

Kandan ve Kan Kültür Şişelerinden *Brucella* Saptanmasında İki Farklı Ticari DNA Ekstraksiyon Kiti ve PCR Master Miksinin Karşılaştırılması

Comparison of Two Commercial DNA Extraction Kits and PCR Master Mixes for the Detection of *Brucella* from Blood Samples and Blood Culture Bottles

Tuba DAL¹, Ziya Cibali AÇIKGÖZ¹, Tuğcan BAŞYİĞİT¹, Hasan ZEYBEK¹, Rıza DURMAZ¹

¹ Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

¹ Ankara Yıldırım Beyazıt University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 04.12.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 23.03.2018

ÖZ

Brusellozun tanısında klinik bulguları destekleyen kültür veya serolojik yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Bakterinin izolasyonu altın standart olarak kabul edilmekle birlikte, geç sonuç alınmakta ve pozitif kültürlerde yapılan çalışmalar laboratuvar kaynaklı bruselloz riski taşımaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) prensibine dayanan yöntemler brusellozun erken tanısı ve laboratuvar kaynaklı bruselloz riskinin azaltılması bakımından yeni yaklaşımlar sunmaktadır. PCR yöntemlerinin tanıda kullanılabilmesi için klinik örnekten kaynaklanan inhibitörlerin DNA ekstraksiyonu aşamasında uzaklaştırılmış olması gerekmektedir. Bu çalışmada, doğrudan tam kanda ve kan kültür şişesinde gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR) ile *Brucella* araştırılmasında, farklı DNA ekstraksiyon kitlerinin inhibitörleri uzaklaştırma performansları iki ayrı ticari PCR master miksi ile test edilerek, tanıda kullanılacak en uygun "ekstraksiyon kiti-PCR master miksi" kombinasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. *Brucella melitensis* ATCC 23456 suşu kullanılarak hazırlanmış olan ve farklı sayılarda (10^2 - 10^4 cfu/ml) bakteri içeren 30 simüle kan örneği ve pozitif sinyal veren 10 kan kültür şişesi kullanılarak, iki farklı DNA ekstraksiyon kiti ve amplifikasyon master miksinin performansı değerlendirilmiştir. Ekstraksiyon kiti olarak; NORGEN Kan DNA izolasyon kiti (NORGEN) ve "Thermo Scientific GeneJet Whole blood genomic DNA purification kiti (Thermo)"; PCR master miksi olarak "QuantiTect multiplex PCR (QuantiTect)" (Qiagen, Hilden, Almanya) ve "Ampliçon Multiplex TEMPase (Ampliçon)" (Kopenhag, Danimarka) kullanılmıştır. Multipleks olarak uygulanan 160 adet Rt-PCR deneyinde *Brucella* spp., *B. melitensis* ve deney içi kontrol olarak da gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH)'a özgü primerler ve floresan boyalarla işaretli problemler kullanılmıştır. Kandan

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Tuba Dal, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye. Tel (Phone): +90 312 324 1555, E-posta (E-mail): tuba_dal@yahoo.com

ekstrakte edilen DNA örnekleri üzerinde yapılan 120 adet Rt-PCR çalışmasında GAPDH prob/primerleri örneklerin tamamında pozitif sonuç vermiştir. *Brucella* spp. için Rt-PCR'da pozitif bulunma yüzdeleri sırasıyla NORGEN-QuantiTect kombinasyonunda %96.7, Thermo-Ampliqon kombinasyonunda %93.3, Thermo-Quantitect kombinasyonunda %93.3 ve NORGEN-Ampliqon kombinasyonunda %86.7 olarak tespit edilmiştir. *B. melitensis* için bu değerler sırasıyla %96.7, %93.3, %56.7 ve %90 olarak bulunmuştur. Bakteri yoğunluğu 10^2 cfu/ml olan örneklerde *Brucella* spp. saptanma yüzdeleri Thermo-Ampliqon ve NORGEN-Ampliqon için %80, Thermo-QuantiTect ve NORGEN-QuantiTect için %90 olarak belirlenmiştir. *B. melitensis* varlığında elde edilen pozitif bulunma yüzdeleri ise sırasıyla %90, %70, %20 ve %90 olarak saptanmıştır. Norgen DNA izolasyon kiti kullanılarak kan kültürü şişelerinden elde edilen DNA örnekleri ile yapılan Rt-PCR çalışmaları %80 düzeyinde pozitif sonuç vermiştir. Fakat Thermo DNA ekstraksiyon kitiyle elde edilen DNA örneklerinde Rt-PCR pozitiflik düzeyi yalnızca %20 olarak saptanmıştır. Bu örneklerin %80'inde GAPDH için uygulanan PCR testi de negatif sonuç vermiştir. Çalışmanın sonuçları kandan ve kan kültürlerinden kaynaklanan inhibitörlerin uzaklaştırıldığından emin olmak ve örneklerde düşük seviyede mevcut olan *Brucella* bakterilerini dahi saptayabilmek için tanı amaçlı uygulanacak PCR temeline dayanan çalışmalarda; Norgen DNA ekstraksiyon kiti ile QuantiTect veya Ampliqon master miksi kombinasyonunun kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar sözcükler: *Brucella*; gerçek zamanlı PCR; kan kültürü.

