optimization and troubleshooting in PCR. Genome Research. 1995; 4: p.185-194.
62. Persing, D.H., Target selection and optimization of amplification reaction. In: Diagnostic molecular microbiology, 88-102. Editors: David H. Persing, Thomas F. Smith, Fred C. Tenover, Thomas J. White, ASM. 1993
63. Hayashi, K., Manipulation of DNA by PCR. In: PCR- the Polymerase chain reaction, 3-14. Editors.: K.B. Mullis, F. Ferre & R.A. Gibbs, Birkhäuser. 1994
64. Innis, M.A., Gelfand, DH. Optimization of PCRs. In: PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic press. 1990; p.3-11,
65. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, Prof. Dr. Rıza DURMAZ 2. Baskı Nobel Tıp Kitabevi 2001
66. Cristina Baleriola, Harpreet Johal, Brendan Jacka, Sandra Chaverot, Scott Bowden, Sara Lacey and William Rawlinson, Stability of Hepatitis C Virus, HIV, and Hepatitis B Virus Nucleic Acids in Plasma Samples after Long-Term Storage at -20 °C and -70 °C, Journal of Clinical Microbiology. 2011; p. 3163–3167
67. Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice / Edition 2, Editors: Fred C. Tenover, Yi-Wei Tang, Frederick S. Nolte, Randall T. Hayden, Alex van Belkum ASM Press-2010
68. Charlieu, J.-P., PCR as a technique used daily in molecular biology. In: PCR Technology, current innovations, 1-4. Eds.: G. Hugh & A.M. Griffin, CRC press.1994
69. Rolfs, A., Schuller, I., Finckh, U. & Weber-Rolfs, I. PCR principles and reaction components, 1-18. In: PCR: Clinical diagnostics and research, Springer 1992.

70. D'Aquila, R.T., Bechtel, L.J., Videler, J.A., Eron, J.J., Gorczyca, P. & Kaplan, J.C., Maximizing sensitivity and specificity of PCR by preamplification heating. *Nucleic Acids Res.* 1991 Jul 11; 19(13): 3749.
71. Durmaz R., Moleküler Yöntemlerin Uygulanmasında Karşılaşılan Sorunlar. IV.Ulusal Viral Hepatit Sempozyumu, Kongre kitabı Ankara 1998: 78-85
72. Rolfs, A., Schuller, I., Finckh, U. & Weber-Rolfs, I. (1992). Physical features of thermocyclers and their influence on the efficiency of PCR amplification, 259-262. In: *PCR: Clinical diagnostics and research*, Springer.
73. Douglas, A. & Atchinson, B. Degradation of DNA during denaturation step of PCR. In: *PCR-Methods and Applications*, 1993;3(2): 133-134. Cold Spring Harbor.
74. Hosta, F. Enhancement of specificity and yield of PCR. United States Biochemical Corp. Editorial comments.1991;18(3): p.1-5.
75. Bockstahler LE. Overview of international PCR standardisation efforts. *PCR-Methods and Applications*, 1994
76. *Principles of Instrumental Analysis*, 6th edition Editors: Skoog, Holler, Crouch-Brooks and Cole, 2007
77. *Molecular Method Verification*, Donna M. Wolk and Elizabeth M. Marlowe, *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*, 3rd Edition Edited by David H. Persing et al. 2016 ASM Press, Washington, DC
78. Metotların Geçerli Kılınması (Validasyonu) ve Teyidi (Verifikasyonu) Çalışmalarında Sık Yapılan Hatalar ve Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar, 2.Ulusal Laboratuvar Akreditasyonu ve Güvenliği Sempozyumu, 2014
79. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics Eurachem Guide; Second Edition* 2014.
80. European cooperation for Accreditation of Laboratories (EAL-P11). *Validation of Test Methods, General principles and concepts*. Edition 1. Feb. 1997.

