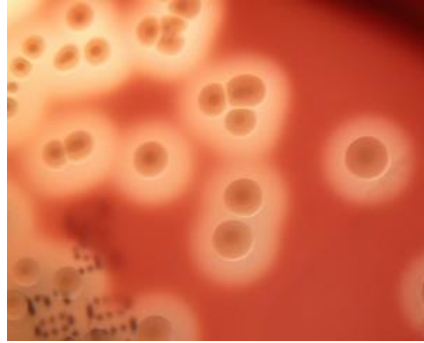
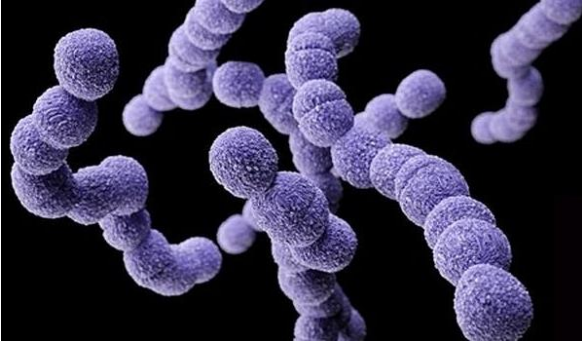




# A Grubu Beta Hemolitik Streptokoklar (AGBHS) Hızlı Tanısı İçin LAMP Tabanlı Bir Yöntem Geliştirilmesi



**SELÇUK KILIÇ, Selin Nar Ötgün, Gözde Girgin Özgümüş, Meral Turan,  
Canan Ketre, Mustafa Kolukırık**  
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara  
Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri Ltd. Şti., İstanbul



# Akut Tonsillofarenjit



## Viral Etkenler

- Rhinovirüs (%20)
- Coronavirüs (%5)
- Adenovirüs (5%)
- Herpes virüs (%4)
- Influenza-parainfluenza (%4)
- Coxsackie virus, EBV ve CMV (<%3)

## Bakteriyel Etkenler

- GABHS (Çocuklarda %15-30 ve erişkinde %5-15)
- GCBHS (%5)
- *Neisseria gonnorrhoeae* (<%1)
- *Corynebacterium diphtheriae* (<%1)
- *Arcanobacterium haemolyticum* (<%1)
- *Chlamydia pneumoniae* (?)
- *Mycoplasma pneumoniae* (<%1)

Boğaz sürüntüsü



Streptokokkal  
Tonsillofarenjit

Klinik  
tablo

## Karakteristik yakınmalar

- Ateş, Baş ağrısı, karın ağrısı, bulantı ve kusma

## Karakteristik Belirtiler

- Tonsillofarengeal eritem
- Tonsillofarengeal eksuda
- Yumuşak damakta peteşi
- Uvula'da kızarıklık ve şişli
- Ön servikal LAP
- Döküntü



- 'Altın Standart' Kültür; Duyarlılık: %90-95, 24-48 saate sonuç.
- Hızlı Antijen Saptama; Latex, ELISA, OIA, Hasta başı hızlı test (LFA, Strip);  
Duyarlılık: %65-90 ve özgüllük >%95
- Moleküler Tanı: Kültüre **eşit veya yüksek** duyarlılık; Hızlı (< 60 dk)
- Olguların %50'si GAS ile enfekte olmamasına rağmen tedavi **edilmekte**
- Olguların %30'u GAS ile enfekte olmasına rağmen tedavi **edilmemekte**



## Amaç

GAS tanısı için **moleküler tabanlı** tanı kitinin geliştirilmesi

## Kullanım Alanı

- Kültür zaman alıcı,
- Hızlı testlerin duyarlılığı düşük ve PCR yüksek maliyetli
- 2-3. Basamak Sağlık merkezleri
- Birinci basamak sağlık hizmetleri (!)

