

Portatif PCR ile Sahada Hızlı *B. anthracis* Tespiti İçin Bir Yöntem Geliştirilmesi

¹ Dr. Dr. Vet. Hekim Yarbay Zafer ATA*

¹Askeri Veteriner Okulu ve Eğitim Merkezi Komutanlığı

Gıda Kontrol ve Araştırma Merkezi Başkanlığı (GKAM)



biöksen

Laboratuvar
Analizleri İçin
Geliştirdiğimiz Sistem
Standartlarımız



Altın standart kültür yöntemine eř deđer
tanı performansı



Negatif örneklerde kültür yöntemiyle eř
deđer maliyet

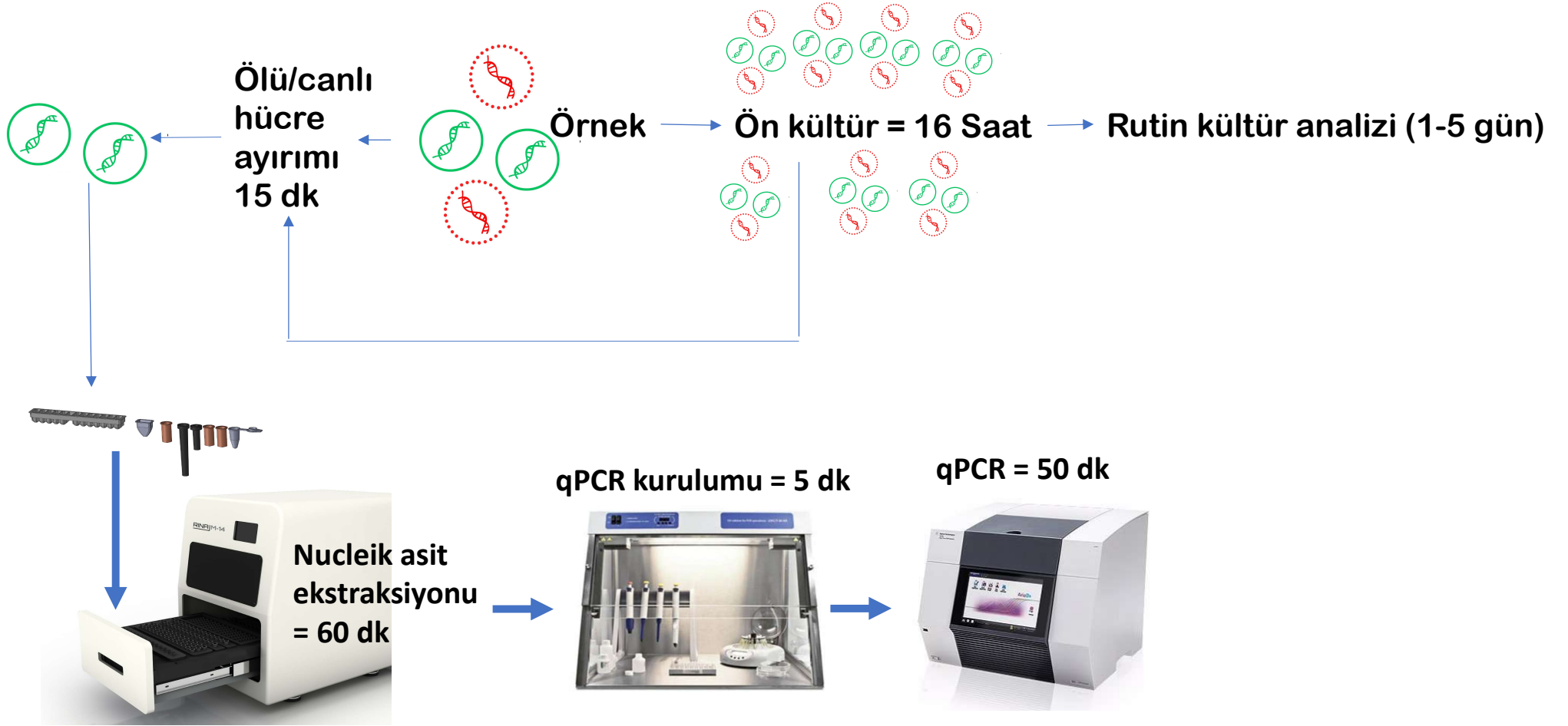


Pozitif örneklerde en az %50 düşük
maliyet



Kültürün 2-6 gün tanı sürelerinin 1 güne
indirilmesi

Rutin Real-Time PCR Temelli Analizler



Real-Time PCR Temelli Yöntemler Validasyon Verileri

Robotik / Manüel Ekstraksiyon Kolon-Manyetik Boncuk

YÜKSEK MİKTARDA GÜNLÜK ANALİZ YAPAN LABORATUVARLAR İÇİN UYGUN
DÜŞÜK SARF MALİYETİ, YÜKSEK ANALİTİK PERFORMANS, YÜKSEK ALT YAPI MALİYETİ

Etken	Örnek	NA İzolasyonu	Ölü/Canlı Ayırımı	Ön kültür	Tespit Limiti	Özgüllük / Duyarlılık	Altın Standart	Tekrarlanabilirlik	Tespit Süresi	Analiz Kapasitesi	Sahada Tespit	Lab.da Tespit	Birim Maliyet	Cihaz Maliyeti
Salmonella spp.	Gıda	Robotik / Manüel kolon- manyetik boncuk	Evet	Evet	10 ⁰ /25g	%99/%100	Kültür	100%	18 saat	94 Örnek	Hayır	Evet	28 TL	220000 TL
L.monocytogenes						%98/%100								
E.coli O157:H7						%99/%100								