81. Rabenau HF, Kessler HH, Kortenbusch M, Steinhorst A, Raggam RB, Berger A. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology, Review. *Journal of Clinical Virology* 40 (2007); 93-98
82. Validation of Analytical Methods Review and Strategy. LC GC Europe. 1998;11(2):96-105.
83. Analytical Procedures and Methods Validation; Chemistry, Manufacturing and Controls Documentation. Draft Guidance U.S. August 2000 CMC.
84. Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) User Guide.https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012924_Maxima_SYBR_GreenROX_qPCR_MasterMix_k0221_UG.pdf
85. Ampliqon Multiplex TEMPase 2x PCR Master Mix. <http://www.ampliqon.com>
86. QuantiTect Multiplex PCR Kits. <https://b2b.qiagen.com/tr/shop/pcr/real-time-pcr-enzymes-and-kits/two-step-qrt-pcr/quantitect-multiplex-pcr-kits/#productdetails>
87. Ersin Karataylı, Yasemin Çelik Altunoglu, Senem Ceren Karataylı, S. Gökçe K. Alagöz, Kubilay Çınar, Kendal Yalçın, Ramazan İdilman, Cihan Yurdaydın, A. Mithat Bozdayı, A one step real time PCR method for the quantification of hepatitis delta virus RNA using an external armored RNA standard and intrinsic internal control, *Journal of Clinical Virology*. 2014;60: p. 11–15
88. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları: Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi; Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 934, Ankara, 2014
89. Fleiss, J. L., B. Levin, M. C. Paik. (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*. 3rd ed. New York: Wiley.
90. Majid Sohrabi, Ashraf Mohabati Mobarez, Nima Khoramabadi, Reza Hosseini Doust, Mehrdad Behmanesh Efficient Diagnosis and Treatment Follow-Up of Human Brucellosis by a Novel Quantitative TaqMan Real-Time PCR Assay: a Human Clinical Survey *Journal of Clinical Microbiology*. Dec. 2014; p. 4239–4243

91. Wei Ling Yu, Klaus Nielsen, Review of Detection of *Brucella* spp. by Polymerase Chain Reaction, Croat Med J. 2010; 51: 306-13.
92. Maryam Garshasbi, Ali Ramazani, Rahim Sorouri, Siamak Javani, Soheila Moradi Molecular detection of *Brucella* species in patients suspicious of Brucellosis from Zanjan, Iran Brazilian Journal of Microbiology. 2014; 45(2): 533-538.
93. Gemechu MY, Singh Gill JP, Arora AK. Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay for Rapid Diagnosis and Its Role in Prevention of Human Brucellosis in Punjab, India. Int J Prev Med 2011;2(3):170-1.
94. Zerva L, Bourantas K, Mitka S, Kansouzidou A, Legakis NJ. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. J Clin Microbiol. 2001;39(4):1661-4.
95. Queipo- Ortuño MI, Morata P, Ocón P, Manchado P, Colmenero JD. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral- blood PCR assay. J Clin Microbiol 1997; 35: 2927–2930.
96. Maria Isabel Queipo-Ortuño, Juan De Dios Colmenero, Manuel Macias, Maria Jose Bravo and Pilar Morata, Preparation of Bacterial DNA Template by Boiling and Effect of Immunoglobulin G as an Inhibitor in Real-Time PCR for Serum Samples from Patients with Brucellosis, Clin. Vaccine Immunol. 2008; 15(2):293–296.
97. Tabibnejad M, Alikhani M Y, Arjomandzadegan M, Hashemi S H, Naseri Z. et al. The Optimization of Molecular Detection of Clinical Isolates of *Brucella* in Blood Cultures by *eryD* Transcriptase Gene for Confirmation of Culture-Negative Samples, Iran Red Crescent Med J. 2016;18(4): e23879.
98. Khashayar Mohseni, Reza Mirnejad, Vahab Piranfar, Shiva Mirkalantari, A Comparative Evaluation of ELISA, PCR, and Serum Agglutination Tests For Diagnosis of *Brucella* Using Human Serum. Iran J Pathol 2017; 12(4):371-376.