ABSTRACT

The diagnosis of human brucellosis requires culture or serological tests for the confirmation of the clinical findings. Isolation of the bacteria is used as a gold standard, however it is time consuming and processing of positive cultures has a potential risk for laboratory acquired human brucellosis. Polymerase chain reaction (PCR) based methods have offered new approaches for early diagnosis of brucellosis and reduce the risk of laboratory acquired human brucellosis. A major limitation of the PCR method is the difficulty to remove the inhibitors in specimens. The aim of this study was to determine the performance of two DNA extraction kits by using two separate PCR master mixes and to determine appropriate "extraction kit - PCR master mix" combination for the diagnosis of *Brucella* from whole blood samples and blood culture bottles. Two commercial DNA extraction kits, NORGEN Blood DNA isolation kit (Norgen) and Thermo Scientific GeneJet Whole blood genomic DNA purification kit (Thermo Fisher Scientific, USA) and two PCR master mixes, QuantiTect multiplex PCR (QuantiTect, Qiager, Almanya) and Ampliqon Multiplex TEMPase (Ampliqon, Denmark) were assessed on 30 simulated blood samples with known concentrations (10^2 - 10^4 cfu/ml) of *Brucella melitensis* ATCC 23456 strain and 10 blood culture bottles that gave positive signal. By using different combinations of extraction kits and PCR master mixes, a total of 160 different multiplex real-time PCR (Rt-PCR) trials were performed with probes and primers specific to *Brucella* spp., *B. melitensis*, and the internal control glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). All the 120 Rt-PCR trials performed on the DNA samples extracted from blood samples gave positive results with GAPDH probe/primers. The rate of positive PCR results for *Brucella* spp. was 96.7% for the combination of Norgen-QuantiTect, 93.3% for Thermo-Ampliqon, 93.3% for Thermo-QuantiTect, and 86.7% for Norgen-Ampliqon. The frequency of positive *B. melitensis* results for these combinations were 96.7%, 93.3%, 56.7% and 90%, respectively. In the samples with the bacterial density of 10^2 cfu/ml, *Brucella* spp. detection rates were 80% for Thermo-Ampliqon and Norgen-Ampliqon, and 90% for Thermo-QuantiTect and Norgen-QuantiTect; and for *B. melitensis* positive rates were 90%, 70%, 20%, and 90%, respectively. Rt-PCR assays with the DNA samples extracted from blood culture bottles using Norgen isolation kit yielded 80% positive result. However, the frequency of PCR positive results was only 20% in the DNA samples extracted by Thermo DNA extraction kit. PCR result for GAPDH gene was also negative in 80% of the samples extracted by Thermo kit. Our results revealed that for the removal of inhibitors and detection of even low number of *Brucella* spp./*B. melitensis* in blood samples and blood culture bottles, NORGEN Blood DNA isolation kit can be used with a combination of QuantiTect multiplex PCR or Ampliqon Multiplex TEMPase

Keywords: *Brucella*; real-time PCR; blood culture.

GİRİŞ

Bruselloz, insanlara enfekte hayvanlar ile temas, süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi veya inhalasyon yoluyla geçen, geniş bir yelpazede klinik bulgulara, relapslara, komplikasyonlara neden olan mortalitesi düşük fakat morbiditesi yüksek bir hastalıktır. Türkiye'deki insidansı 12-50/100.000'dir¹. Öte yandan, dünyada da en yaygın zoonozdur; her yıl 500.000 yeni olgu bildirilmektedir². Hastalığın etkeni olan *Brucella* bakterileri laboratuvar çalışanlarına bulaşma riski yüksek olan patojenler arasında yer almaktadır. *Brucella melitensis* dünyadaki bruselloz olgularından en sık izole edilen türdür³. Ülkemizdeki bruselloz olgularının %99'dan fazlasından *B.melitensis* sorumludur⁴.

Brucella bakterileri gastrointestinal sistem, deri ve solunum yolu ile alındıktan sonra ilk olarak bölgesel lenf bezlerinde (mezenterik, servikal, aksiller, supraklaviküler) çoğalır. Ardından hematogen yolla retikülo-endotelyal sisteme (RES) ve tüm vücuda yayılır. Bakteri böylece karaciğer, dalak, kemik iliği, böbrek, endokart, santral sinir sistemi ve genital organlara yerleşebilir. Brusellozda inkübasyon süresi 1-3 hafta olup sıklıkla klinik tablo hastalarda ateş yüksekliği, halsizlik, terleme yakınmaları ortaya çıkar. Ateş, yavaş yavaş artış göstererek en yüksek seviyeye ulaşır, ardından aynı şekilde azalır. Brusellozun semptom ve bulguları özgül değildir ve birçok hastalığı taklit edebilir^{1,3,5}.

Brusellozun tanısında kültür altın standart olmakla birlikte günümüzde kullanılan tam otomatik kan kültür sistemlerinde bile pozitif sinyal sonucu bakterinin tanımlanması için geçen süre; kan örnekleri için yaklaşık beş gün, kemik iliği örnekleri için ise yaklaşık yedi günü bulmaktadır^{6,7}. Kültüre dayalı yöntemlerin bir diğer olumsuz yönü ise laboratuvar kaynaklı bulaş riskini arttırmasıdır⁸. Bu nedenle tam kan/kan kültür şişesindeki örnekten doğrudan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminin uygulanması geleneksel yöntemlerin yetersiz kaldığı olguların erken ve doğru tanısına ve laboratuvar kaynaklı bulaş oranının azaltılmasına katkı sağlayacaktır. Ancak, kan kültür şişeleri ve tam kan, moleküler yöntemler açısından sorunlu örneklerdir. Kandan yapılan PCR testlerindeki başlıca problem, örnekteki inhibitörlerden kaynaklanan yanlış negatif sonuç verilen durumlardır⁹⁻¹¹. Hemoglobin/hem, lökosit DNA'sı, IgG fraksiyonu, bilirubin, safra tuzları ve laktoferrin kan kaynaklı PCR inhibitörleridir. Ayrıca, anti-koagülan olarak kullanılan EDTA, sodyum sitrat ve heparinin de inhibitör etkisi bulunmaktadır^{11,12}. Bu inhibitörlerin amplifikasyon tüpünde eser miktarda bulunması bile yanlış negatif sonuçlara yol açabilmektedir. Ekstraksiyondan sonra DNA örneğinde kalmış olan %0.004 oranındaki kan veya hem'in *Taq* DNA polimeraz enzimini inhibe ettiği bilinmektedir¹¹. Kan veya serum örneklerinde inhibitörlere bağlı yanlış negatifliklerin oranı %0.34-14 arasında değişmektedir¹³⁻¹⁵. Diğer yandan kan kültürü besiyerlerinde bulunan "sodium polyanetholesulfonate (SPS)" başta olmak üzere birçok maddenin de PCR üzerinde inhibitör etkisi bulunmaktadır¹⁶. PCR temelli yöntemlerin rutin tanıda kullanılabilmesi için örnek kaynaklı inhibitörlerin ortamdaki uzaklaştırılması kritik önem arz etmektedir.