Salmonella spp.				10 ² /25g	%99/%86	96%		2 saat						
L.monocytogenes					%98/%83				98%					
E.coli O157:H7					%99/%84				96%					
B.anthraxis	Tam kan / Çevre swab	Hayır	Hayır	10 ¹ /ml	%94/%91	98%								
F.tularensis					%95/%90	98%								
CCHF	Serum				10 ² /ml	%99/%100	Altona qPCR	100%	2 saat 20 dk					

Sahada Hızlı Tespit İçin Geliştirdiğimiz Portatif Sistem Standartlarımız



En az %80 duyarlılık

En az %90 özgüllük ve tekrarlanabilirlik



Ortalama sarf maliyeti



Düşük cihaz maliyeti



1 saatten kısa sürede tanı

Validasyon Yöntemimiz

Analitik Duyarlılık

- 2 farklı saha izolatu ve 2 adet referans suş
- Negatif örnekler 10^0 - 10^6 patojen/ml içecek şekilde kirletiliyor
- Bir işletimde 3 tekrar, 2 farklı işletim, 2 farklı personel, 2 farklı gün = 24 tekrar
- LOD (tespit limiti) belirleniyor

Analitik Özgüllük

- Dahil edicilik: 8 farklı saha izolatu ve referans suş
- Dışlayıcılık: Hedef olmayan en az 30 farklı etken
- Negatif örnekler 10^5 patojen/ml içecek şekilde kirletiliyor

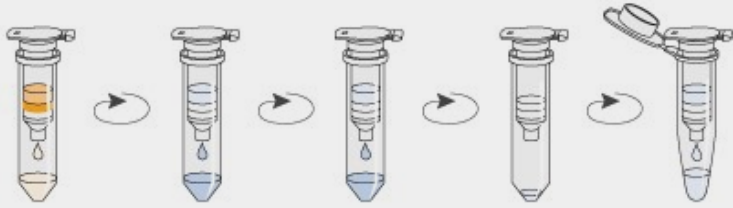
Saha performansı

- En az 300 saha örneğine altın standart yöntem ile paralel uygulanıyor

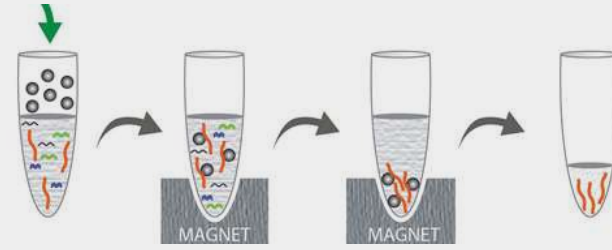
Gıda Kontrol ve Araştırma Merkezi Başkanlığı Nükleik Asit İzolasyon Sistemlerimiz

