

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YÜZEY PLAZMON REZONANS BİYOSENSÖR SİSTEMLERİ
KULLANILARAK METİSİLİNE DİRENÇLİ *Staphylococcus aureus*
VE VANKOMİSİNE DİRENÇLİ ENTEROKOK BAKTERİLERİ İLE
KANSER BİYOMARKERLARININ HIZLI TESPİT EDİLMESİ**

Gülsüm UÇAK ÖZKAYA

DOKTORA TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Danışman

Doç. Dr. Muhammed Zeki DURAK

Temmuz, 2020

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YÜZEY PLAZMON REZONANS BİYOSENSÖR SİSTEMLERİ
KULLANILARAK METİSİLİNE DİRENÇLİ *Staphylococcus aureus* VE
VANKOMİSİNE DİRENÇLİ ENTEROKOK BAKTERİLERİ İLE KANSER
BİYOMARKERLARININ HIZLI TESPİT EDİLMESİ**

Gülsüm UÇAK ÖZKAYA tarafından hazırlanan tez çalışması 09.07.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Muhammed Zeki DURAK
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Muhammed Zeki DURAK, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Işın AKYAR, Üye
Acıbadem Üniversitesi

Prof. Dr. Muhammet ARICI, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üye Osman ARSLAN, Üye
İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Muhammed Zeki DURAK sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensör Sistemleri Kullanılarak Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* ve Vankomisine Dirençli Enterokok Bakterileri ile Kanseri Biyomarkerlerinin Hızlı Tespit Edilmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Gölsüm UÇAK ÖZKAYA

İmza



Bu alışma, TÜBİTAK 1003 programı kapsamında 213S133 nolu proje ve TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı ile desteklenmiştir.



Aileme

TEŞEKKÜR

Doktora serüvenimin Yıldız Teknik Üniversitesi'nde başlamasına vesile olan yüksek lisans danışmanım Prof. Dr. Ümit Geçgel'e ve daha sonra bana bölümde kendimi geliştirme imkanı veren dekanımız Prof. Dr. Osman Sağdıç ve bölüm başkanımız Prof. Dr. Muhammet Arıcı'ya ve hayata karşı daha güçlü bir insan olmamı sağlayan ve akademik gelişimimde emeği olan doktora danışmanım Doç. Dr. Muhammed Zeki Durak'a,

Doktora çalışmalarım süresince benden desteğini esirgemeyen bölümümüz araştırma görevlileri Perihan Kübra Akman, Selma Kayacan ve Fatih Bozkurt'a,

Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde gerçekleştirmiş olduğum laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımcı olan Ezgi Metin'e ve Zeynep Sueda Basar'a,

Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü idaresine ve öğretim üyelerinin her birine,

Amerika'daki çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Connecticut Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim görevlisi Prof. Dr. James Rusling'e ve bölüm laboratuvar çalışanları Mohammed Saharafeldin, Abby Jones ve Ben Ahiadu'ya,

Türkiye'de gerçekleştirmiş olduğum çalışmalarda 1003 öncelikli alanlar Ar-Ge projeleri kapsamında 213S133 nolu proje ile destek sağlayan ve Amerika'da gerçekleştirmiş olduğum çalışmada 2214-A yurt dışı doktora sırası araştırma burs programıyla destek sağlayan TÜBİTAK'a,

Bu zorlu ve uzun süreçte sabırla ve sevgiyle yanımda olan aileme çok teşekkür ederim.

Gülsüm UÇAK ÖZKAYA

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	ix
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xvi
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xix
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı.....	2
1.3 Hipotez	2
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 Biyosensör Tanımı.....	4
2.2 Biyosensör Tarihi.....	4
2.3 Biosensörün Temel Bileşenleri.....	5
2.4 Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri.....	7
2.5 Biyosensörlerin Temel Özellikleri	9
2.6 Biyosensör Çeşitleri	9
2.6.1 Elektrokimyasal Biyosensörler.....	11
2.6.2 Kütle Tabanlı Biyosensörler.....	11
2.6.3 Optik Biyosensörler	12
2.7 Biyosensörlerin Avantaj ve Dezavantajları	12
2.8 Biyosensörlerin Uygulama Alanları	13
2.9 Biyosensör ve Patojen Bakteriler	14
2.10 Biyosensör ve Kanser	15
2.11 SPR ve Gıdalarda Kullanım Alanları	18
3 DİRENÇLİ <i>S. aureus</i> ve <i>Enterococcus</i> spp.	23
3.1 Giriş.....	23

3.2	Literatür Özeti	25
3.2.1	Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>	25
3.2.2	Vankomisine Dirençli Enterokoklar	41
4	KANSER BİYOMARKERLARI	45
4.1	Giriş.....	45
4.2	Literatür Özeti	49
4.2.1	Kanser Prevelansı.....	49
4.2.2	Kanser Biyomarkerları	51
4.2.3	Kanser Biyomarkerlarının Tespiti.....	55
5	MATERYAL VE YÖNTEM	57
5.1	Materyal.....	57
5.1.1	Mikroorganizmalar	57
5.1.2	Antimikrobiyal Duyarlılık Testi için Kimyasallar	57
5.1.3	Bakteri Tespiti için Kimyasallar	58
5.1.4	Kanser Biyomarkerlarının Tespiti için Reaktifler	58
5.2	Yöntemler	59
5.2.1	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonun Belirlenmesi.....	59
5.2.2	Türbidimetrik Ölçüm	59
5.2.3	Dirençten Sorumlu Genlerin PCR Yöntemiyle Araştırılması	60
5.2.4	Koagülaz Testi	62
5.2.5	Yüzey Plazmon Resonans (SPR) Cihazı.....	62
5.2.6	Sensör Sistemi için Bakteri Kültürünün Hazırlanması.....	64
5.2.7	Altın Yüzeyinin Modifikasyonu ve Antimikrobiyal Prosedür	64
5.2.8	Bakteri Tespiti için Çipin Hazırlanması ve SPR Prosedürü	67
5.2.9	Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile Yüzey Görüntüleme.....	68
5.2.13	SPRi Sistemi için Çip Hazırlık Prosedürü	69
5.2.14	MP-Ab ₂ Biyokonjugatlarının Sentez Prosedürü	72
5.2.15	MP-Ab ₂ Biyokonjugatlarında Ag'nin Çevrimdışı Yakalama Prosedürü.	73
5.2.16	Çoklu Tespit için MP-Ab ₂ Kompleksinde Ab ₂ Optimizasyonu	73
5.2.17	Analizin Uygulanması.....	73
5.2.18	Tekrar Kullanma Metodunun Tespiti	74
5.2.19	3D Baskılı Kanal Parçasının Tasarımı.....	75
5.2.20	Micro Bicinchoninic Asit (μBCA) ² Protein Deneyi.....	75