Bu çalışmada, doğrudan tam kandan ve kan kültür şişesinden PCR ile *Brucella* tanısında, farklı DNA ekstraksiyon kitlerinin inhibitörleri uzaklaştırma performansları iki ayrı ticari PCR master miksi ile test edilerek, tanıda kullanılacak uygun "ekstraksiyon kiti-amplifikasyon miksi" kombinasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada ekstraksiyon kitleri olarak spin kolon prensibi ile çalışan NORGEN Blood DNA izolasyon kiti (Biotek, Kanada) ve “Thermo Scientific GeneJet Whole blood genomic DNA purification kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD)” kullanıldı.

PCR master miks olarak ise bruselloz tanısındaki etkinliği konusunda literatürde eksiklikler bulunan “QuantiTect multiplex PCR (Qiagen, Hilden, Almanya)” ve “Ampliçon Multiplex TEMPase (Ampliçon, Kopenhag, Danimarka)” kitleri kullanıldı.

Kitlerin performansları *B. melitensis* ATCC 23456 suşu kullanılarak hazırlanmış olan 30 simüle kan örneği ve pozitif sinyal veren 10 kan kültür şişesi üzerinde araştırıldı. Çalışılan örnek sayılarının belirlenmesinde, laboratuvarında optimize edilen kantitatif moleküler testlerin validasyonu için Rabenau HF ve arkadaşları¹⁷ tarafından önerilmiş olan sayılar esas alınmıştır.

Simüle Kan Örneklerinin ve Kan Kültürü Şişelerinin Hazırlanması

B. melitensis ATCC 23456 suşunun McFarland 0.5 bulanıklığındaki ($\sim 1.5 \times 10^8$ cfu/ml) stok çözeltisi, *Brucella* ile enfekte olmadığı klinik ve laboratuvar verileriyle doğrulanmış hastadan alınan kan örneğinde sulandırılarak yüksek (1.5×10^4 cfu/ml), orta (1.5×10^3 cfu/ml) ve düşük (1.5×10^2 cfu/ml) bakteri yoğunluğunda olmak üzere her birinden 10’ar, toplam 30 örnek hazırlandı.

B. melitensis üremiş bir kan kültür şişesi hafifçe çalkalandıktan sonra buradan alınan 100’er µl örnek, ekim yapılmamış 10 adet kan kültür şişesinin (Bactec plus Aerobic/F Culture Vials, BD, ABD) her birine inoküle edildi. Bu şişelere ayrıca *Brucella*-negatif olduğu laboratuvarında doğrulanmış hastalardan alınan tam kandan da 10’ar ml eklendi. Belirtilen şekilde simülasyon ekimleri yapılan şişeler, otomatize cihazda inkübasyona bırakıldı. Üreme sinyalinin alınmasının ardından da DNA ekstraksiyonu aşamasına geçildi.

DNA Ekstraksiyonu

Simüle kan örneklerinin her birinden ve üreme sinyali veren kan kültür şişelerinden alınan 200’er µl örnekten NORGEN Blood DNA izolasyon kiti (Biotek, Kanada) ve Thermo Scientific GeneJet Whole blood genomic DNA purification kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak, üretici firmaların önerilerine uyulmak suretiyle, DNA ekstraksiyonları yapıldı^{18,19}.

Multipleks Gerçek Zamanlı PCR Uygulamaları

İki ayrı ekstraksiyon kiti ile elde edilen DNA örneklerinin her birinden QuantiTect Multiplex PCR kit (Qiagen, Hilden, Almanya) ve Ampliçon Multiplex TEMPase 2X master mix (Ampliçon, Kopenhag, Danimarka) kullanılarak, kit prospektüsleri takip edilerek^{20,21}, 160 farklı multipleks gerçek zamanlı-PCR (Rt-PCR) çalışmaları yapıldı. Rt-PCR işlemlerinde *Brucella* spp., *B. melitensis* ve deneyi içi inhibitör kontrolü (internal kontrol) olarak kullanılan gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH)’a özgü primerler ve floresan boya ile işaretli probalar kullanıldı^{22,23}. Multipleks olarak gerçekleştirilen 20 µl Rt-PCR

Tablo 1. *Brucella spp.*, *B.melitensis* ve GAPDH İçin Kullanılan Primer ve Prob Dizileri ^{22,23}

| Primer/prob | Primer/prob baz dizileri |
|----------------------|--|
| <i>Brucella spp.</i> | Forward 5'-GCTCGGTTGCCAATATCAATGC-3' Reverse 5'-GGGTAAAGCGTCGCCAGAAG-3' Probe 5'-Joe-AAATCTTCCACCTTGCCCTTGCCATCA-Tamra-3' |
| <i>B.melitensis</i> | Forward 5'-ACAAGCGGCACCCCTAAAA-3' Reverse 5'-CATGCGCTATGATCTGGTTACG-3' Probe 5'-Fam-CAGGAGTGTTCGGCTCAGAATAATCCACA-Tamra-3' 5'-GCT-GTTGAAGTTAATACTGTACCTGC-3' |
| GAPDH | Forward 5'-CCACCCATGGCAAATTCC-3' Reverse 5'-TCGCTCCTGGAAGATGGTG-3' Probe 5'-Rox-TGGCACCGTCAAGGCTGAGAACGT-BHQ-2-3' |

amplifikasyon tüpünün içeriğinde; 10 µl master miks (2x), her bir primerden 8 pmol, her bir probdan 4 pmol ve 3 µl ekstraksiyon ürünü olacak şekilde hazırlandı. Kitlerin amplifikasyon koşulları birbirlerine çok yakın olması nedeniyle ısı döngü cihazında ortak program uygulandı. Amplifikasyon koşulları; 95°C'de 15 dakikalık ilk denatürasyonu takiben 40 siklus halinde uygulanan 94°C'de 20 sn denatürasyon, 60°C'de 90 sn bağlanma ve uzama olarak belirlendi. Bağlanma ve uzama aşamasında sinyal toplama işlemi gerçekleştirildi. Çalışmada, Tablo 1'de gösterilen primer ve problar kullanıldı.

İstatistiksel Analiz

Thermo ve NORGEN ekstraksiyon kitleriyle elde edilen DNA örneklerinde QuantiTect ve Ampliqon amplifikasyon mikserleriyle elde edilen pozitif bulunma yüzdeleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı SPSS 20.0 programı kullanılarak McNemar testiyle araştırıldı. $p < 0.05$ olan sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmada internal kontrol olarak amplifiye edilen GAPDH geninin, 120 Rt-PCR deneyinin tamamında pozitif sonuç verdiği saptanmıştır. Ekstraksiyon kitlerinin her ikisinin de kan kaynaklı inhibitörleri başarılı bir şekilde uzaklaştırdığı tespit edilmiştir.