99. Pilar Morata, María I. Queipo-Ortun˜o, Jose M. Reguera, Miguel A. García-Ordon˜ez, Ana Cardenas, and Juan D. Colmenero, Development and Evaluation of a PCR–Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Human Brucellosis, *Journal of Clinical Microbiology*, Jan. 2003; p. 144–148
100. İpek Kaplan Bulut, Mustafa Orhan Bulut, Derya Büyükkayhan, Dilara İçağasioğlu Semra Kara, Fatoş Tanzer, Asım Gültekin, Ömer Cevit, Çocukluk Çağında Bruselloz: Takip Edilen Olguların İncelenmesi, *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 27 (4):133 – 136.
101. Baysallar M, Aydogan H, Kilic A, Kucukkaraaslan A, Doganci L. Evaluation of the BacT/ALERT and BACTEC 9240 automated blood culture systems for growth time of *Brucella* species in a Turkish tertiary hospital. *Med Sci Monitor* 2006; 12: 235-238.
102. Dal T, Celen MK, Ayaz C, Dal MS, Kalkanli S, Mert D, et al. Brucellosis a major problem: A five years experience. *Acta Medica Mediterranea*. 2013;164(9):665–70.
103. Hajia M, Falah F. Comparison of Methods for Diagnosing Brucellosis. *Lab Medicine*. Dec. 2013; 44(1).
104. M.G. Álvarez-Ojeda, et al.: Comparison of the tests for detection of *Brucella* *Gac Med Mex*. 2015;151:579-85
105. Navarro E, Segura JC, Castano MJ, Solera J. 2006. Use of real-time quantitative polymerase chain reaction to monitor the evolution of *Brucella melitensis* DNA load during therapy and post-therapy follow-up in patients with brucellosis. *Clin Infect Dis*. 2006 May 1;42(9):1266-73.
106. M. I. Queipo-Ortun˜o, J. D. Colmenero, M. J. Bravo M. A. Garcia-Ordenez and P. Morata, Usefulness of a quantitative real-time PCR assay using serum samples to discriminate between inactive, serologically positive and active human brucellosis *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 1128–1134
107. Redkar R, Rose S, Bricker B, DelVecchio V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Mol. Cell. Probes*. 2001 Feb;15(1):43-52.

- 108.Das A., Kumar B., Chakravarti S., Prakash C., Singh R. P., Gupta V., Singh P.K., Agrawal R.K., Chaturvedi V. K., Abhishek, Shrinet G. Rapid visual isothermal nucleic acid-based detection assay of *Brucella* species by polymerase spiral reaction. Journal of Applied Microbiology. 2018;125(3):646–654.
- 109.Sagi M, Nesher L, Yagupsky P. The Bactec FX blood culture system detects *Brucella melitensis* bacteremia in adult patients within the routine 1-week incubation period. J Clin Microbiol. 2017; 55: 942–946
- 110.Queipo-Ortuno et al. Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. Clinical Microbiology and Infection. 2005;11(9):713-718

8- EKLER

EK-1: ETİK KURUL ONAYI



T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

SAYI : 26379996 / 126

14.06.2017

KONU : 14.06.2017 Tarih ve 125 Sayılı Kurul Kararı

Sayın: Prof. Dr. Rıza DURMAZ
Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi
Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Sorumlu Araştırmacılığını yapmış olduğunuz **"Brusellozun Tanısında Kullanılabilecek Real - Time PCR Yönteminin Geliştirilmesi"** isimli Dr. Hasan ZEYBEK' in tez çalışması Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun **14/06/2017** tarih ve **125** sayılı kararı ile başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesi etik ve bilimsel açıdan uygun bulunmuştur

Bilgilerinize rica ederim.

Yrd. Doç. Dr. Halil KARA
Klinik Araştırmalar Etik Kurul
Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Hasan ZEYBEK 1986 yılında Antalya iline bağlı Serik ilçesinde doğdu. İlk ve ortaöğrenimini Serik’te tamamladı. 2004 yılında girdiği Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden 2009 yılında mezun oldu. 2014 yılından bu yana Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.