6 ARAŞTIRMA BULGULARI	77
6.1 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Sonuçları.....	77
6.2 Türbidimetrik Ölçüm Sonuçları	78
6.3 Direnç Genlerinin PCR Yöntemiyle Doğrulanması.....	81
6.4 Koagülaz Test Sonuçları.....	83
6.5 Bakteriler için Antimikrobiyal Duyarlılık Test Sonuçları	85
6.5.1 Tekli Mikroakışkan Kanal ile MRSA ve MSSA'nın Antimikrobiyal Duyarlılığının Belirlenmesi	85
6.5.2 Tekli Mikroakışkan Kanal ile VRE ve VSE'nin Antimikrobiyal Duyarlılığının Belirlenmesi	86
6.5.3 Üçlü Mikroakışkan Kanal ile MRSA, MSSA VRE ve VSE'nin Antimikrobiyal Duyarlılığının Belirlenmesi.....	88
6.5.4 Taramalı Elektron Mikroskop Görüntüleme	91
6.6 MRSA için Kantitatif Analiz Sonuçları	92
6.6.1 Antikorların İmmobilizasyonu.....	92
6.6.2 Tek Kanal ile Bakteri Tespiti	94
6.6.3 Çok Kanallı Sistem ile Bakterilerin Tespiti.....	96
6.7 Kanser Biyomarker Tespit Sonuçları.....	100
6.7.1 Rejenerasyon Metodunun Belirlenmesi	101
6.7.2 SPRi Çipleri için Antikor Konsantrasyonunun Optimizasyonu	102
6.7.3 Çipler Yeniden Kullanım Yöntemlerinin Sonuçları	106
6.7.4 3D Baskılı Kanal Parçasının Tasarımı.....	107
6.7.5 PSA'nın Optimizasyonu ve Kalibrasyonu için Sonuçlar	107
6.7.6 Çevrimiçi Tespit Metodolojisi.....	112
6.7.7 Antikorum Antijene Bağlanma Kinetiği	113
6.7.8 MP-Ab ₂ Konjugatı Kullanılarak CD14, IGF-I ve VEGF-D'nin Çoklu Tespiti.....	115
6.7.9 Micro Bicinchoninic Asit (µBCA) ² Protein Deneyi Sonuçları.....	119
7 SONUÇ VE ÖNERİLER	122
KAYNAKÇA	124
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	152

SİMGE LİSTESİ

pH	Asitlik veya bazlık derecesini gösteren ölçü birimi
bp	Base pair
dk	Dakika
°	Derece
fg	Femtogram
kD	Kilodalton
kV	Kilovolt
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
M	Molar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
pg	Pikogram
rpm	Rotation per minute
°C	Santigrat Derece
V	Volt

KISALTMA LİSTESİ

11-MUA	11- Mercaptoundecanoic acid
Ab ₁	Primer Antikor
Ab ₂	Sekonder Antikor
AFP	α -fetoprotein
Ag	Antijen
ATCC	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
BD	Becton Dickinson
BHI	Brain Heart Infusion
BSA	Bovine Serum Albumin
CA-MRSA	Community-associated methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
CD14	Monosit Yüzey Antijeni
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri
CEA	Karsino-Embriyonik Antijen
CFU	Colony Forming Units
CRP	C-Reaktif Protein
DI su	Steril Ultra Damıtılmış Su
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide Hydrochloride
EDTA	Etilendiamintetraasetat
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
GOX	Glikoz Oksidaz
HA-MRSA	Healthcare-acquired methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
IDSA	Amerika Bulaşıcı Hastalıklar Derneği
IGF-I	İnsülin Benzeri Büyüme Fakörü-I
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
KOB	Koloni Oluşturan Birim
LAMP	Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon
LA-MRSA	Livestock-associated methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
LED	Işık Yayan Diot
LOD	Tespit Limiti
mAb	Monoklonal Antikor
mCD14	Membrana Bağlı CD14
MCDA	Çoklu Çapraz Yer Değiştirme
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
miRNA	Mikro Ribonükleik Asit
MP	Süperparamanyetik Partiküller
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MRSA	Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Metisiline Duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimide
OSCC	Oral Skuamöz Hücreli Karsinom
pAb	Poliklonal Antikor
PBP2a	Penisilin Bağlayıcı Protein 2a

PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
PBS-T	Fosfat Tamponlu Tuz-Tween20
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PSA	Prostat Spesifik Antijeni
PVL	Panton-Valentine Lökositidin
QCM	Kuvars Kristali Mikro Terazisi
RUSD	Ultra Duyarlı Detektör
SAB	<i>S. aureus</i> Bakteriyemisi
SAM	Kendiliğinden Biriken Moleküller
sCD14	Çözünür Form CD14
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SPPs	Yüzey Plazmonu Polaritonları
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans
SPRi	Yüzey Plazmon Rezonans Görüntüleme
ssDNA	Tek Sarmallı Desoksiribonükleik Asit
UV	Ultraviyole
VEGF-D	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü-D
Vm	Vankomisin
VPF	Vasküler Geçirgenlik Faktörü
VRE	Vankomisine Dirençli <i>Enterococcus</i>
VSE	Vankomisine Duyarlı <i>Enterococcus</i>
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Biyosensörlerin sınıflandırılması	10
Şekil 4.1	SPR sisteminin avantajları	47
Şekil 4.2	Erkeklerde dünya genelinde kanser türüne göre mortalite oranları	49
Şekil 4.3	Kadınlarda dünya genelinde kanser türüne göre mortalite oranları	50
Şekil 4.4	Kadınlarda Türkiye genelinde 2018 yılında kanser türünün vaka sayısına göre dağılımı.....	50
Şekil 4.5	Erkeklerde Türkiye genelinde 2018 yılında kanser türünün vaka sayısına göre dağılımı.....	51
Şekil 5.1	Koagülaz testinde meydana gelen muhtemel sonuçlar (3 ve 4 pozitif)	62
Şekil 5.2	Analizler için kullanılan SPR sistemi.....	63
Şekil 5.3	SPR sisteminde kullanılan çipin, prizmanın ve bunların kanala takıldıktan sonraki görüntüsü.....	63
Şekil 5.4	SPR cihazı tek kanallı ve çok kanallı sistemlere ait görüntü.....	64
Şekil 5.5	Sistemin sıcaklık göstergesi.....	64
Şekil 5.6	SPR sisteminin şematik görüntüsü. (a) Çoklu mikroakışkan kanal entegre edilmiş SPR platformunun gösterimi. (b) Mikroakışkan bir hücre odasının üst ve alt görünümü. (c) Bakterilerin antimikrobiyal testi için protokol.....	66
Şekil 5.7	(a) Tek kanallı altın yüzeyin görüntüleri; (b) üçlü hücre odası ile altın yüzeyin görüntüleri; (c) DI suyunun tek kanal üzerindeki rezonans açısı; (d) DI suyunun üçlü kanal üzerindeki rezonans açısı.....	66
Şekil 5.8	Tüm malzemelerle donatılmış SPRi cihazının resmi.....	68
Şekil 5.9	SPRi deneyinde kullanılan çipler: (A) 16 altın spot SPRi dizisi; (B) 25 altın spot SPRi dizisi	69
Şekil 5.10	Çipi sisteme monte etmek için SPRi sisteminin bileşenleri	70
Şekil 5.11	(A) V ++ yazılımının arayüz görünümü; (B) Kayıt verilerinin bir Excel sayfasında gerçek zamanlı olarak görüntülenmesi.....	71
Şekil 5.12	Analiz öncesi SPR çip yüzey görüntüleri: (A) O-ring kullanılan 16 altın spot içeren çipin yüzey görüntüsü, (B) bir serpantin kanal parçası kullanılan 25 altın spot içeren çipin yüzey görüntüsü	72
Şekil 5.13	Manyetik partikül-antikör kompleksi hazırlamak için kullanılan Invitrogen DynaMag™-Spin Magnet ve Dynabeads™ MX mikserinin görüntüsü	72
Şekil 5.14	Formlabs Form 2 SLA 3D Yazıcısının görünümü	75
Şekil 6.1	Metisiline dirençli <i>S. aureus</i> sayımı için standart kalibrasyon kurvesi	80
Şekil 6.2	Metisiline duyarlı <i>S. aureus</i> sayımı için standart kalibrasyon kurvesi..	80
Şekil 6.3	Vankomisine dirençli <i>Enterococcus</i> sayımı için standart kalibrasyon kurvesi	81
Şekil 6.4	Vankomisine duyarlı <i>Enterococcus</i> sayımı için standart kalibrasyon kurvesi	81
Şekil 6.5	MRSA ve MSSA izolatların <i>mecA</i> gen varlığı jel görüntüsü. Bant 1: 100 bp ladder. Bant 2-11: MRSA1-MRSA10 izolatları. Bant 12-21: MSSA1-MSSA10 izolatları. Bant 22: Kontrol	82
Şekil 6.6	VRE ve VSE izolatların <i>vanA</i> ve <i>vanC</i> gen varlığı jel görüntüsü. Bant 1: 100 bp ladder. Bant 2-6: VRE1-VRE5 izolatlarının <i>vanA</i> gen bant	