Hızlı

Basit

Kolay uygulanabilir

Güvenilir

Ucuz

Tek bir cihazda ve aşamada;

- DNA'sının eldesi
- PCR reaksiyonunun tek bir döngüde gerçekleştirilmesi
- Gerçek zamanlı bulanıklık/floresans izlemi (Görsel tanımlama)

LAMP  
isotermal Nükleik Asid Çoğaltma



# LAMP “Spiral Aracılı İzotermal Çoğaltma”

Hedef Bölge

Streptolysin B (speB) geni

DNA  
izolasyonu

- PCR inhibitörü bloklayıcı peptid kompleksi (12 dk)



Sistemler

Düşük maliyetli ‘YERLİ’ ısıtıcı ve okuyucu sistem  
Sistem 1: Tek ısı bloğu ile (95 ve 65°C’de) DNA eldesi ve amplifikasyonun **okuyucu** ile değerlendirilmesi  
Sistem 2: Tek ısı bloğu ile (95 ve 65°C’de) DNA eldesi ve amplifikasyonun **görsel** değerlendirilmesi



# MATERYAL

Analitik Duyarlılık -  
Saptama Limiti (LOD)



• RSKK  
• NCTC



Simüle  
örnek



GAS  $10^0$ - $10^4$  kob/ml içeren klinik  
örnek (n=50)

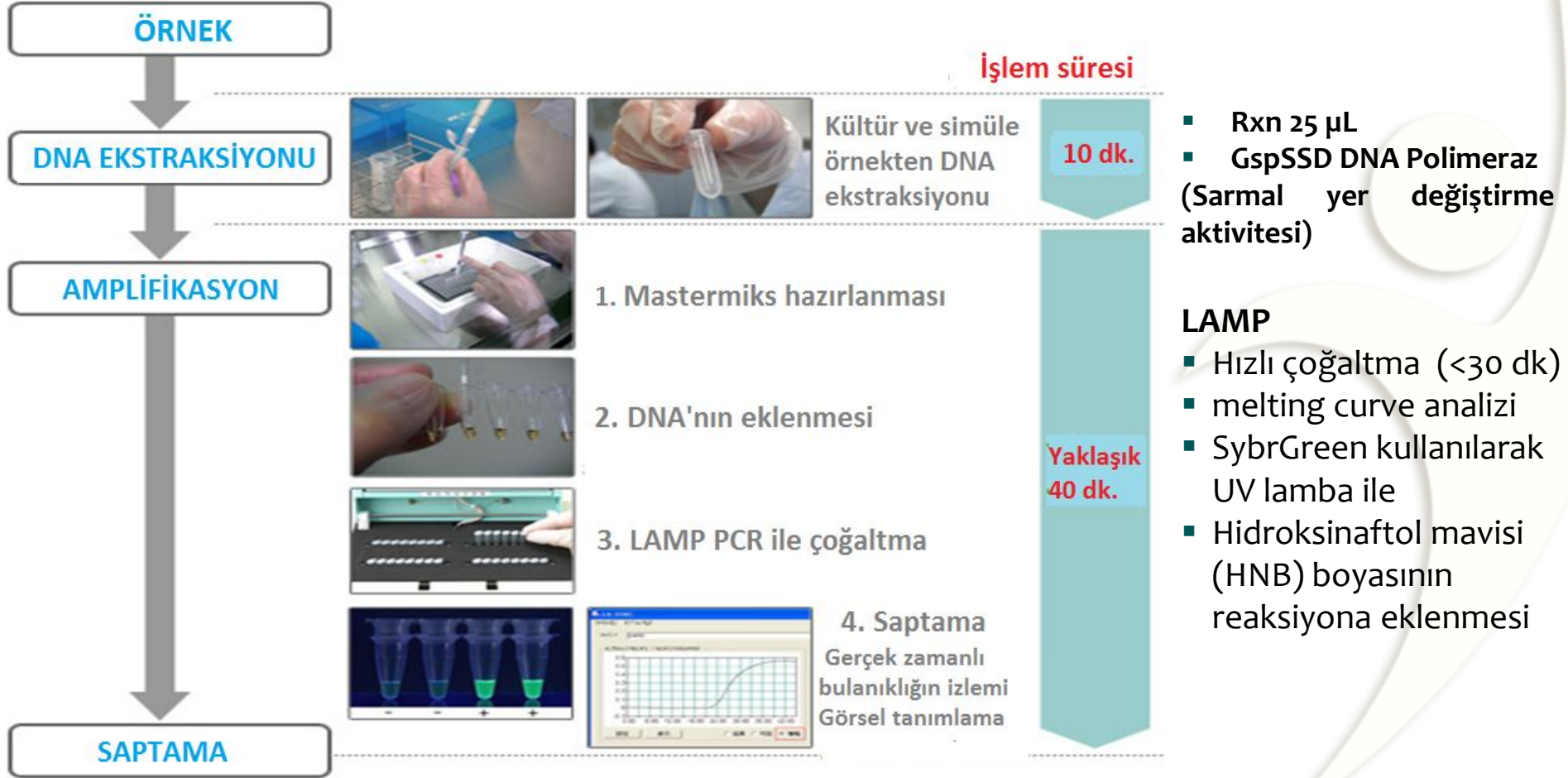
ÖZGÜLLÜK (n= 24 bakteri)  
[ $10^4$ - $10^6$  kob/ml]