Tüm Cihaz ve Sarflar Yerli ve Milli Üretim

Manüel Spin Kolon Yöntemi – 30 dk



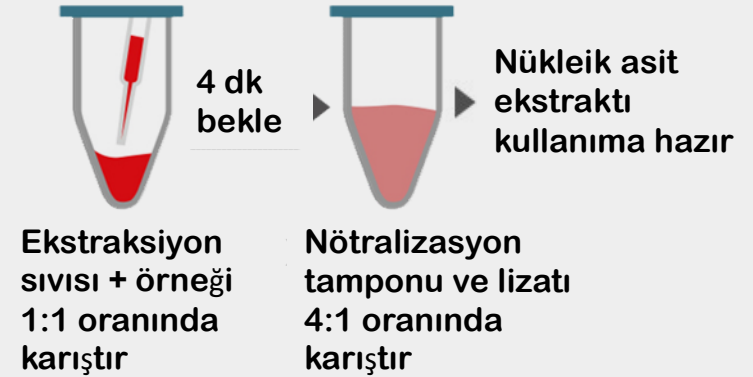
Manüel Manyetik Boncukla Ekstraksiyon – 30 dk



Robotik Manyetik Boncukla Ekstraksiyon – 60 dk



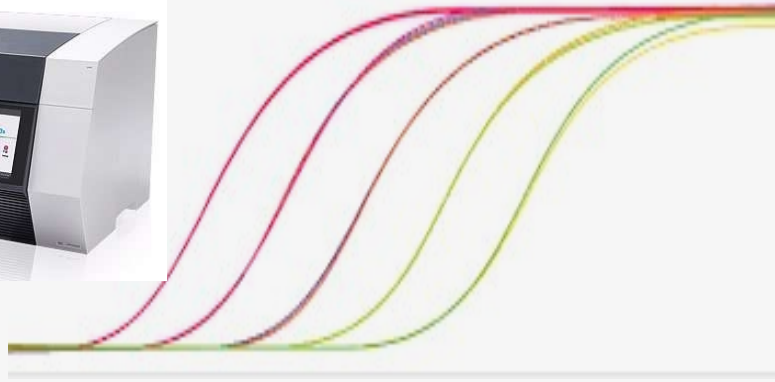
Manüel Sıvı Ekstraksiyon – 5 dk



Gıda Kontrol ve Araştırma Merkezi Başkanlığı Nükleik Asit Amplifikasyon Sistemlerimiz