	görüntüsü. Bant 7: <i>vanA</i> geni negatif kontrol. Bant 8-12: VRE1-VRE5 izolatlarının <i>vanC</i> gen bant görüntüsü. Bant 13-17: VSE1-VSE5 izolatlarının <i>vanC</i> gen bant görüntüsü. Bant 18: <i>vanC</i> geni negatif kontrol. Bant 19: 100 bp ladder	82
Şekil 6.7	Bazı MRSA suşlarının koagülaz test sonuçlarının görüntüleri	84
Şekil 6.8	Bazı MSSA suşlarının koagülaz test sonuçlarının görüntüleri	85
Şekil 6.9	Metisiline dirençli <i>S. aureus</i> (MRSA 2 suşu)'un zamana bağlı SPR açığı kayması: (a) Metisiline dirençli <i>S. aureus</i> 'un sefoksitin antibiyotiğine karşı 60 dk boyunca izlenen SPR açığı kaymasının kinetik grafiği; (b) dirençli bakteri ilavesinin SPR yanıtı	86
Şekil 6.10	Metisiline duyarlı <i>S. aureus</i> (MSSA 7 suşu)'un zamana bağlı SPR açığı kayması: (a) 60 dk boyunca metisiline duyarlı <i>S. aureus</i> 'un sefoksitin antibiyotiğine karşı SPR açığı kaymasının kinetik grafiği; (b) duyarlı bakteri ilavesinin SPR yanıtı	86
Şekil 6.11	Vankomisine dirençli <i>Enterococcus</i> (VRE 5 suşu) zamana bağlı SPR açığı kayması: (a) Vankomisine dirençli <i>Enterococcus</i> , vankomisin antibiyotiğine karşı 200 dk boyunca SPR açığı kaymasının kinetik grafiği; (b) dirençli bakteri ilavesinin SPR yanıtı	87
Şekil 6.12	Vankomisine duyarlı <i>Enterococcus</i> (VSE 8 suşu) zamana bağlı SPR açığı kayması: (a) Vankomisine duyarlı <i>Enterococcus</i> 200 dakika boyunca vankomisin antibiyotiğine karşı SPR açığı kaymasının kinetik grafiği; (b) duyarlı bakteri ilavesinin SPR yanıtı	87
Şekil 6.13	(a) Çok kanallı sistemde sefoksitin enjeksiyonuna karşı antibiyotiğe dirençli ve duyarlı <i>S. aureus</i> için gerçek zamanlı SPR kinetik eğrisi. (b) Kontrol örneği, <i>E. coli</i> . (c) Metisiline duyarlı <i>S. aureus</i> (MSSA7 suşu). (d) Metisiline dirençli <i>S. aureus</i> (MRSA2 suşu)	89
Şekil 6.14	(a) Çok kanallı sistemde vankomisin enjeksiyonuna karşı antibiyotiğe dirençli ve duyarlı enterokoklar için gerçek zamanlı SPR kinetik eğrisi. (b) Kontrol örneği, <i>E. coli</i> . (c) Vankomisine duyarlı <i>Enterococcus</i> (VSE 8 suşu). (d) Vankomisine dirençli <i>Enterococcus</i> (VRE 2 suşu)	90
Şekil 6.15	Antibiyotik enjeksiyonu yapılmayan bakterilerin SEM mikroagrafları. (a) 4.59 KX büyütmede metisiline dirençli <i>S. aureus</i> ; (b) 4.59 KX büyütmede metisiline duyarlı <i>S. aureus</i> ; (c) 5 KX büyütmede vankomisine dirençli <i>Enterococcus</i> ; (d) 5 KX büyütmede vankomisine duyarlı <i>Enterococcus</i>	92
Şekil 6.16	Antibiyotik uygulanan bakterilerin SEM mikroagrafları. (a) 2 KX büyütmede metisiline dirençli <i>S. aureus</i> ; (b) 2 KX büyütmede metisiline duyarlı <i>S. aureus</i> ; (c) 5 KX büyütmede vankomisine dirençli <i>Enterococcus</i> ; (d) 5 KX büyütmede vankomisine duyarlı <i>Enterococcus</i>	93
Şekil 6.17	Yüzeyin işlevselleşmesine bağlı sistemde meydana gelen SPR yanıtını gösteren sensogram	93
Şekil 6.18	İşlevselleştirilmiş yüzeyde bakterinin bağlanmasını gösteren sensogram	94
Şekil 6.19	Protein G tabanlı immobilizasyon ile altın yüzeyine bağlanan MRSA'ların SEM görüntüsü	95
Şekil 6.20	Çeşitli konsantrasyonlarda MRSA'nın altın yüzeye bağlanması sonucunda RU'da meydana gelen değişimin eğrisi	95

Şekil 6.21	Üç kanallı SPR sisteminin yazılım görüntüsü; Kanal 1: Kırmızı; Kanal 2: Yeşil; Kanal 3: Mavi renkli sinyal	97
Şekil 6.22	Üç kanallı SPR sisteminde antikor yakalanması ve bakteri bağlanması deneyi; MRSA1: Pozitif Kontrol, PBS: Referans Kanal, MSSA: Negatif Kontrol	97
Şekil 6.23	Anti-MRSA antikorunun MRSA bakterisine özgüllüğü	99
Şekil 6.24	Farklı PSA konsantrasyonunun SPR sensör yüzeyi üzerinde kovalent olarak hareketsizleştirilmiş Ab ₁ 'e (100 µg/mL) MP-Ab ₂ ile bağlanması	102
Şekil 6.25	SPR sensör yüzeyi üzerinde farklı PSA konsantrasyonunun MP-Ab ₂ ile kovalent olarak hareketsizleştirilmiş Ab ₁ 'e (250 µg/mL) bağlanması	103
Şekil 6.26	Farklı PSA konsantrasyonunun SPR sensör yüzeyi üzerinde kovalent olarak hareketsizleştirilmiş Ab ₁ 'e (500 µg/mL) MP-Ab ₂ ile bağlanması	103
Şekil 6.27	SPR sensör yüzeyi üzerinde farklı PSA konsantrasyonunun MP-Ab ₂ ile kovalent olarak hareketsizleştirilmiş Ab ₁ 'e (1000 µg/mL) bağlanması	104
Şekil 6.28	Yakalama antikoru 100 µg/mL için kalibrasyon eğrisi	105
Şekil 6.29	Yakalama antikoru 250 ve 500 µg/mL için kalibrasyon eğrisi	105
Şekil 6.30	Yakalama antikoru 1000 µg/mL için kalibrasyon eğrisi	106
Şekil 6.31	(A) Autodesk'ten elde edilen 16 spot çipi için kullanılacak olan kanalın görünümü; (B) Preform'dan elde edilen 16 spot çipi için kullanılacak olan kanalın görünümü	107
Şekil 6.32	SPRi sensör yüzeyi üzerinde kovalent olarak immobilize edilmiş Ab ₁ 'e farklı PSA konsantrasyonunun MP-Ab ₂ ile bağlanması	108
Şekil 6.33	Değişen PSA konsantrasyonlarının kalibrasyon grafiği	108
Şekil 6.34	PBS-T'de seyreltilmiş farklı PSA konsantrasyonu için yeniden renklendirilmiş SPR farkı görüntüsü	109
Şekil 6.35	Düşük PSA konsantrasyonları için kalibrasyon eğrisi	110
Şekil 6.36	PBS-T içinde antikor kaplı manyetik partiküller üzerine önceden yakalanmış 0, 10 fg/mL, 1, 2,5, 5 ve 25 pg/mL PSA için SPR farkı görüntüsü	110
Şekil 6.37	Yakalama antikoru immobilizasyon işleminin sensogramı: (A) Çevrimiçi tespit işlemin görüntülenmesi; (B) çevrimiçi bloklama adımlarının görüntülenmesi	112
Şekil 6.38	CD14, IGF-I ve VEGF-D konsantrasyon serileri için SPRi birleşme veri yanıtı (CD14 için 0,1, 2, 5, 10, 100 pg/mL, IGF-I için 0, 1,1, 2,2, 5,5, 11, 110 pg/mL ve VEGF-D için 0, 0,5, 1, 2, 5, 100 pg/mL)	115
Şekil 6.39	Antijeni (100 pg/mL) algılama sırasında yakalama antikoru (kırmızı) ve bir BSA spotu (siyah) üzerine kaydedilen gerçek zamanlı SPRi yanıt eğrisi	116
Şekil 6.40	Antijenin artan konsantrasyonuna bağlı olarak çoklu algılama için fark görüntüleri (yukarıdan aşağıya)	117
Şekil 6.41	Yakalama antikor spotları üzerindeki CD14, IGF-I ve VEGF-D biyomarkerları için kalibrasyon eğrisi	118
Şekil 6.42	µBCA protein deneyi için farklı MP-Ab ₂ ve MP konsantrasyonlarının absorbanans yanıtı	120

