



T.C. Sağlık Bakanlığı
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu

HIZLI VE YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKTE BRUCELLA GENOTİPLENDİRİLMESİ İÇİN MOLEKÜLER BİR YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

SELÇUK KILIÇ, BEKİR ÇELEBİ, MEHMET GENÇ, CANAN KETRE, MUSTAFA
KOLUKIRIK

¹Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara

²Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri Ltd. Şti., İstanbul



Bruselloz

*Brucella türlerinin oluşturduğu **multisistemik bir enfeksiyon***

Bulaş

- Pastorize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketimi,
- Direkt temas,
- Enfekte aerosollerin inhalasyonu

Klinik tablo

- 1) Asemptomatik enfeksiyon
- 2) Akut (Tipik-klasik) enfeksiyon
- 3) Subakut (ondülan)
- 4) Kronik enfeksiyon

- Kesin Tanı: Kültür
- Serolojik Profil tayini
- Moleküler Tanı
- Moleküler Epidemiyoloji: Salgın Analizi, Aşı etkinliği ve sürveyans



Bruselloz

Brucella spp. genetik olarak monomorfizm



Sorun

- Tür içi ve türler arası genom farklılıklarını ortaya koymak - Genotiplendirme



- MLVA
- Tek nokta mutasyonun (SNP) taranması ve yeni nesil dizileme
- Mikroarray



- Genotipik farklılıkları yüksek çözünürlükte yansıtan 17 farklı SNP
- Kapiller elektroforez ve DNA dizi analizi gibi iş yükü ve yüksek maliyetli yöntemlerle taranması



Amaç



*Brucella türlerinin moleküler tiplendirilmesi için
yeni bir yöntemin geliştirilmesi*

Kullanım Alanı

- Hayvan, gıda ve insan izolatlarının sürveyansı
- Zamana ve coğrafik bölgeye bağlı genotiplerdeki değişim izlenmesi
- Salgınlarda köken analizi

Hızlı

Basit

Kolay
uygulanabilir

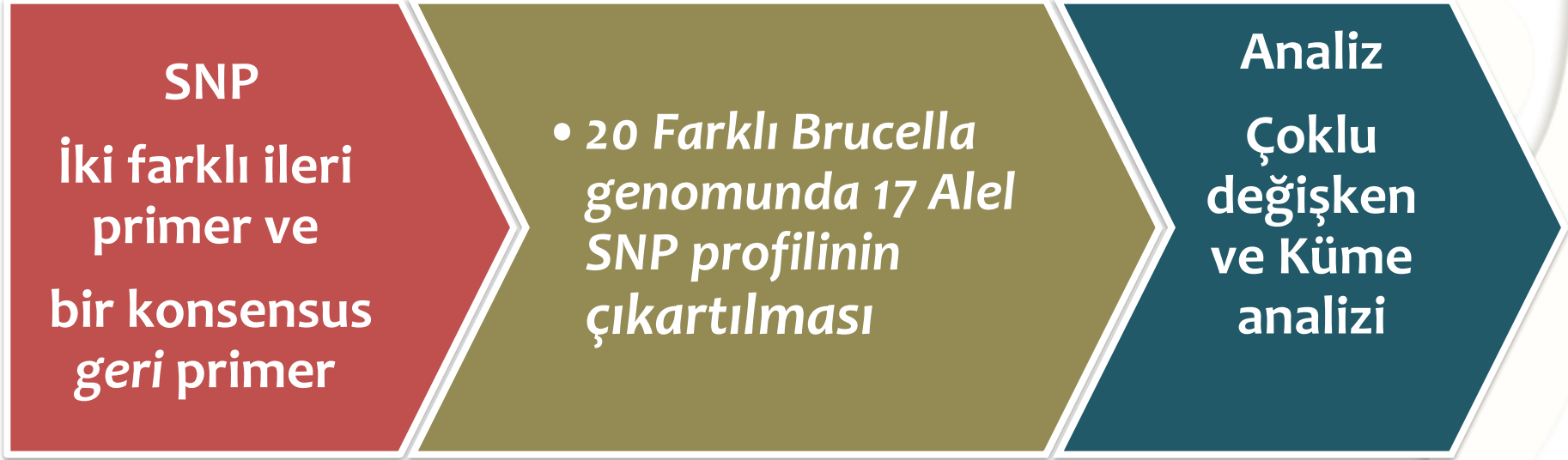
Ucuz

**17 SNP'yi hedefleyen kantitatif
gerçek zamanlı PCR (qPCR) geliştirilmesi**



MATERYAL-YÖNTEM:

SNP Ana *Brucella* kökenlerini belirlemek ve moleküler genotiplendirme için SNP tabanlı bir yöntem geliştirilmiştir.