Bakteri yoğunlukları dikkate alınmaksızın iki ekstraksiyon kitini iki ayrı amplifikasyon miksiyle eşleştirerek yapılan 120 çalışmada; Rt-PCR'da pozitif sonuç sıklığının %56.7-96.7 arasında değiştiği gözlenmiştir. *Brucella spp.* için Rt-PCR'da gözlenen pozitif bulma yüzdeleri, NORGEN-QuantiTect kombinasyonu için %96.7 (29/30), Thermo-Ampliqon kombinasyonu için %93.3 (28/30), Thermo-QuantiTect kombinasyonu için %93.3 (28/30) ve NORGEN-Ampliqon kombinasyonu için %86.7 (26/30) olarak tespit edilmiştir. Elde edilen pozitif sonuç yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). *B.melitensis* için Rt-PCR'da pozitif bulma yüzdeleri ise; NORGEN-QuantiTect kombinasyonu için %96.7 (29/30), Thermo-Ampliqon için %93.3 (28/30), NORGEN-

Amplikon kombinasyonu için %90 (27/30), Thermo-QuantiTect kombinasyonu için %56.7 (17/30) olarak bulunmuştur (Tablo II). Thermo-QuantiTect kombinasyonundan elde edilen pozitif sonuç saptama sıklığı diğerlerinden anlamlı derecede düşük olarak bulunmuştur ($p= 0.001$).

Ekstraksiyon kitleri ve amplifikasyon mikslarının performansları bakteri yoğunluklarına göre değerlendirildiğinde; 10^4 , 10^3 ve 10^2 cfu/ml *B.melitensis* içeren örneklerde *Brucella* spp. prob-primeriyle NORGEN-Amplikon, NORGEN-QuantiTect, Thermo-Amplikon ve Thermo-QuantiTect kombinasyonlarından elde edilen pozitif sonuç sıklığı sırasıyla %80-100, %90-100, %80-100 ve %90-100 olarak saptanmıştır. *B.melitensis* primer ve problemleri için bu değerler sırasıyla %70-100, %90-100, %90-100 ve %20-80 olarak tespit edilmiştir (Tablo II). Bakteri yoğunluklarındaki azalmaya paralel olarak elde edilen pozitif sonuç sıklığı da düşük olarak saptanmıştır. Pozitif sonuç sıklığındaki en fazla düşüş bakteri yoğunluğu 10^2 cfu/ml olan örneklerde gözlenmiştir. Bu örneklerde *Brucella* spp. saptanma yüzdeleri Thermo-Amplikon ve NORGEN-Amplikon kombinasyonu için %80, Thermo-QuantiTect ve NORGEN-QuantiTect kombinasyonları için %90 olarak tespit edilmiştir. *B.melitensis* için elde edilen pozitif sonuç sıklığı ise sırasıyla %90, %70, %20 ve %90 olarak tespit edilmiştir (Tablo II).

Multipleks Rt-PCR deneylerinden elde edilen "cycle threshold (Ct)" değerleri, bakteri yoğunluğundan etkilendiği gibi, ekstraksiyon kiti-amplifikasyon miksi kombinasyonlarına göre de değişim göstermiştir. Deney içi kontrol olarak kullanılan GAPDH gen bölgesine özgü prob/primerleriyle elde edilen ortalama Ct değerlerinin Thermo-QuantiTect kombinasyonu için 18-23, Thermo-Amplikon kombinasyonu için 17-23, NORGEN-QuantiTect kombinasyonu için 32-37 ve NORGEN-QuantiTect kombinasyonu için 20-24 arasında

Tablo II. Simüle Kan Örneklerinde DNA Ekstraksiyon Kiti ve Amplifikasyon Miksi Kombinasyonlarının Pozitif Sonuç Sıklığının Karşılaştırılması

| Bakteri/yoğunluk (cfu/ml) | NORGEN DNA ekstraksiyon kiti Rt-PCR pozitiflik oranı (%) | | Thermo DNA ekstraksiyon kiti Rt-PCR pozitiflik oranı (%) | |
|---------------------------|---|---------------------------|---|---------------------------|
| | Amplikon Master Miks | QuantiTect Master Miks | Amplikon Master Miks | Quantitect Master Miks |
| <i>Brucella</i> spp. | | | | |
| 10^4 | 10/10 (100) | 10/10 (100) | 10/10 (100) | 9/10 (90) |
| 10^3 | 8/10 (80) | 10/10 (100) | 10/10 (100) | 10/10 (100) |
| 10^2 | 8/10 (80) | 9/10 (90) | 8/10 (80) | 9/10 (90) |
| Toplam | 26/30 (86.7) | 29/30 (96.7) | 28/30 (93.3) | 28/30 (93.3) |
| <i>B.melitensis</i> | | | | |
| 10^4 | 10/10 (100) | 10/10 (100) | 10/10 (100) | 8/10 (80) |
| 10^3 | 10/10 (100) | 10/10 (100) | 9/10 (90) | 7/10 (70) |
| 10^2 | 7/10 (70) | 9/10 (90) | 9/10 (90) | 2/10 (20) |
| Toplam | 27/30 (90) | 29/30 (96.7) | 28/30 (93.3) | 17/30 (56.7) |

Tablo III. Simülasyon ile Hazırlanmış Olan Pozitif Sinyal Veren 10 Adet Kan Kültür Şişesinde DNA Ekstraksiyon Kitlerinin Performanslarının Karşılaştırılması

| Primer/Prob | Rt-PCR pozitiflik oranı (%) (Quantitect ve Ampliqon Master Miks)* | | |
|----------------------|--|------------------------------|--|
| | İlk uygulama | | İkinci uygulama |
| | NORGEN DNA ekstraksiyon kiti | Thermo DNA ekstraksiyon kiti | Thermo DNA ekstraksiyon kiti (1/5 sulandırılmış DNA örnekleri) |
| <i>Brucella</i> spp. | 9/10 (90) | 2/10 (20) | 9/10 (90) |
| <i>B.melitensis</i> | 8/10 (80) | 2/10 (20) | 8/10 (80) |
| GAPDH | 10/10 (100) | 2/10 (20) | 9/10 (90) |