Şekil 6.43 µBCA protein testi için saf anti-CD14, anti-PSA, anti-VEGF-D ve anti-IGF-I Abz'nin kalibrasyon eğrisi..... 121



TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanan kanser biyomarker listesi.....	52
Tablo 4.2	Çalışmada kullanılan biyomarkerların serumdaki miktarları	56
Table 6.1	MRSA ve MSSA suşlarının minimum inhibisyon konsantrasyonları değerleri.....	78
Table 6.2	VRE ve VSE suşlarının minimum inhibisyon konsantrasyonları değerleri	79
Tablo 6.3	Metisiline dirençli ve duyarlı <i>S. aureus</i> suşlarının biyokimyasal özelliği	84
Tablo 6.4	Antikorları yakalamak için antijen bağlanma parametreleri	114

Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensör Sistemleri Kullanılarak Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* ve Vankomisine Dirençli Enterokok Bakterileri ile Kanser Biyomarkerlarının Hızlı Tespit Edilmesi

Gülsüm UÇAK ÖZKAYA

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Muhammed Zeki DURAK

Bu çalışmada, yüzey plazmon rezonans yöntemi (SPR) kullanılarak çoklu kanallar yardımıyla metisiline dirençli ve duyarlı *Staphylococcus aureus* (MRSA ve MSSA) ve vankomisine dirençli ve duyarlı *Enterococcus* (VRE ve VSE) ve kanser biyomarkerlarının tespiti araştırılmıştır. *S. aureus* suşlarının sefoksitin ve *Enterococcus* suşlarının vankomisine karşı ilaç direncinin belirlenmesinde tek ve çoklu kanallarla donatılmış SPR sistemi kullanılmıştır. MRSA ve MSSA'nın MİK değerleri sırasıyla 32->128 µg/mL ve 1-4 µg/mL arasında değişmiştir. VRE ve VSE'nin MİK değerleri sırasıyla 64->128 µg/mL ve 2-4 µg/mL aralığında tespit edilmiştir. Çok kanallı sistemde MRSA, MSSA, VRE ve VSE'nin aç kaymaları sırasıyla -0,030° ve -0,260°, -0,010° ve -0,090° olarak bulunmuştur.

MRSA suşlarının, spesifik monoklonal antikor ile etkileşimini incelemek için protein G tabanlı sensör yüzey saptama sistemi geliştirilmiştir. Geliştirilen sistem ile 4-7 log KOB/mL konsantrasyonda MRSA saptanabilmiştir. Çapraz reaktivite için kullanılan *E. coli* ATCC 25922, SPR açısından önemli bir değişim meydana getirmemiştir. Çok

kanallı sistemde pozitif kontrol olarak MRSA (~6 log KOB/mL) ve negatif kontrol olarak *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213 (~6 log KOB/mL) sisteme gönderilmiştir. Referans kanalda ise PBS kullanılmıştır. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213 SPR açısında bir değişim meydana getirmezen, MRSA 0,150°'lik bir aç kayması meydana getirmiştir.

Prostat spesifik antijeni (PSA), insülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF-D) ve monosit yüzey antijeni (CD14) biyomarkerlarının çoklu ve hassas tespiti için SPR imager kullanılmıştır. PSA, CD14, IGF-I ve VEGF-D'nin dinamik aralıkları sırasıyla 10 fg/mL-100 pg/mL, 1-100 pg/mL, 1,1-110 pg/mL ve 0,5-100 pg/mL arasında bulunmuştur. Çoklu tespit için tespit limiti (LOD) 0,625 pg/mL olarak bulunmuştur. Çoklu algılama için sistemin dinamik aralığı 0,625 ve 125 pg/mL arasında tespit edilmiştir. Sonuç olarak SPR sistemi ile patojen bakterilerin ve kanser biyomarkerlarının çoklu akışkan kanallar kullanılarak tespit edilebileceğı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: SPR, dirençli bakteri, antimikrobiyal duyarlılık, kanser biyomarkerı, çoklu tespit

Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Vancomycin-Resistant Enterococci Bacteria, and Cancer Biomarkers by Using Surface Plasmon Resonance Systems

Gülsüm UÇAK ÖZKAYA

Department of Food Engineering

Doctor of Philosophy Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Muhammed Zeki DURAK

In this study, it was investigated the determination of pathogen bacteria and cancer biomarkers using surface plasmon resonance (SPR) equipped with multiple microfluidic channels. Drug resistance of *S. aureus* strains against cefoxitin and *Enterococcus* strains against vancomycin were investigated with the SPR system. The MIC values of MRSA and MSSA ranged from 32 µg/mL to >128 µg/mL and from 1 µg/mL to 4 µg/mL, respectively. The MIC values of VRE and VSE were between 64 to >128 µg/mL and 2-4 µg/mL, respectively. The angle shifts of MRSA, MSSA, VRE, and VSE were found to be -0.030° and -0.260°, -0.010°, and -0.090°, respectively.

A protein G-based sensor surface detection system was developed to investigate the interaction of MRSA strains with a specific monoclonal antibody. The developed system allowed MRSA to be detected at a concentration of 4-7 log CFU/mL. *E. coli* ATCC 25922 used for cross-reactivity did not cause a significant change in the SPR angle. MRSA (~6 log CFU/mL), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213 (~6 log CFU/mL) and PBS were injected into the system as a positive, negative, and

reference control, respectively. While *S. aureus* ATCC 29213 did not cause any change in the SPR angle, MRSA produced a 0.150° angle shift.

The SPR imager was used for multiple and sensitive detections of prostate-specific antigen (PSA), insulin-like growth factor I (IGF-I), vascular endothelial growth factor (VEGF-D), and monocyte surface antigen (CD14). The dynamic ranges of PSA, CD14, IGF-I and VEGF-D were between 10 fg/mL-100 pg/mL, 1-100 pg/mL, 1.1-110 pg/mL and 0.5-100 pg/mL, respectively. The detection limit (LOD) for multiple detections was 0.625 pg/mL. The dynamic range of the system for multiple sensing was between 0.625 and 125 pg/mL. It was determined that pathogen bacteria and cancer biomarkers can be detected by using multiple microfluidic channels with the SPR system.