Çalışmaya 2002-2011 yılları arasında Bruselloz ön tanılı olguların kan kültürlerinden izole edilen 34 izolat dahil edilmiştir.



MATERYAL-YÖNTEM:

Materyal



34 Kan kültür izolatu

2002-2011

İzolasyon



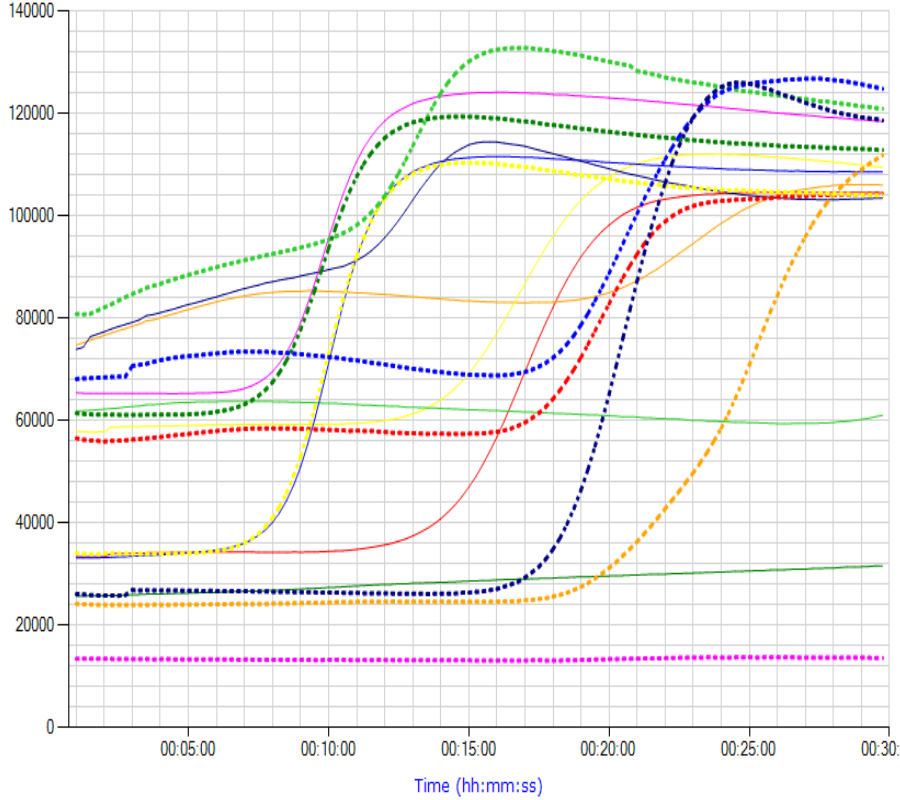
Hızlı DNA Eldesi (15 dk)