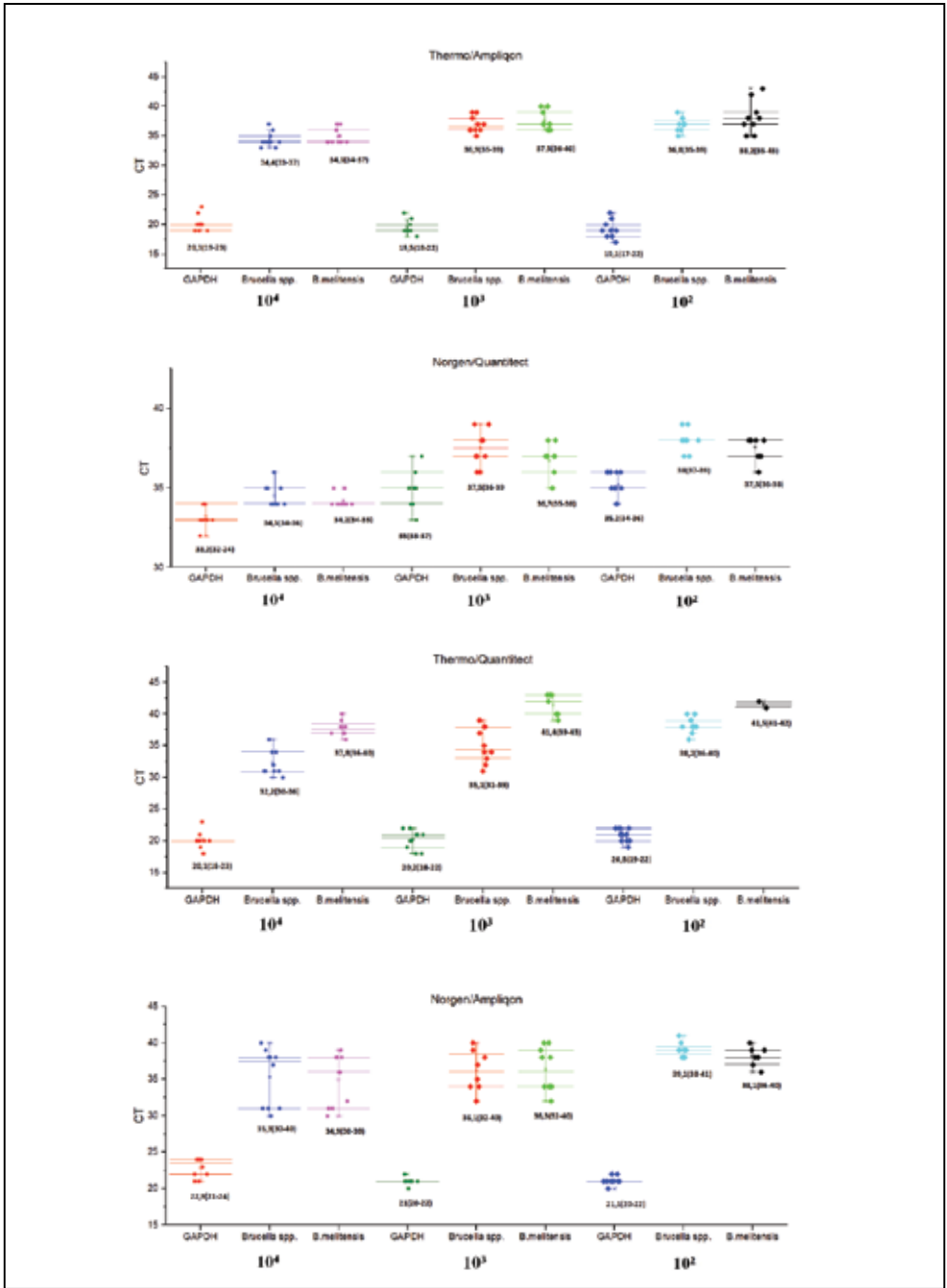
* QuantiTect ve Ampliqon master miksleriyle yapılan Rt-PCR pozitiflik oranları eşit bulunmuştur.

olduğu belirlenmiştir. Örnekteki bakteri sayısı azaldıkça, pozitif sonuç alınması için gerekli olan döngü sayısı ve Ct değerleri artmaktaydı. Bakteri yükü 10^4 cfu/ml ile 10^2 cfu/ml olan örneklerin Ct değerleri arasında 2-7; bakteri yükü 10^3 cfu/ml ile 10^2 cfu/ml olanların Ct değerleri arasında ise 0.5-3 fark saptanmıştır. Thermo-QuantiTect hariç, diğer üç kombinasyonda *Brucella* spp. ve *B.melitensis* prob/primerleri birbirine yakın Ct değerlerinde pozitif sonuçlar vermiştir (Şekil 1).

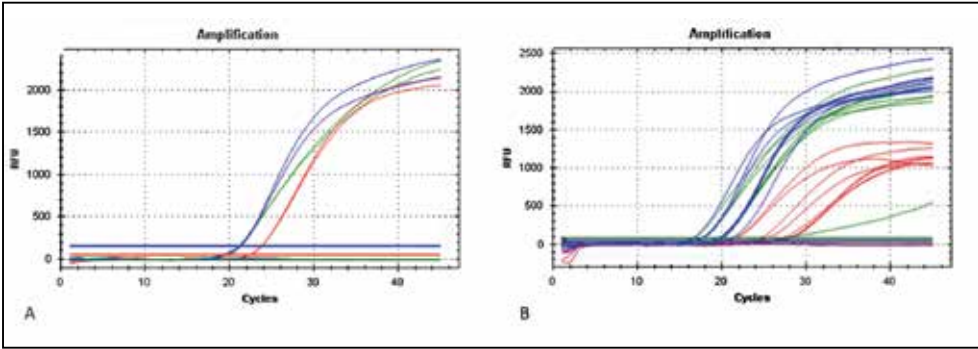
Kırk ayrı Rt-PCR halinde gerçekleştirilen ilk seri çalışmada Thermo kiti ile elde edilen DNA örneklerinin %20'sinde, NORGEN kiti ile elde edilenlerin ise %80'inde hem *Brucella* spp. hem de *B.melitensis* pozitif olarak saptanmıştır (Tablo III, Şekil 2). İki yüzde arasında anlamlı derecede fark saptanmıştır ($p= 0.016$). Thermo kiti ile elde edilen DNA örneklerinde GAPDH'ye yönelik PCR pozitifliğinin düşük olması nedeniyle, ortamda inhibitör bulunduğu düşünülerek, ikinci seri çalışmada bu yöntemle ekstrakte edilmiş olan DNA örnekleri 1/5 oranında sulandırılmış ve amplifikasyon tekrarlanmıştır. Bu işlem sonucunda yeni PCR pozitif sonuç sıklığının *Brucella* spp. için %90, *B.melitensis* için %80 olduğu belirlenmiştir (Tablo III). Çalışmada QuantiTect ve Ampliqon miksleri ile yapılan Rt-PCR'lerin pozitif sonuç sıklığı eşit olarak saptanmıştır.