Keywords: SPR, resistant bacteria, antimicrobial susceptibility, cancer biomarker, multiple detection

1.1 Literatür Özeti

Vücuttaki patojenik ve fizyolojik olarak ilgili molekülleri yüksek hassasiyet ve özgüllükle algılama yeteneği, hastalıkların erken teşhisi ve tedavisinde güçlü bir fırsat sunmaktadır. Erken teşhis ve tanı teknikleri, birçok hastalığın ileri evreleri ile ilişkili hasta bakım maliyetini büyük ölçüde azaltmak için kullanılabilir. Bununla birlikte, yaygın klinik kullanımlarına rağmen, bu tekniklerin bir dizi potansiyel sınırlaması vardır. Örneğin, bir takım teşhis cihazlarının yanıt süreleri yavaştır ve hastalar için külfetlidir. Ayrıca, bazı analizler pahalıdır ve sağlık sektörüne her yıl milyarlarca dolara mal olmaktadır. Bu nedenle, daha verimli ve güvenilir algılama teknolojilerini geliştirmeye ihtiyaç vardır [1, 2].

Patojenin ve kanser türünün saptanması, tanı sürecinin en önemli kısımlarından biridir. Patojenlerde suş varyasyonu ve ilaç direnci daha yaygın hale geldiğinden, enfeksiyonun önlenmesi ve kontrolü son yıllarda ciddi bir sorun olmuştur. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC), Amerika Bulaşıcı Hastalıklar Derneği (IDSA) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) gibi dünya çapında önde gelen birçok sağlık kuruluşu, antibiyotik direncinin küresel bir halk tehdidi olduğunu iddia etmişlerdir. Bazı çalışmalar, antibiyotik dirençli hastane kaynaklı enfeksiyonların (HAI) yılda 99.000 ölümden sorumlu olduğu ABD’de antibiyotik tedavilerinin yaklaşık %30-50’sinin uygun olmadığını ortaya koymaktadır [3].

Kanser, dünya çapında endişe duyulan karmaşık bir hastalıktır. Günümüzde kanser, 2018’de 18.1 milyon yeni vaka ve 9.6 milyon ölümle dünya çapında ikinci önde gelen ölüm nedeni olmaya devam etmektedir. Anormal hücre bölünmesi, genetik mutasyonların birikmesi ve apoptoza direnç, kanser gelişiminin ayırt edici özellikleridir. Kanser hücreleri, normal sağlıklı hücreler tarafından ifade edilmeyen veya çok küçük miktarlarda ifade edilen spesifik proteinleri eksprese etme yeteneğine sahiptir. Bu proteinler (biyomarkerlar) kanser tespiti ve tedavisinde

kullanılmaktadırlar. Kanserin teşhis edilmeden önce vücutta metastaz yapabildiği ve hayatta kalma oranlarının düşmesine neden olduğu düşünüldüğünde, araştırmalar erken teşhis ve tanı yöntemlerinin keşfi ve uygulanmasına kaymıştır. Bu nedenle, doğru, duyarlı ve non-invaziv erken tanı ve kişiselleştirilmiş tedavi, kanser hastalarının hayatta kalma oranını ve yaşam kalitesini iyileştirmenin anahtarlarıdır [4].

Hızlı tepki, yüksek hassasiyet, kullanım kolaylığı ve düşük maliyet gibi bir dizi avantaja sahip olan biyosensörler çok fazla dikkat çekmiştir ve derinlemesine incelenmiştir. Ayrıca, biyosensörler küçük boyut, gerçek zamanlı ve çoklu analiz özelliklerine dayanmasından dolayı, hızla gelişmiştir ve yaygın olarak kullanılmıştır. Ek olarak, klinik teşhisin gerektirdiği daha yüksek doğruluğu karşılamak için mikrobiyolojik tespit için uygulanması beklenmektedir.

1.2 Tezin Amacı

Bu tezin amacı SPR sistemi kullanılarak farklı analitlerin çoklu tespiti için analizlerinin gerçekleşmesini sağlamaktır. Bu tezde üç farklı çalışma gerçekleştirilmiştir. Tezin ilk çalışmasındaki amaç antibiyotiğe dirençli suşların antimikrobiyal duyarlılık testinin SPR aracılığıyla çoklu olarak gerçekleştirilmesidir. Bu şekilde duyarlı ve dirençli suşlar sisteme gönderilen antibiyotik akışına verdikleri SPR açısı değişimleri ile belirlenebilecektir. Tezin ikinci çalışmasındaki amaç ise MRSA izolatlarının spesifik antikor kullanılarak kantitatif olarak tespitini gerçekleştirmektir. Birinci çalışmada kullanılan cihaz ve çoklu kanal ikinci kısımda da kullanılmıştır. Tezin üçüncü çalışması Amerika'da bulunan Connecticut Üniversitesi Kimya Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir. Bu bölümdeki amaç farklı bir SPR cihazı kullanarak kanser biyomarkerlerinin çoklu tespitini kantitatif olarak gerçekleştirmektir. Bu amaçla kullanılan SPR görüntüleme cihazı ile eş zamanlı elde edilen görüntüler ile kalitatif olarak yüzeyde meydana gelen bağlanmalar da takip edilebilmiştir.

1.3 Hipotez

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde patojen mikroorganizmaların ve kanser biyomarkerların tespiti için çeşitli biyosensör sistemlerinin geliştirildiği

görülmektedir. Etiketlemeye gerek duymadan gerçek zamanlı ölçümler yapabilen SPR ve SPRi sistemleri ile çoklu testlerin gerçekleştirebileceği düşünülmüştür. Bu amaçla öncelikle gerçek zamanlı SPR sistemi için tasarlanmış olan kanal aracılığıyla üç farklı analiz eş zamanlı gerçekleştirebilecektir. Bu analizleri gerçekleştirirken kanallar ayrı olduğundan herhangi bir spesifik olmayan bağlanma meydana gelmeyecektir. Bu şekilde 3 farklı mikroorganizma aynı anda spesifik antikorlar aracılığıyla tespit edilebilecektir. SPRi sisteminde kanser biyomarkerlarını belirlemek için yapılan çalışmada offline immobilizasyon ile farklı ligandlar yüzeye bağlanabilecek ve eş zamanlı akış ile her ligand kendine özgü analiti yakalayabilecektir. Bu yöntem ile yine birden fazla analit eş zamanlı ve gerçek zamanlı olarak kısa sürede tespit edilebilecektir. Sonuç olarak çoklu tespit ile enfeksiyonlarda ve kanser hastalığında erken tanı için gerekli olan bilgiler kısa sürede elde edilebilecek ve hızlı bir şekilde başlanan tedavi ile mortalite ve morbidite oranlarının azalmasına katkı sağlanacaktır.

2.1 Biyosensör Tanımı

“Biyosensör” terimi çok geniştir ve çeşitli anlamlarda kullanılmaktadır. Biyosensörler, biyolojik bir yanıtı elektrik sinyaline dönüştüren analitik cihazlardır [5, 6]. Başka bir ifadede, biyosensörler, bir biyolojik tanıma mekanizmasını fiziksel bir transdüksiyon tekniği ile birleştiren moleküler sensörlerdir [7]. Biyosensörler pH ve sıcaklık gibi fiziksel parametrelerden bağımsız olarak son derece spesifik olmalı ve tekrar kullanılabilir olmalıdır. "Biyosensör" terimi Cammann [8], tarafından sözlüğe eklenmiştir ve tanımı IUPAC (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği) tarafından yapılmıştır. IUPAC'a göre, biyosensör “transdüser eleman ile doğrudan mekansal temas halinde olan bir biyolojik tanıma elementini kullanarak spesifik nicel veya yarı niceliksel analitik bilgi sağlayabilen bağımsız bir entegre cihaz” olarak tanımlanmaktadır. Biyosensörler, örneklerden biyoanalitik molekülleri tespit etmek için üç bilimi (kimya, biyoloji ve mühendislik) tek bir cihazda birleştirmek için tasarlanmıştır [9].

2.2 Biyosensör Tarihi

Biyosensörlerin başlangıcı, biyosensör kavramının babası olarak bilinen Clark'ın, diyaliz membranı kullanılarak bir oksijen elektrodunda glikoz oksidazın (GOX) tutulduğu bir deney yayınladığı 1962'ye tarihlenebilmektedir [10].