Tüm sarflar yerli ve milli üretim

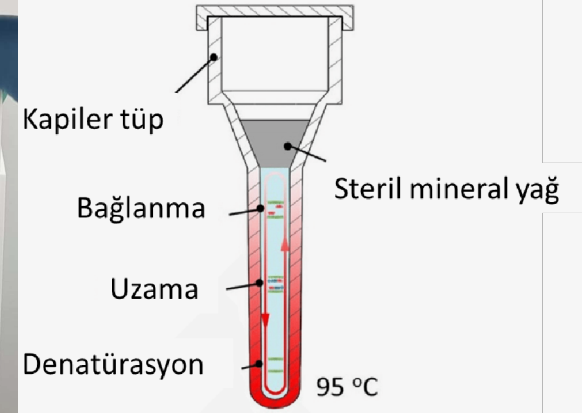
Real-Time PCR (qPCR) – 50 dk



qPCR cihazı ile
değerlendirme

Peltier sistem ile ısı
döngüsü + Floresan
tespit sistemi

Portatif Real-Time PCR (pPCR) – 30 dk



cPCR cihazı ile
değerlendirme

95 °C ısıtıcı blok + Floresan tespit sistemi

Sahada Hızlı Patojen Tespiti İçin Tercihimiz



Tek alternatif manüel sıvı ekstraksiyon



Ölü/canlı hücre ayırımı sahada hızlı tespit ile uyumlu değil



qPCR sahada uygulanabilir değil



pPCR ve LAMP sahada uygulanabilir



pPCR'in özgüllüğü LAMP'ten daha yüksek



LAMP'in duyarlılığı pPCR'dan daha yüksek



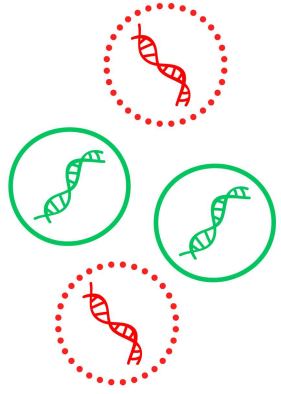
pPCR'in cihaz maliyeti LAMP'ten daha yüksek



LAMP'in sarf maliyeti pPCR'dan daha yüksek

pPCR özgüllüğü daha yüksek olduğu için tercihimiz

Sahada pPCR Temelli Analizler(B.anthraxis)



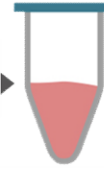
Örnek



NA ekstraksiyonu = 5 dk



4 dk
bekle



Nükleik asit
ekstraktı
kullanıma hazır

Ekstraksiyon
sıvısı + örneği
1:1 oranında
karıştır

Nötralizasyon
tamponu ve lizati
4:1 oranında
karıştır

pPCR = 2 dk



pPCR = 30 dk



pPCR Temelli Yöntem (B.anthraxis) Validasyon Verileri

Hızlı Manüel Sıvı Ekstraksiyon

İKİ FARKLI TEKNİSYEN İLE, HER İŞLETİMDE 3 TEKRAR İLE 3 FARKLI GÜNDE GERÇEKLEŞTİRİLEN TEKRARLANABİLİRLİK ÇALIŞMALARI

ÇOK DÜŞÜK SARF MALİYETİ, ORTALAMA ANALİTİK PERFORMANS, ORTALAMA ALT YAPI MALİYETİ

Etken	Örnek	NA İzolasyonu	Ölü/Canlı Ayırımı	Ön kültür	Tespit Limiti	Özgüllük / Duyarlılık	Tekrarlanabilirlik	Tespit Süresi	Analiz Kapasitesi	Sahada Tespit	Birim Maliyet	Cihaz Maliyeti	Tek Şarj İle Çalışma Sayısı
B.anthraxis	Tam kan / Çevre swab	Manüel Sıvı Ekstraksiyon	Hayır	Hayır	pPCR	%100/%100	pPCR	pPCR	pPCR	Evet	22 TL	16000 TL	30
					10 ²		%95	37dk	1 Örnek				
					qPCR	%100/%100	qPCR	qPCR	qPCR	Hayır	17 TL	150000TL	-
					10		%100	82dk	94 Örnek				