1. *S.agalactiae*, *S.dysgalactiae*,  
*S.pneumoniae*, *S.mutans*
2. *S.epidermidis*, *A.haemolyticum*,  
*S.aureus*, *H.influenzae*,  
*C.pseudodiphtheriticum*,  
*C.diphtheria*, *N.meningitidis*,  
*N.pharyngitis*, *M.catarrhalis*,  
*E.coli*,
3. GAS içermeyen klinik örnek  
(n=50)

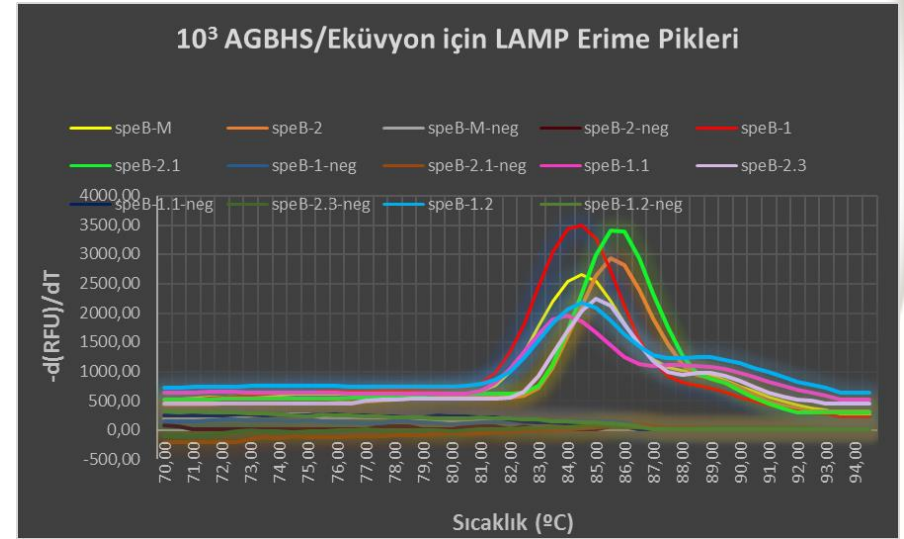
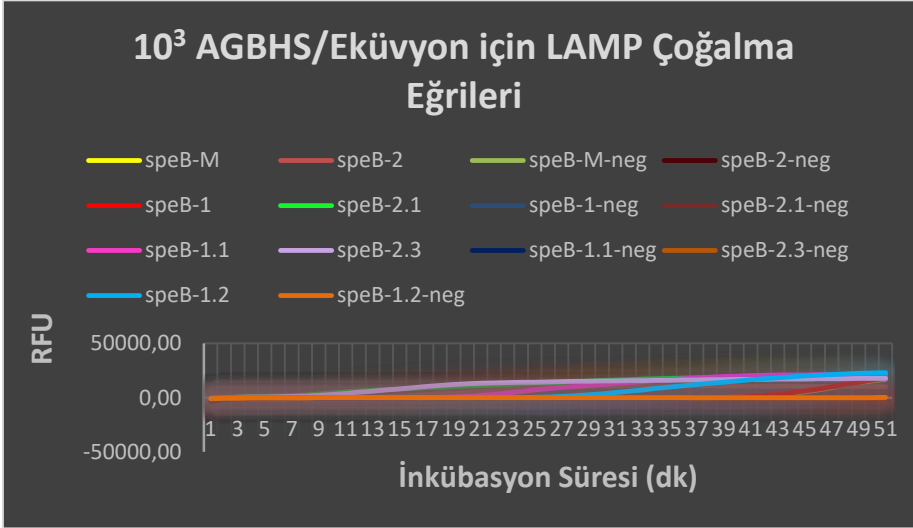