ABD'nin Ohio eyaletinde bulunan Yellow Spring Instrument Co., 1975 yılında dünya çapındaki şirketler tarafından inşa edilecek biyosensör bazlı laboratuvar analizörlerinin ilkinin ürettiği.

Guilbault ve Montalvo [11], bir amonyum seçici sıvı membran elektrodunda hareketsizleştirilmiş üreaza dayalı bir üre sensörü olan bir potansiyometrik enzim elektrotunu ilk defa detaylandırmıştır.

Lubbers ve Opitz [12], karbondioksit veya oksijeni ölçmek için hareketsiz göstergeli bir fiber optik sensörünü açıklamıştır ve fiber optik oksijen sensörünün ucundaki

alkol oksidazı hareketsizleştirerek, alkol için optik bir biyosensör konseptini genişletmişler.

Yapay pankreas içine bir elektrokimyasal glikoz biyosensörü dahil edilmiştir ve bu daha sonra Miles (Elkhart) tarafından Biostator olarak pazarlanmıştır [13]. Aynı yıl, La Roche (İsviçre), laktat dehidrojenazdan elektrotlara elektronları yerleştirmek için çözünür ara bulucu hekzasiyanoferratin kullanıldığı Laktat Analiz Cihazı LA 640'ı tanıtmıştır.

Subkütan implantasyon için ilk iğne tipi enzim elektrodunu tarif eden glikoz biyosensörlerinin *in vivo* uygulaması bildirilmiştir [14]. Evde kan şekeri izleme için kalem büyüklüğünde bir ölçüm cihazı, 1987 yılında MediSense (Cambridge, ABD) tarafından başlatılan serigrafi enzim elektrotlarının temelini oluşturmuştur. Antikorları bir piezoelektrik veya potansiyometrik dönüştürücüye sabitleyerek doğrudan immünosensörler oluşturma fikri yetmişli yılların başından beri araştırılmıştır. BIAcore (Pharmacia, İsveç) 1990 yılında bu teknolojinin ticari modelini üretmiştir [15].

2.3 Biosensörün Temel Bileşenleri

Biyosensör, fizyolojik bir değişiklik veya çeşitli kimyasal veya biyolojik materyallerin varlığı ile ilgili bilgileri tespit eden, kaydeden ve aktaran bir cihazdır. Bu biyolojik materyaller arasında enzimler, dokular, mikroorganizmalar, antikorlar, hücre reseptörleri ve biyolojik olarak türetilmiş materyaller bulunmaktadır. Biyosensörler ayrıca fiziko-kimyasal bir transdüser ile yakın temastan veya ortamdaki transdüksiyon mikro sistemlerinden dolayı taklit edici bir bileşene sahiptir. Başka bir deyişle, biyosensörler, biyo-afinite veya biyo-metabolizmalarından kaynaklanabilecek bir biyolojik tanıma işlemi yoluyla çalışan biyolojik materyalleri içeren analitik cihazlardır. Bu tanıma işleminin sonuçları daha sonra bir biyokimyasal sinyali ölçülebilir bir elektrik sinyaline dönüştüren bileşenler olan dönüştürücüler ile ve bir dönüştürme mekanizması aracılığıyla göstergeden okunabilmektedir [16].

Biyosensörler esas olarak üç bölüme ayrılmıştır. (i) Ligand: Hassas bir biyolojik element (biyolojik materyal örn. doku, mikroorganizmalar, organeller, hücre

reseptörleri, enzimler, antikorlar, nükleik asitler, vb.), (ii) Dönüştürücü: Analitin etkileşiminden kaynaklanan sinyali, sonuçların kullanıcı dostu bir şekilde görüntülenmesinden sorumlu olan dedektör elemanıdır (fizikokimyasal bir şekilde çalışır; optik, piezoelektrik, elektrokimyasal, vb.), (iii) Üçüncü bölüm, sinyal koşullandırma devresi (amplifikatör), işlemci ve bir gösterge biriminden oluşan ilişkili elektroniklerdir [16-19]. Analit ise biyosensör sisteminde hedef alınan ilgili maddedir [20].

Biyoreseptörler (ligand), biyosensör teknolojileri için özgüllüğün anahtarıdır. İlgili analitin ölçüm için sensöre bağlanmasından sorumludurlar. Bu biyoreseptörler birçok şekilde olabilmektedir. Kullanılan farklı biyoreseptörler, biyosensörler kullanılarak izlenen farklı analitler kadar çoktur [21]. Biyoreseptörler antikorlar, enzimler, nükleik asitler, aptamerler, bakteriyofajlar, organeller ve mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Çok fazla çeşitlilikte biyoreseptör türü bulunmaktadır. Ancak biyosensör uygulamalarında kullanılan başlıca elementler antikor, enzim ve nükleik asittir. Biyoreseptörler, biyosensör teknolojisinde immobilizasyondan dolayı önemli bir role sahiptir. Biyoreseptörün immobilizasyonu için uygun bir tekniğin seçimi yararlı bir biyosensör üretimi için önemlidir. Bu teknikler, adsorpsiyon, mikrokapsülleme, sensör yüzeyine tutunma, kovalent bağlanma ve çapraz bağlama yöntemlerini içermektedir [18].

Sensörün dönüştürücü kısmı, sinyali tanıma sisteminin çıkış alanından, çoğunlukla elektrik alanına aktarmaya yaramaktadır. Kelimenin genel önemi nedeniyle, bir dönüştürücü iki yönlü sinyal aktarımı sağlamaktadır. Bir sensörün dönüştürücü kısmına ayrıca bir dedektör, sensör veya elektrot da denmektedir, ancak karışıklıktan kaçınmak için dönüştürücü terimi tercih edilmektedir [22]. Biyosensörlerin en önemli bileşenleri substrat ve dönüştürücüdür. Biyoaktif madde ve substrat arasında meydana gelen reaksiyon sonucunda meydana gelen ses, ışık, sıcaklık, biyolojik veya kimyasal bileşen formundaki ürün elektrot, yarı iletken, termistör, veya ses dedektörü gibi dönüştürücüler ile okunabilir dataya dönüştürülmektedir [23].

İstenen biyolojik materyal (genellikle spesifik bir enzim) geleneksel yöntemlerle (fiziksel veya membran sıkışması, kovalent olmayan veya kovalent bağlanma)

hareketsizleştirilmektedir. Bu hareketsizleştirilmiş biyolojik malzeme, dönüştürücü ile yakın temas halinde bulunmaktadır. Analit biyolojik malzemeye bağlanmakta ve bu da ölçülebilen elektronik yanıtı üreten bağlı bir analit oluşturmaktadır. Bazı durumlarda analit, ısı, gaz (oksijen), elektronlar veya hidrojen iyonlarının salınımı ile ilişkili olabilen bir ürüne dönüştürülmektedir. Dönüştürücü, ürüne bağlı değişiklikleri, yükseltilebilen ve ölçülebilen elektrik sinyallerine dönüştürebilmektedir [17].

2.4 Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri

Biyosensörlerin inşası ile ilgili olarak, biyomoleküllerin transdüsera yapışması, immobilizasyon olarak adlandırılan, en önemli ve ilk adımdır. Biyosensörlerin inşası için en yaygın kullanılan immobilizasyon teknikleri fiziksel adsorpsiyon, kovalent bağlanma, matris sıkışması, moleküler çapraz bağlama ve membran yakalamadır [24-26].

Fiziksel adsorpsiyon, biyomateryali sensörün yüzeyine tutturmak için Van der Waals ve hidrofobik kuvvetler, hidrojen bağları ve iyonik kuvvetlerin bir kombinasyonunu kullanmaktadır. Selüloz, kolodion, silika jel, cam, hidroksiapatit ve kollajen gibi birçok substratın, biyo-bileşenleri adsorbe ettiği iyi bilinmektedir. Bu yöntem çok basittir, ancak kullanılan kuvvetler çok güçlü değildir ve bu yöntemle bağlanan biyomoleküller salınabilmekte veya kalıcı olmayabilmektedir [27].