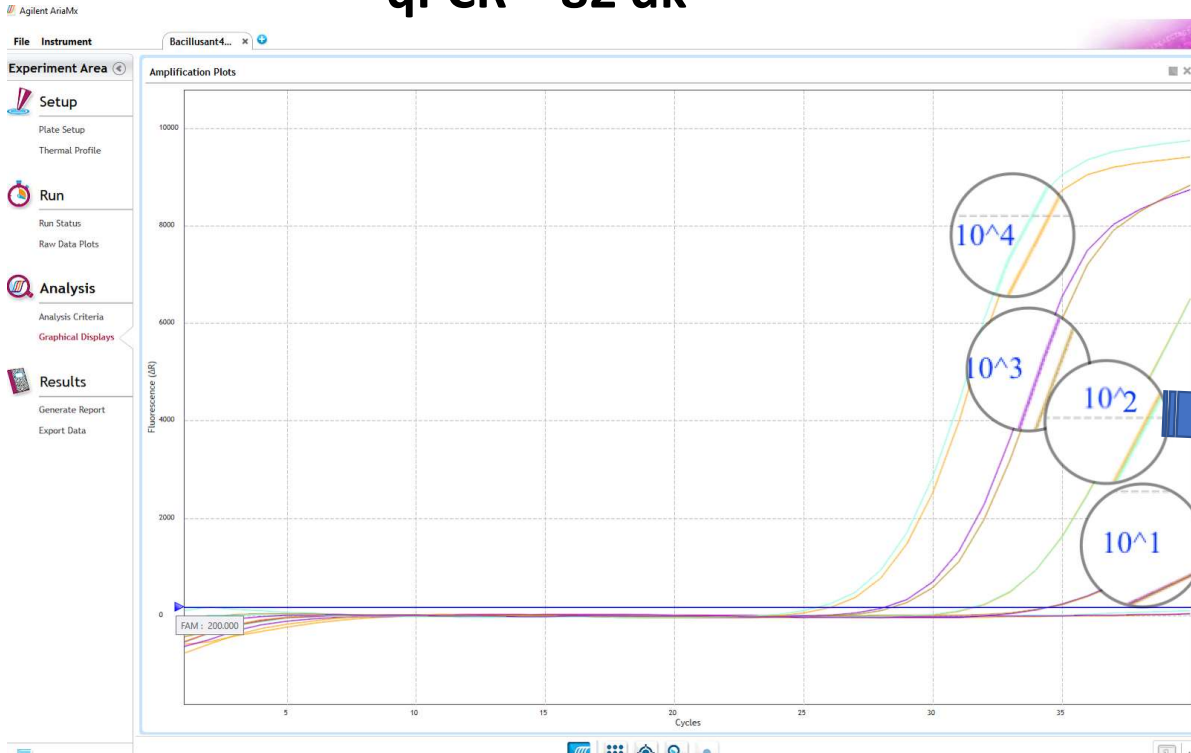
Özgüllük 10^6 /ml konsantrasyonunda çalışmalarında kullanılan bakteri türleri ve qPCR/pPCR sonuçları

Türler	Referans suş ismi	pPCR	qPCR sonuçları
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	Negatif	Negatif
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	Negatif	Negatif
<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 10792	Negatif	Negatif
<i>Bacillus thuringiensis</i>	CECT 4454	Negatif	Negatif
<i>Bacillus atrophaeus</i>	CECT 38	Negatif	Negatif
<i>Bacillus flexus</i>	CECT 62/02B	Negatif	Negatif
<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	Negatif	Negatif
<i>Bacillus mycoides</i>	CECT 4128T	Negatif	Negatif
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Negatif	Negatif
<i>Brucella abortus</i>	THSK Klinik İzolat	Negatif	Negatif
<i>Brucella melitensis</i>	THSK Klinik İzolat	Negatif	Negatif
<i>Brucella suis</i>	THSK Klinik İzolat	Negatif	Negatif
<i>Burkholderia mallei</i>	NCTC 10245-03	Negatif	Negatif
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	NCTC 10276-01	Negatif	Negatif
<i>Coxiella burnetti</i>	THSK Klinik İzolat	Negatif	Negatif
<i>Escherichia coli O157:H7</i>	THSK Klinik İzolat	Negatif	Negatif
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	THSK Klinik İzolat	Negatif	Negatif
<i>Rickettsia rickettsii</i>	THSK Klinik İzolat	Negatif	Negatif
<i>Rickettsia typhi</i>	THSK Klinik İzolat	Negatif	Negatif
<i>Salmonella Enteritidis</i>	ATCC 13076	Negatif	Negatif
<i>Salmonella Typhimurium</i>	ATCC 14028	Negatif	Negatif
<i>Shigella dysenteriae</i>	THSK Klinik İzolat	Negatif	Negatif
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 240	Negatif	Negatif
<i>Vibrio cholera</i>	THSK Klinik İzolat	Negatif	Negatif
<i>Yersinia pestis</i>	NCTC 144	Negatif	Negatif