Guanidinyum tiyosiyanat ile liziz
silika kolonlar ile saflaştırma

Uzun saklama ömrü olan qPCR Ana karışımının geliştirilmesi

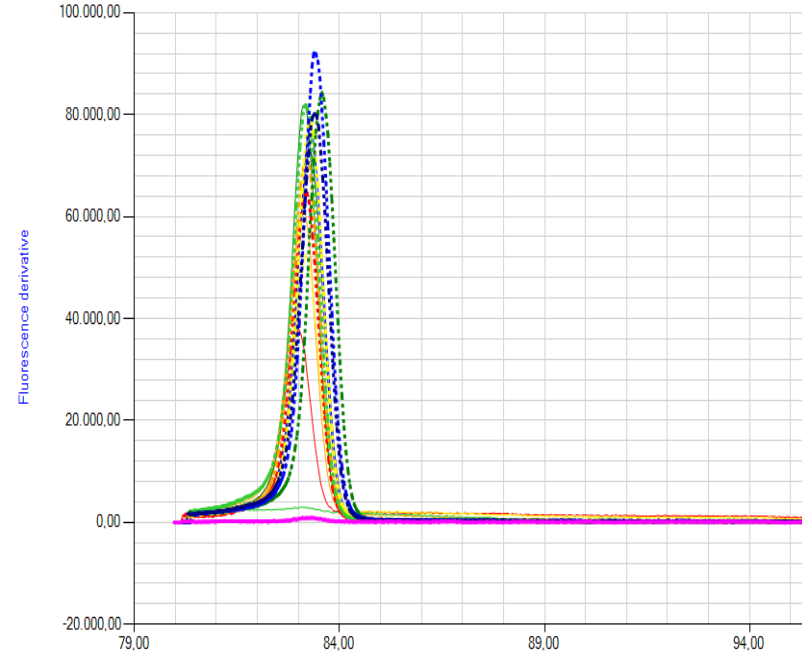


BULGULAR



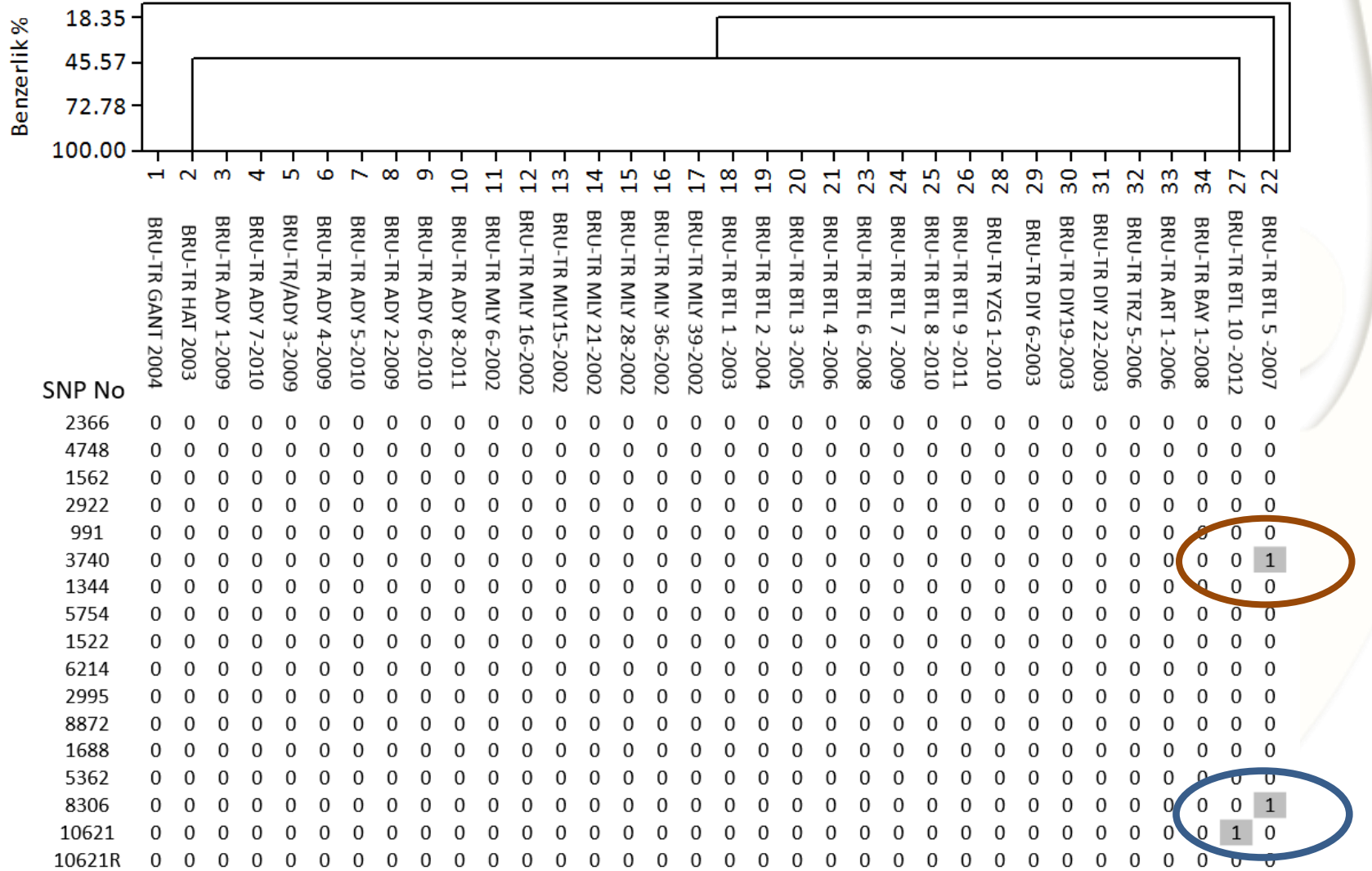
LAMP Amplifikasyonlar

'MELT CURVE' ANALİZİ





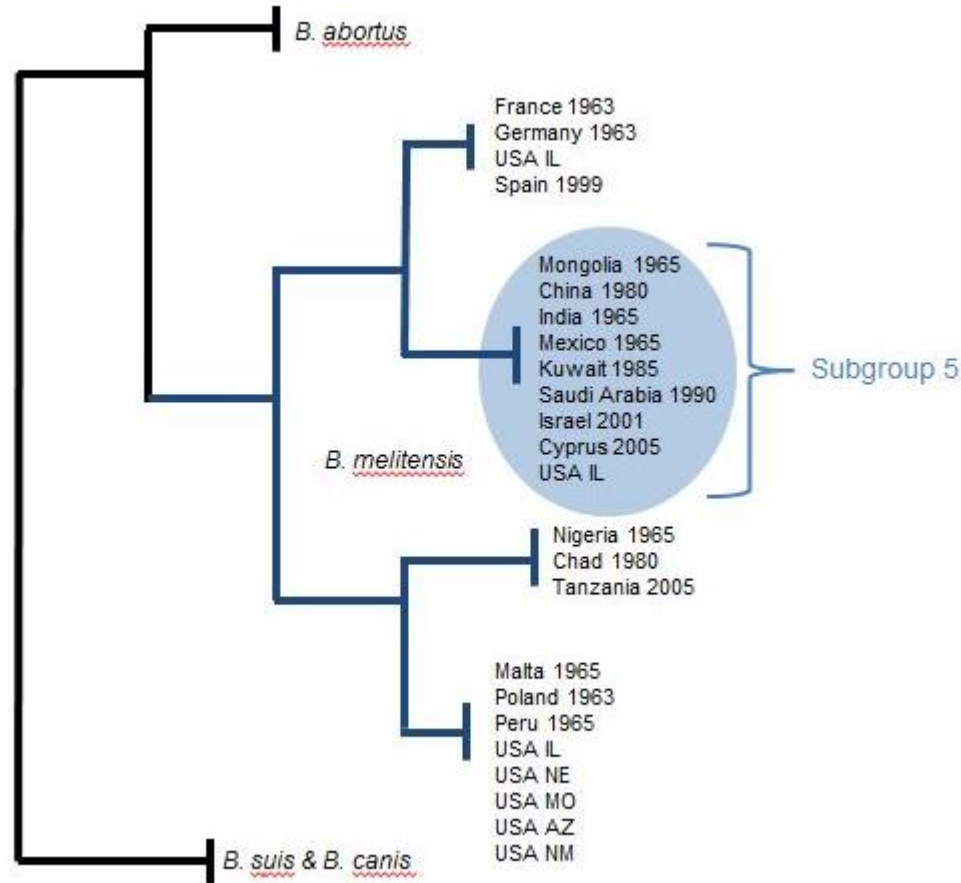
T.C. Sağlık Bakanlığı
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu



34 izolatın **32** tanesi *B.melitensis* türüne ait bir SNP profiline sahiptir .
Genotipik olarak birbirlerine **%100** benzerlik göstermekte.



***B. melitensis* suşları Doğu Akdeniz grubunda altgrup 5 içinde özel bir grup oluşturduğu saptanmıştır**





SONUÇ...

Analitik

- Kolay (Deneyimli personel olmadan uygulanabilme potansiyeli)
- **Yüksek duyarlılık** (3 kopya/rxn)
- **Hızlı** (<80 dk)

Epidemiyoloji

- **Ülkemizde tek bir dominant kökenin varlığını**

Sonuç & Yorum

Zaman ve mekana bağlı genotiplerin dağılımını belirlemek için daha fazla sayıda izolat (insan, hayvan ve gıda) ile çalışmalar yapılmalıdır.



Bruselloz Moleküler Sürveyans

Hedef



Moleküler Sürveyansın Kurulması



- Laboratuvar ağının kurulması
- Hayvan, gıda ve insan izolatlarının sürveyansı
- Zamana ve coğrafik bölgeye bağlı genotiplerdeki değişim izlenmesi
- Salgınlarda köken analizi



Sonraki adımlar

- Ulusal Veri bankasının kurulması
- Yöntemin kullanımının yaygınlaştırılması