Kovalent bağlanmada, sensör yüzeyi, biyolojik malzemelerin bağlanabileceği reaktif bir grup elde etmek üzere modifiye edilmektedir. Genellikle, amino, karboksilik, imidazol, tiol, hidroksil gibi proteinlerin amino asit yan zincirlerinde bulunan nükleofilik fonksiyonel gruplar birleştirme için kullanılmaktadır. Bu yöntem, biyoelementlerin homojenliğini, yoğunluğunu ve dağılımını, ayrıca yüzeylerin tekrarlanabilirliğini ve homojenliğini geliştirmektedir. Kovalent immobilizasyon, instabilite, difüzyon ve agregasyon veya biyomoleküllerin inaktivasyonu gibi bazı yaygın problemleri azaltabilmekte veya ortadan kaldıracabilmektedir. Bu, biyomoleküller sensör yüzeyleri üzerinde polimer matrisleri ile hareketsiz kılındığında meydana gelmektedir. Bu amaçlar için glutaraldehid, karbodiimid, süksinimid esterler, maleinimidler ve periodat gibi reaktifler genellikle kovalent immobilizasyon için kullanılmaktadır [28].

Matris sıkışmasında, biyomoleküller polimerik jel matrisi içinde tutulmaktadır. Bu yöntem için genellikle poliakrilamid, nişasta, aljinat, pektat, polivinil alkol, polivinil klorür, polikarbonat, poliakrilamid, selüloz asetat ve silika jel kullanılmaktadır. Matris sıkışması, kullanım sırasında biyolojik türlerin olası sızıntılarına yol açmakta ve bu da aktivite kaybına neden olmaktadır [26].

Biyomoleküllerin moleküller arası çapraz bağlanması için glutaraldehit, heksametilen di-izosiyanat, 1,5-difloro 2,4-dinitrobenzen ve bisdiazobenzidin-2,2'-disülfonik asit gibi iki fonksiyonlu veya çok fonksiyonlu reaktifler kullanılmaktadır. Biyosensör uygulamalarında en yaygın çapraz bağlama maddesi, lizin amino enzim gruplarıyla birleşen glutaraldehittir.

Enkapsülasyonda, biyolojik malzemenin etrafında gözenekli bir kapsülleme matrisi (örn., lipid çift katmanları) oluşmakta ve bunu sensöre bağlamaya yardımcı olmaktadır. Kapsülleme için diğer yaklaşım, seramik, cam ve diğer inorganik malzemelerdeki biyolojik moleküllerin immobilizasyonu için sol-jel yöntemini kullanmaktır. Sol-jel prosedüründe biyolojik moleküller, polimerik okso köprülü SiO₂ ağı gibi gözenekli bir matriste tutulur. Bu matrisler, optik olarak şeffaf oldukları için kimyasal etkileşimlerin optik olarak izlenmesini sağlar. Sol-jel işlemi oda sıcaklığında yapılabilir ve biyomolekülleri denatürasyona karşı korur. Bu prosedürle hareketsiz hale getirilen biyomoleküller çok karardır, ancak tekrarlanabilir gözenek boyutlarına sahip sol-jellerin elde edilmesi hala bir engel gibi görünmektedir. Gözenekli ağ içinde yayılma sınırlamaları, camsı matrisin kırılgenliği, tekrarlanabilirlik veya hazırlama prosedürlerindeki tutarsızlıklar gibi problemler rutin uygulama için bu prosedürün kullanılabilmesi için çözümlenmelidir [29].

Verimli bir biyosensör için, immobilizasyon tekniği çeşitli özelliklere sahip olmalıdır: iyi ve hızlı, transdüserden immobilize biyomoleküllerin süzülmesi, uzun ömür ve biyomoleküller, immobilizasyondan sonra, algılama ve tekrar üretilebilirlik sırasında bireyselliğini taşımalıdır [30].

2.5 Biyosensörlerin Temel Özellikleri

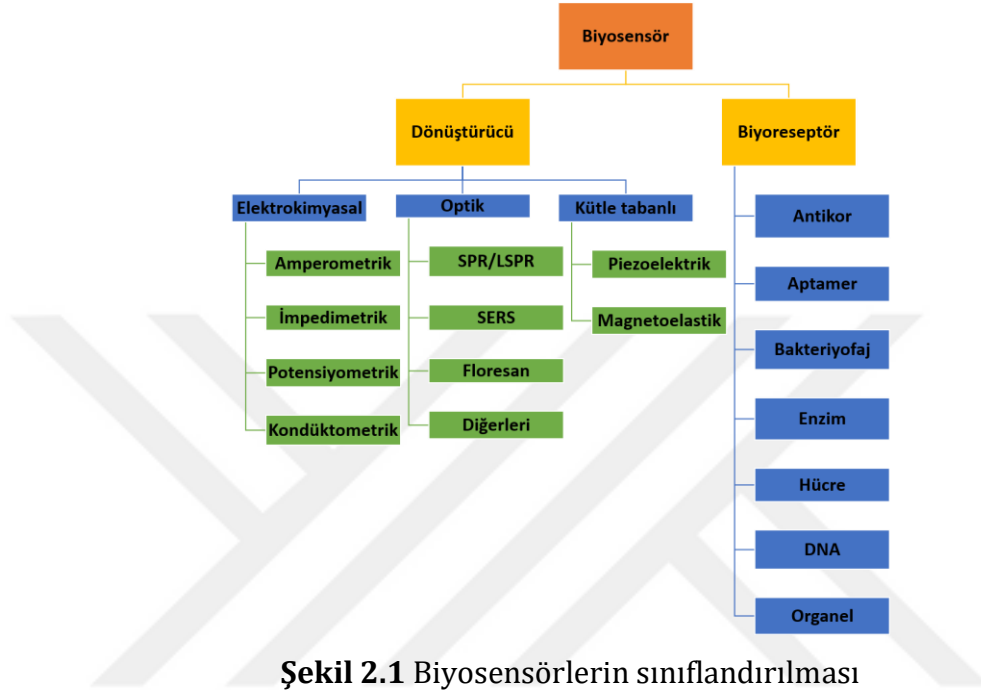
Bir biyosensörde bulunması gereken temel özellikler aşağıdaki gibidir [18, 19, 31, 32].

- 1) Doğrusallık: Sensör kalibrasyon eğrisinin maksimum doğrusal değeri. Yüksek substrat konsantrasyonunun algılanması için sensörün lineerliği yüksek olmasını ifade etmektedir.
- 2) Hassasiyet: Ölçüm sırasında analit konsantrasyonunda meydana gelen en küçük değişikliği bile algılayabilme kabiliyetini ifade etmektedir.
- 3) Seçicilik: Biyosensörün tespiti yapılması istenen analite özgüllük kabiliyetine sahip olmasını ifade etmektedir.
- 4) Yanıt süresi: Biyosensör cihazından yanıtın olabildiğine en kısa sürede alınabilme kabiliyetini belirtmektedir.
- 5) Düşük belirme limiti: Analiti makul ölçüde küçük bir örnek hacminde (1 -100 mL) tespit etme yeteneğini ifade etmektedir.
- 6) Boyut: Saha kullanımı için kompakt, portatif, el tipi tasarımını belirtmektedir.
- 7) Tekrarlanabilirlik: Optimum koşullarda meydana gelen ölçümlerin arka arkaya yapılan analizlerde çıktı sinyallerinin benzer sonuçlar vermesini ifade etmektedir.