TARTIŞMA

Bruselloz hayvancılığın yaygın olduğu ülkemizde sık görülen, genellikle et, süt ve süt ürünlerinin tüketilmesiyle bulaşan bir zoonozdur. Serolojik yöntemlerle bruselloz tanısında halen güçlüklerle karşılaşmaktadır. Altın standart olan kültür de gerek duyarlılık gerekse süre açısından sorunlar taşımaktadır. Tam otomatik kan kültür sistemleriyle pozitif üreme sinyali alınması için geçen süre; kan örnekleri için yaklaşık beş gündür^{6,7}. Brusellozda kan kültürü duyarlılığının %10-90 arasında değiştiği bildirilmektedir²³. Ayrıca kan kültürlerinde üreyen bakterilerin tür tayini sırasında laboratuvar kaynaklı bulaş sık karşılaşılan bir durumdur. Literatürde, bruselloz olgularının %2'sinin laboratuvar kaynaklı olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle tam kandan veya kan kültür şişesinden direkt olarak PCR yapılması hastaya erken ve doğru tanının konulmasında faydalı olabileceği gibi, laboratuvar kaynaklı bulaş oranını da düşürecektir²⁴.



Şekil 1. Simüle kan örneklerinde iki DNA ekstraksiyon kiti ve amplifikasyon mikserinin değişik kombinasyonlarıyla uygulanan multiplex Rt-PCR testinden elde edilen Ct değerleri.



Şekil 2. On adet kan kültür şişesinden Thermo Scientific GeneJet Whole blood genomic DNA ekstraksiyon kiti (A) ve NORGEN Blood DNA ekstraksiyon kiti (B) ile yapılan DNA ekstraksiyonu sonrası multipleks Rt-PCR sonuçları. Şekilde mavi amplifikasyon eğrileri *Brucella spp.*'ye, yeşil amplifikasyon eğrileri *B.melitensis*'e ve kırmızı eğriler GAPDH'ye aittir.

Literatürde, hayvanlarda bruselloz tanısına yönelik PCR uygulamaları yaygın olmakla birlikte, insanlarda *B.melitensis* tanısında PCR kullanımı ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. İlhan ve arkadaşları²⁵, kesilmiş koyunlarda yaptıkları, 45'i seropozitif, 117'si seronegatif 162 örnek içeren çalışmalarında; kan ve lenfoid dokudan *Brucella* izolasyonunda kültür ve PCR'nin etkinliklerini karşılaştırmışlar; kan örneklerinin %1.2'sinde, lenfoid doku örneklerinin %17.2'sinde *B.melitensis* üremesine karşılık; PCR ile aynı örneklerde sırasıyla %27.7 ve %29 oranında pozitif sonuç saptamıştır²⁵. Hasani ve arkadaşları²⁶ İran'da yaptıkları çalışmada, PCR-ELISA yöntemini diğer moleküler ve serolojik testlerle karşılaştırmış; çalışmaya, serum titreleri 1/80'in üzerinde olan bruselloz şüpheli hastalardan alınan 52 kan örneği dahil edilmiştir. PCR-ELISA ile 28 örnekte pozitiflik saptanmış, bu yöntemin kültürden anlamlı olarak ($p < 0.05$) daha duyarlı olduğu bildirilmiştir²⁶. Çifti ve arkadaşları²⁷ abortus materyali, kan, süt, semen ve serum örneklerinin sırasıyla %35.1, %1.1, %24.8, %5 ve %8'inde PCR ile pozitiflik saptamıştır. Álvarez-Ojeda ve arkadaşları²⁸, bruselloz salgını sırasında 92 şüpheli olgunun kan örneklerinden elde edilen PCR sonuçlarını, seroloji ve kan kültür verileriyle karşılaştırmıştır. DNA ekstraksiyonunda "Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB)" ekstraksiyon yönteminin kullanıldığı bu çalışmada, 23 örnekte PCR ile pozitif sonuç saptanmıştır. Çalışmada ayrıca Rose Bengal testi ile karşılaştırıldığında PCR testinin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %44.7 ve %95.6; 2-mercaptoethanol testi ile karşılaştırıldığında ise %53.6 ve %87.5 olarak tespit edilmiştir. Kültür ile karşılaştırıldığında ise duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %100 ve %80.2 olarak saptanmış, PCR'nin bruselloz tanısında değerli bir yöntem olabileceği bildirilmiştir.

Literatürdeki çalışmalar, brusellozun tanısında PCR'nin yeri olabileceğini, ancak pozitif sonuç saptama sıklığında büyük değişiklikler görülebileceğini ortaya koymaktadır. PCR sonucunu etkileyen en önemli aşamalardan biri DNA ekstraksiyonudur. Bu aşamada kullanılacak yöntemin veya ticari kitin doğru seçilmesi gerekmektedir. Kamel ve arkadaşları²⁹, *B.melitensis* 16M standart suşu kültüründen DNA izolasyonunda altı farklı DNA ekstraksiyon yöntemini karşılaştırmış ve en yüksek genomik DNA eldesinin CTAB ile sağlandığını bildirmiştir. Queipo-Ortuño ve arkadaşları, serum örneklerinde yedi ticari DNA

ekstraksiyon kitinin performansını araştırmış; UltraClean DNA BloodSpin Kitinin, serumdan *Brucella* DNA izolasyonu için en iyi yöntem olduğunu saptamıştır³⁰.