# LAMP Çalışması





# BULGULAR



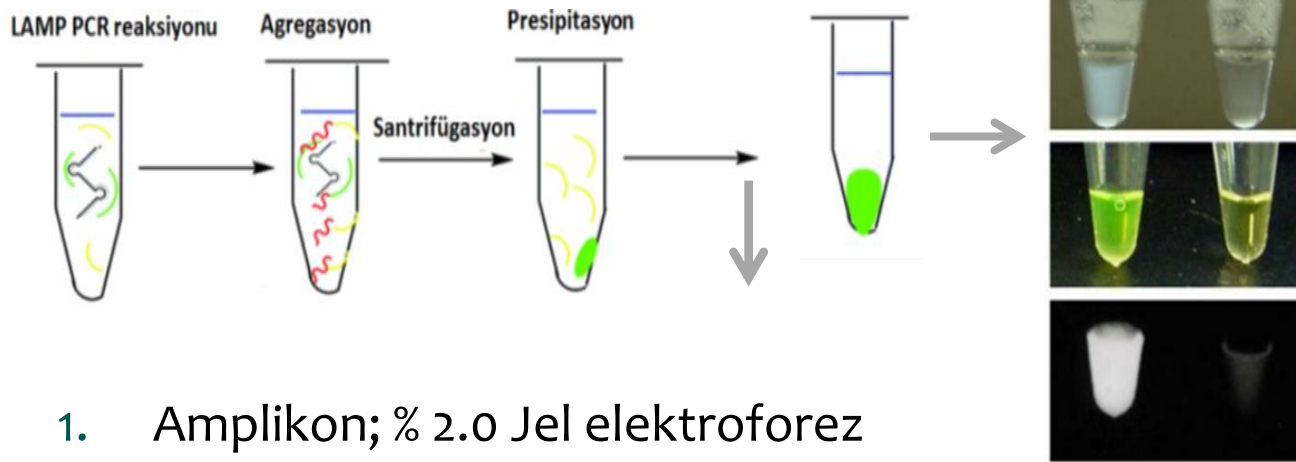
| Primer Seti          | AGBHS/Eküvyon – 30 dk | Süre            | Amplifikasyon (Dk) |
|----------------------|-----------------------|-----------------|--------------------|
| speB-2.3 ve speB-2.1 | 10 <sup>1</sup>       | 10 <sup>3</sup> | <b>&lt;10 dk</b>   |
| speB-2               | 10 <sup>2</sup>       |                 |                    |
| speB-1.1             | 6x10 <sup>2</sup>     |                 |                    |
| speB-1.2             | 10 <sup>3</sup>       |                 |                    |
| speB-M               | 10 <sup>4</sup>       |                 |                    |





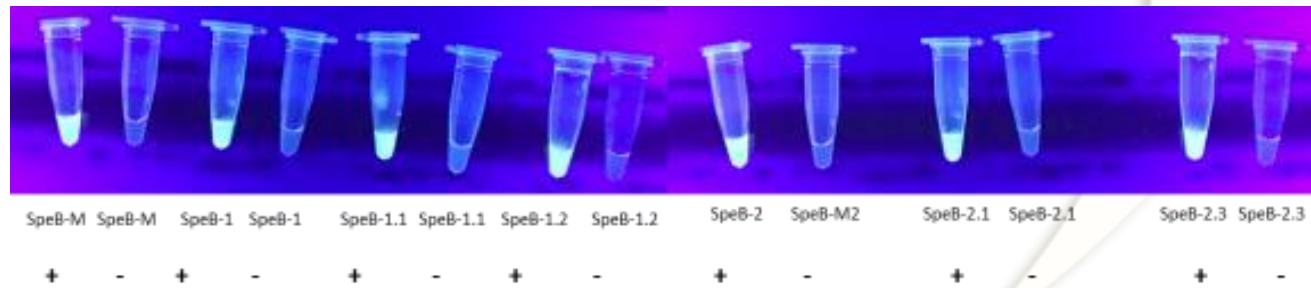
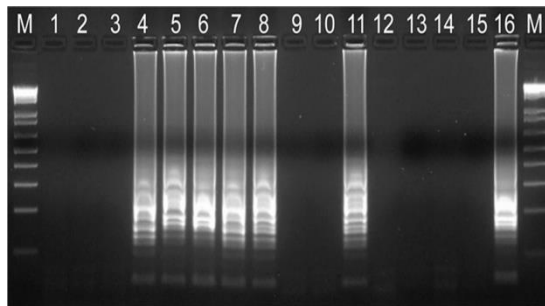
## Bulgular-2