QPCR 10^4 - 10^1 /ml pPCR 10^2 /ml konsantrasyonunda duyarlılık çalışmaları sonuçları

qPCR = 82 dk

pPCR = 37 dk



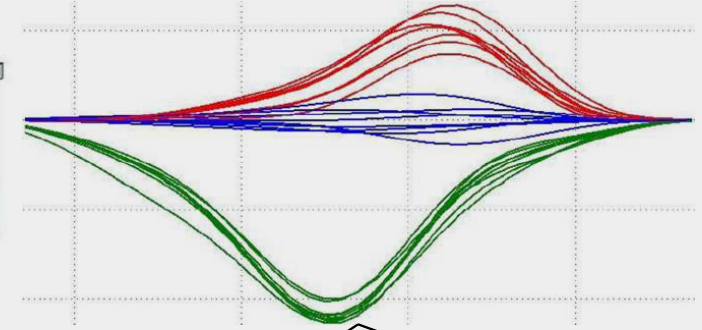
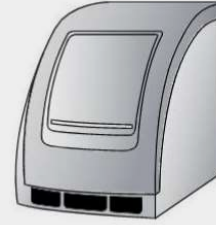
Gıda Kontrol ve Araştırma Merkezi Başkanlığı
Genotip Analiz Sistemlerimiz
Sarfların %70'i Yerli ve Milli Üretim

Nanopore Dizileme – 4 Saat



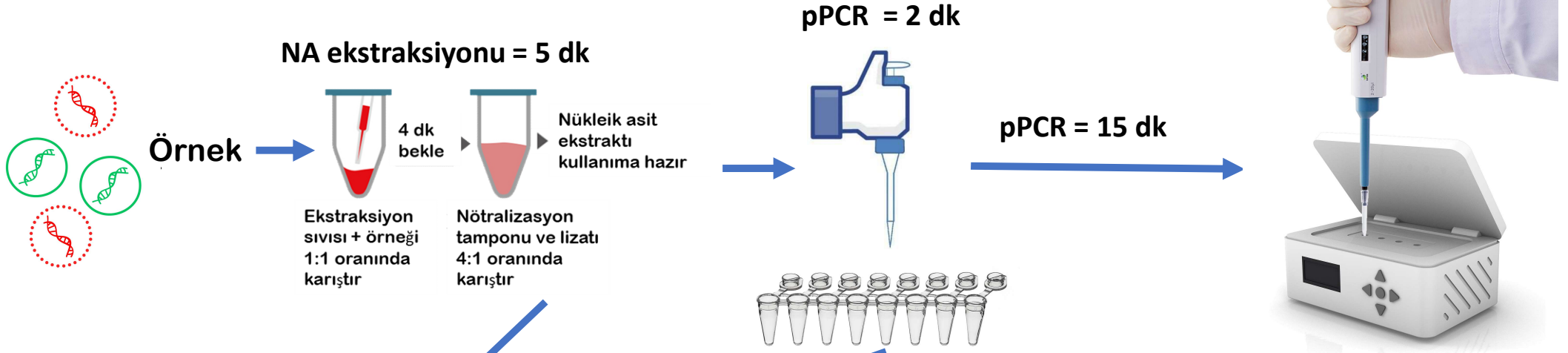
Metagenom Tüm genom MLVA - MLST

**High Resolution Melting (HRM)
1.5 Saat**

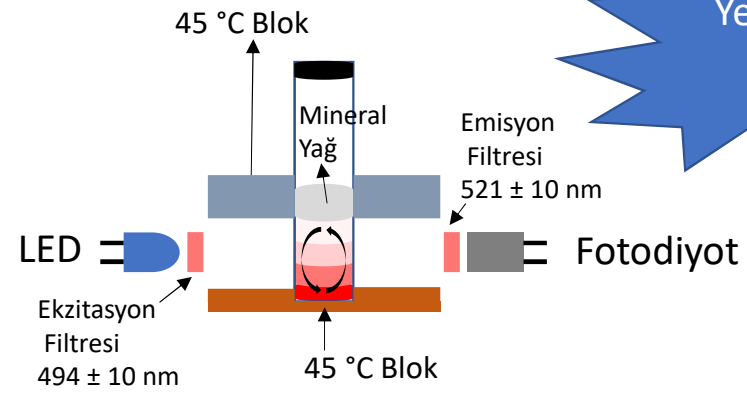


Komünite Parmak izi Analizi MLST

Sahada pPCR Temelli Analizler



Liyofilize sarf



Yerli ve milli cihaz

Geliştirmekte Olduğumuz Sahada Tespit Teknolojileri APTABIYOSENSÖRLER