İki farklı ekstraksiyon kitinin karşılaştırıldığı çalışmamızda, 10^4 cfu/ml, 10^3 cfu/ml, 10^2 cfu/ml *Brucella* bakterisi içeren simüle tam kan örneklerinin hepsinde internal kontrol olarak kullanılan GAPDH genine yönelik prob/primerlerle pozitif sonuçlar alınmış olması, ekstraksiyonda kullanılan Thermo ve NORGEN kitlerinin kandaki PCR inhibitörlerini elimine etmede başarılı olduklarını göstermiştir. Ayrıca farklı ekstraksiyon-amplifikasyon kit kombinasyonlarıyla çalışılmış olan örneklerdeki internal kontrollere ait Ct değerlerinin birbirine yakın bulunmuş olması, kullanılan Rt-PCR yönteminden alınan sonuçların tekrarlanabilir ve güvenilir olduğunu desteklemektedir.

DNA ekstraksiyon kitleriyle iki farklı amplifikasyon master miksinin çapraz kombinasyonları ile yapılan Rt-PCR sonuçlarının karşılaştırıldığı çalışmamızda, *Brucella* spp. için en yüksek PCR pozitif sonuç yüzdesine sahip kombinasyonun NORGEN-QuantiTect (%96.7) olduğu saptanmıştır. Ancak, bu oranın Thermo-QuantiTect (%93.3), Thermo-Ampliqon (%93.3) ve NORGEN-Ampliqon (%86.6) kombinasyonlarından alınan değerlerden anlamlı derecede yüksek olmadığı belirlenmiştir. Buna karşılık, *B.melitensis* için, NORGEN-QuantiTect (%96.7), Thermo-Ampliqon (%93.3) ve NORGEN-Ampliqon (%90) kombinasyonlarıyla tespit edilen PCR pozitif sonuçların Thermo-QuantiTect (%56.7) kiti ile tespit edilmiş olan değerden anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Bakteri konsantrasyonu 10^4 ve 10^3 cfu/ml olan örneklerde farklı ekstraksiyon kitleri ve amplifikasyon mikslerinden alınan PCR pozitif sonuçları birbirine benzer olmakla birlikte, düşük bakteri konsantrasyonu (10^2 cfu/ml) içeren örneklerdeki *Brucella* spp. PCR pozitif sonuç yüzdeleri %80-90, *B.melitensis* PCR pozitif sonuç yüzdeleri ise %20-90 arasında dağılım göstermiştir. *Brucella* spp. saptanmasında; kullanılan ekstraksiyon kiti-amplifikasyon miksi kombinasyonlarının pozitif sonuç saptama sıklığı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. *B.melitensis* için en iyi sonuç NORGEN-QuantiTect ve Thermo-Ampliqon (%90) kombinasyonlarından, en kötü sonuç ise Thermo-QuantiTect (%20) kombinasyonundan alınmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlardan hareketle düşük bakteri konsantrasyonu içeren tam kan örneklerinden, gerek cins düzeyinde gerekse tür düzeyinde *Brucella* saptanmasında Thermo-QuantiTect kombinasyonu hariç, diğer üç kombinasyondan herhangi birinin kullanılabilceği sonucuna varılmıştır. Bu kombinasyonlarla reaksiyon başına 2-3 *B.melitensis* DNA'sı bulunan örneklerin %80-90'ından pozitif sonuç alınabilmektedir. Pozitif sonuç saptama sıklığının yüksek olması yanında NORGEN-QuantiTect kombinasyonu, özellikle az sayıda bakteri içeren örneklerde diğer kombinasyonlara göre daha erkenden pozitif sonuçlar vermiştir. Bu kombinasyondan alınan Ct değerleri diğerlerinden alınanlardan 1-3 birim daha düşük bulunmuştur.

Ticari kan kültür şişelerinin içeriğinde bulunan sodium polyanethol-sulfonate (SPS), resin partikülleri ve lize edici ajanların PCR'de inhibisyona neden olabileceği belirtilmektedir¹⁷. Kandaki hemin de önemli bir PCR inhibitörüdür²⁴. Kan kültür şişelerinde yapılan ilk seri Rt-PCR çalışmasında NORGEN kitinin performansının *Brucella* spp. için %90, *B.melitensis* için %80, Thermo kitinin performansının ise her ikisi için %20 olduğu

belirlenmiş, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ancak ikinci uygulamada Thermo kiti ile elde edilen örneklerin 1/5 sulandırılmasının; pozitif sonuç saptama sıklığını %80'e çıkardığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar, ekstraksiyon örneklerinin seyreltilmesinin PCR inhibisyonunu önemli oranda azalttığını göstermektedir. Ancak, sulandırılmış örneklerde GAPDH'nin %10 oranında negatif sonuç vermesi inhibisyonun az da olsa devam ettiğini düşündürmektedir. Kan kültür şişesinden yapılan çalışmalarda kullanılan QuantiTect ve Ampliqon master mikslarının birbirlerine üstünlüklerinin olmadığı, her iki kit ile aynı pozitif sonuç sıklığının elde edildiği saptanmıştır.

Sonuç olarak, çalışmada kullanılan Thermo ve NORGEN DNA ekstraksiyon kitlerinin her ikisinin de kandaki inhibitörleri uzaklaştırmada başarılı oldukları, kandan gerek cins düzeyinde gerekse tür düzeyinde *Brucella* saptanmasında, Thermo-QuantiTect kombinasyonu dışındaki diğer üç kombinasyondan herhangi birinin kullanılabilceği ortaya konulmuştur. Bu kombinasyonlarla reaksiyon başına 2-3 DNA veya örneğin millilitresinde yaklaşık 10^2 bakteri bulunması durumunda dahi %80 ve üzerinde pozitif sonuç alınabilmektedir. Kan kültür şişelerindeki inhibitörleri uzaklaştırma açısından NORGEN kiti daha başarılı bulunmuştur. Thermo kiti kullanıldığında örneklerin %80'inde inhibitör kaynaklı yanlış negatif sonuçlar alınmıştır. Ekstraksiyon örneklerinin sulandırılmasıyla inhibitör kaynaklı sorunun önemli seviyede giderildiği gözlenmiştir. Sonuçlar kandan ve kan kültürlerinden kaynaklanan inhibitörlerin uzaklaştırıldığından emin olmak ve örneklerde bulunacak düşük seviyede *Brucella* bakterilerini dahi saptayabilmek için tanı amaçlı uygulanacak PCR temeline dayanan çalışmalarda; Norgen DNA ekstraksiyon kitinin QuantiTect veya Ampliqon master mikslarıyla başarılı bir şekilde kullanılabilceğini göstermiştir.