### SYBR Green ve (GspM 2.0 LF DNA polimeraz)



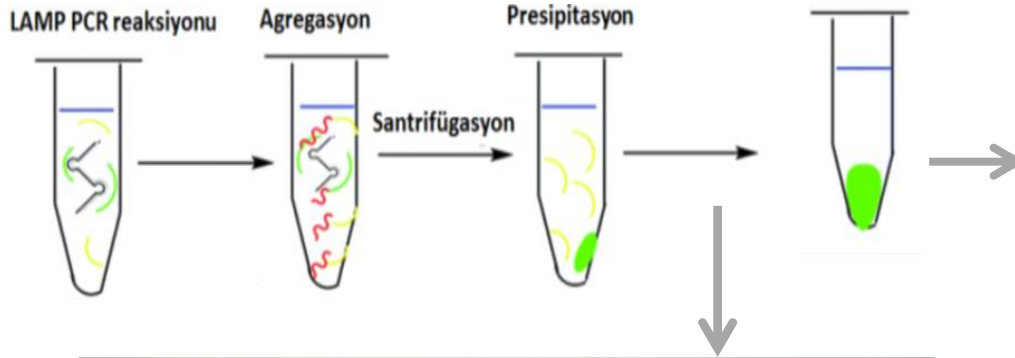
1. Amplikon; % 2.0 Jel elektroforez
2. Sekans

1. SYBR Green içermeyen örnekler
2. SYBR Green içeren örnekler
3. UV-transillüminatör SYBR içeren

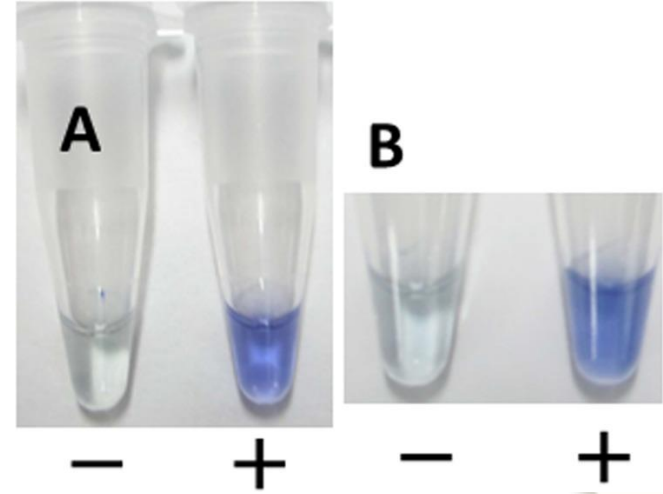




## HNB ve (GspM 2.0 LF DNA polimeraz)



## Bulgular-3





## BULGULAR-4

| LAMP           | Kültür       |   | Simüle Örnek |
|----------------|--------------|---|--------------|
|                | GAS<br>(n=8) | GAS dışı & Diğer Bakteriler<br>(24 bakteri → 28 örnek ) | Sürüntü      |
| Sonuç          | Pozitif      | Negatif   | Pozitif      |
| Saptama Sınırı | 10           | Negatif   | 100          |



## BULGULAR-5

Saptama Sınırı (LOD)

| PCR     | Kültür | Boğaz Sürüntüsü | Test Süresi (dk) | Test Maliyeti | Cihaz              | Dezavantaj                    |
|---------|--------|-----------------|------------------|---------------|--------------------|-------------------------------|
| RT- PCR | 10     | 240             | 55 dk            | 6.5           | 70.000             | Lab. kullanımı                |
| LAMP    | 1      | 100             | 25-45 dk         | 9             | 4.000 <sup>#</sup> | Muayenehane<br>Aile Hekimliği |

# Görsel Değerlendirme dışında cihaz ile bulanıklık/floresans okuma

**Bu sonuçlara göre  
LAMP PCR yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olarak  
bulunmuştur.**



# SONUÇ...

## Analitik

- Kolay (Deneyimli personel olmadan uygulanabilme potansiyeli )
- **Yüksek duyarlılık** (100 CFU/rxn)
- **Hızlı** (<30 dk)

## Epidemiyoloji

- **Antibiyotik Kullanım oranının azaltılması**

## Sonuç & Yorum

- Kullanım kolaylığı
- Değerlendirme kolaylığı (görsel)
- Cihaz gereksinimini ortadan kaldırma potansiyeli
- Cihaz istenirse mobil telefona yazılım geliştirilmesi
- Yaygın kullanım potansiyeli