Yazarların bu çalışmada kullanılan kit ve malzeme firmalarıyla çıkar ilişkisi veya çatışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Öncel S. *Brucella* enfeksiyonları: Değerlendirme ve Yönetim. Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2016; 2(3): 25-30.
2. Golshani M, Buozari S. A review of Brucellosis in Iran: Epidemiology, risk factors, diagnosis, control and prevention. Iran Biomed J 2017; 21(6):349-59.
3. Dal T, Celen MK, Ayaz C, et al. Brucellosis a major problem: a five years experience. Acta Medica Mediterranea 2013; 164(9): 665-70.
4. Kiliç S, Ivanov IN, Durmaz R, et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis genotyping of human *Brucella* isolates from Turkey. J Clin Microbiol 2011; 49(9): 3276-83.
5. Tuon FF, Gondolfo RB, Cerchiari N. Human-to-human transmission of *Brucella*-a systematic review. Trop Med Int Health 2017; 22(5): 539-46.
6. Eskazan AE, Dal MS, Kaya S, Dal T, Ayyıldız O, Soysal T. Two cases of autoimmune hemolytic anemia secondary to brucellosis: a review of hemolytic disorders in patients with brucellosis. Intern Med 2014; 53(11): 1153-8.
7. Garofolo G, Di Giannatale E, Platone I, et al. Origins and global context of *Brucella* abortus in Italy. BMC Microbiol 2017; 17(1): 28.
8. Çerekeçi A, Kılıç A, Bayraktar M, Uyanık MH, Yaşar E, Esen B. İnsan kaynaklı *Brucella* izolatlarının tanımlama ve tiplendirmesinde konvansiyonel yöntemler ile gerçek zamanlı multipleks polimeraz zincir reaksiyonunun karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2011; 45(3): 392-11.

9. Oyata O, Jatón K, Prodhom G, Greub G. Molecular and mass spectrometry detection and identification of causative agents of bloodstream infections, pp: 336-361. In: Persing HD, Tenover FC, Hayden RT (eds). *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. 2016, 3rd ed. ASM Press Washington, DC.
10. Zhang Z, Kermekchiev MB, Barnes WM. Direct DNA amplification from crude clinical samples using a PCR enhancer cocktail and novel mutants of Taq. *J Mol Diagn* 2010; 12(2): 152-61.
11. Radström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol Biotechnol* 2004; 26(2): 133-46.
12. Al-Soud WA, Radström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2): 485-93.
13. Kramvis A, Bukofzer S, Kew MC. Comparison of hepatitis B virus DNA extractions from serum by the QIAamp blood kit, GeneReleaser, and the phenol-chloroform method. *J Clin Microbiol* 1996; 34(11): 2731-3.
14. Drosten C, Seifried E, Roth WK. TaqMan 5' nuclease human immunodeficiency virus type 1 PCR assay with phage-packaged competitive internal control for high-throughput blood donor screening. *J Clin Microbiol* 2001; 39(12): 4302-8.
15. Nolte FS, Fried MW, Shiffman ML, et al. Prospective multicenter clinical evaluation of AMPLICOR and COBAS AMPLICOR hepatitis C virus tests. *J Clin Microbiol* 2001; 39(11): 4005-12.
16. Fredricks DN, Relman DA. Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfonate. *J Clin Microbiol* 1998; 36(10): 2810-6.
17. Rabenau HF, Kessler HH, Kortenbusch M, Steinhorst A, Raggam RB, Berger A. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. *J Clin Virol* 2007; 40(2): 93-8.
18. NORGEN Blood DNA Isolation Mini Kit. <https://NORGENbiotek.com/sites/default/files/resources/Blood-DNA-Mini-Kit-Insert-PI46300-15.pdf>
19. Thermo Scientific Gene Jet Whole blood genomic DNA purification kit. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0781>.
20. Ampliqon Multiplex TEMPase 2X master mix. <https://ampliqon.com/download.ashx?sku=A260301>.
21. Quantitect multiplex PCR handbook. <https://www.qiagen.com>.
22. Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL, Graves MH. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J Clin Microbiol* 2004; 42(3): 1290-3.
23. Karataylı E, Altunoğlu YÇ, Karataylı SC, et al. 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. *J Clin Virol* 2014; 60(1): 11-5.
24. Yagupsky P. Blood cultures for the diagnosis of human brucellosis, pp: 108-111. In: Baddour M (ed), *Updates on Brucellosis*. 2015, 1st ed. InTech. <https://www.intechopen.com/books/updates-on-brucellosis/blood-cultures-for-the-diagnosis-of-human-brucellosis>
25. İlhan Z, Aksakal A, Ekin İH, Gülhan T, Solmaz H, Erdenlig S. Comparison of culture and PCR for the detection of *Brucella melitensis* in blood and lymphoid tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep. *Lett Appl Microbiol* 2008; 46(3): 301-6.
26. Hasani SM, Mirnejad R, Amani J, Vafadar MJ. Comparing rapid and specific detection of *Brucella* in clinical samples by PCR-ELISA and multiplex-PCR method. *Iran J Pathol* 2016; 11(2): 144-50.
27. Çifti A, İça T, Savaşan S, Sareyüpoğlu, Akan M, Diker KS. Evaluation of PCR methods for detection of *Brucella* strains from culture and tissues. *Trop Anim Health Prod* 2017; 49(4): 755-63.
28. Álvarez-Ojeda MG, Saldaña-Fuentes C, Ballesteros-Elizondo MR, et al. Comparison of the tests polymerase chain reaction, serology, and blood culture with respect to sensitivity and specificity for detection of *Brucella* spp. in human samples people with positive and negative serology. *Gac Med Mex* 2015; 151: 579-85.
29. Kamel YM, Helmy NA, Hafez AA. Different DNA extraction techniques from *Brucella melitensis* 16M. *Int J Microbiol Res* 2014; 5(1): 69-75.
30. Queipo-Ortuño MI, Tena F, Colmenero JD, Morata P. Comparison of seven commercial DNA extraction kits for the recovery of *Brucella* DNA from spiked human serum samples using real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27(2): 109-14.