2.6 Biyosensör Çeşitleri

Biyosensörler, kullandıkları biyolojik sinyalleme mekanizması tipine veya kullandıkları sinyal iletim tipine göre ve içerdikleri biyolojik elemanın türüne göre gruplandırılabilir (Şekil 2.1). Transdüksiyon, çok çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir. Çoğu transdüksiyon şekli üç ana sınıftan birinde kategorize edilebilmektedir. Bu sınıflar şunlardır: 1) Elektrokimyasal tespit yöntemleri, 2) Optik tespit yöntemleri ve 3) Kütle tespit yöntemleri. Bununla birlikte, biyosensörlerde kullanılmak üzere sürekli yeni tip transdüserler geliştirilmektedir [33]. Biyolojik elemanın türlerini enzimler, antikorlar, mikroorganizmalar, biyolojik doku ve organeller içermektedir. Biyosensörler ayrıca analit ve biyolojik eleman arasında meydana gelen etkileşim ve ortaya çıkan ürünlere göre de sınıflandırılmaktadırlar. Biyolojik eleman analite bağlanırsa,

sensör bir afinite sensörü olarak adlandırılmaktadır. Biyolojik eleman ve analit, bir substratın konsantrasyonunu ölçmek için kullanılabilecek kimyasal bir değişikliğe yol açarsa, sensöre metabolik sensör denmektedir. Biyolojik eleman analitle birleşirse ve kimyasal olarak değiştirmezse ancak yardımcı bir alt tabakaya dönüştürürse, biyosensör katalitik sensör olarak nitelendirilmektedir [34].



Şekil 2.1 Biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler tarafından kullanılan biyolojik sinyaller beş ana mekanizmaya ayrılabilir [2].

(a) *Antikor/antijen*: Bir antikor ve bir antijen arasındaki yüksek özgüllük, bu tip sensör teknolojisinde kullanılabilmektedir. Bu spesifikliği kullanan biyosensörler, bağlanmanın spesifik olmayan etkileşimlerin en aza indirildiği koşullar altında gerçekleşmesini sağlamalıdır.

(b) *Enzimler*: Enzim bazlı biyosensörler, spesifik tespit için katalitik aktivitelerini ve bağlanma yeteneklerini kullanan enzim biyoreseptörlerinden oluşmaktadır. Enzimler tarafından katalize edilen reaksiyon ürünleri, doğrudan veya bir indikatör ile birlikte tespit edilebilmektedir.

(c) *Nükleik asitler*: DNA'daki adenozin ve timin, sitozin ve guanozin arasındaki tamamlayıcı ilişkiler, nükleik asit bazlı biyosensörlerde özgüllüğün temelini

oluşturmaktadır. Bu sensörler eser miktarda mikroorganizma DNA'sını, bilinen DNA'nın tamamlayıcı bir dizisiyle karşılaştırarak tespit edebilmektedir.

(d) *Hücreler ve virüsler*: Bakteri ve mantar gibi mikroorganizmalar, belirli molekülleri veya çevre ortamın genel durumunu tespit etmek için biyosensör olarak kullanılabilir. Örneğin, hücre metabolizması, hücre canlılığı, hücre solunumu ve biyoluminesans gibi hücre davranışı, ağır metallerin saptanması için göstergeler olarak kullanılabilir.

(e) *Biyomimetik malzemeler esaslı*: Biyomimetik bir biyosensör, doğal bir biyosensörün işlevini taklit eden yapay veya sentetik bir sensördür. Bunlar aptasensörlerin biyo-bileşen olarak aptamerleri kullandığı aptasensörleri içerebilir. Aptamerler amino asitleri, oligosakkaritleri, peptitleri ve proteinleri tanımak için tasarlanabilen sentetik nükleik asit zincirleridir.

2.6.1 Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler esas olarak hibridize DNA, DNA bağlayıcı ilaçlar, glikoz konsantrasyonu, vb. tespiti için kullanılmaktadır. Bu biyosensör sınıfı için temel prensip, birçok kimyasal reaksiyonun, çözeltinin elektriksel özelliklerinde algılanabilen ve ölçüm parametresi olarak kullanılacak bazı değişikliklere neden olan iyon veya elektron üretmesi veya tüketmesidir [35]. Elektrokimyasal biyosensörler, iletkenlik, amperometrik ve potansiyometrik ölçüm elektrik parametrelerine göre sınıflandırılabilir. Optik yöntemlerle karşılaştırıldığında, elektrokimya, analistin bulanık örneklerle çalışmasına izin verir ve ekipmanın sermaye maliyeti çok daha düşüktür. Diğer yandan elektrokimyasal yöntemler optik muadillerine göre biraz daha sınırlı seçicilik ve duyarlılık göstermektedir [36].

2.6.2 Kütle Tabanlı Biyosensörler

Kütle tabanlı cihazlar, piezoelektrik ve akustik dalga biyosensörlerini içermektedir. Piezoelektrik biyosensörler, bir elektrik sinyali uygulanarak belirli bir frekansta salınacak şekilde yapılabilen piezoelektrik bir bileşene (genellikle altın elektrotlarla kaplanmış bir kuvars kristali) sahiptir ve yüzeyleri biyolojik olarak aktif bir madde ile kaplanmaktadır. Aktif maddeye bağlanan analitleri içeren bir çözelti içine yerleştirildiklerinde, sistemin kütlesi artmakta ve salınımın rezonans frekansı

orantılı olarak azalmaktadır. Benzer şekilde, akustik dalga biyosensörlerinin yüzeyine kütle yüklenmesi, analit konsantrasyonunu dolaylı olarak ölçmek için kullanılabilen çıkış frekansında bir kaymaya yol açmaktadır. Kullanımı çok basit ve ucuzdur, ancak özgüllük, seçicilik ve duyarlılıktan yoksundurlar [37].

2.6.3 Optik Biyosensörler

Optik biyosensörlerin seçiciliği ve duyarlılığı, bunları tespit amacıyla en popüler biyosensörler kategorisine sokmuştur. Optik biyosensörler arasında fiber optik, Research International (Monroe, WA) tarafından pazarlanan ilk ticari sensördür [38]. Optik biyosensörler yüksek hassasiyet ve seçicilik avantajlarına sahiptir. Emilim, kırılma, yansıma, dağılım, kızılötesi, polarizasyon, kemilüminesans, floresans, fosforesans, vb. gibi birçok sinyale dayalı olarak doğru tespit sunabilmektedirler. Aslında, optik biyosensörler etiketlere gerek olup olmadığına göre iki kısma ayrılabilir. Bir tip işaretleyiciye ihtiyaç duyarken, diğer tip ihtiyaç duymamaktadır. Floresan, optik fiberler ve yüzey plazmon rezonansı optik tabanlı biyosensörlerdir [39]. Optik biyosensörlerin avantajları esas olarak yüksek hassasiyetleri, gerçek zamanlı izleme yeteneği ve etiketsiz olma olasılığıdır. En çok kullanılan etiketsiz transdüksiyon yöntemi, yüzey plazmon rezonansıdır [3].

2.7 Biyosensörlerin Avantaj ve Dezavantajları

Günümüzde yaygın olarak kullanılan biyosensörlerin avantaj ve dezavantajları aşağıda belirtilmiştir [40].

Avantajlar:

- Çoğu ölçüm cihazına cevap vermeyen polar olmayan molekülleri ölçebilirler.
- Biyosensörler, içinde kullanılan hareketsiz sistem nedeniyle spesifiktir.
- Biyosensörler ile hızlı ve sürekli kontrol mümkündür.
- Tepki süresi kısa (tipik olarak bir dakikadan az) ve pratiktir.

Dezavantajlar:

- Biyolojik materyalin denatürasyonu nedeniyle ısı sterilizasyonu mümkün değildir.

- Biyolojik materyalin stabilitesi (enzim, hücre, antikor, doku vb.), molekülün çevresel koşullar altında (pH, sıcaklık veya iyonlar) denatüralize edilebilen doğal özelliklerine bağlıdır.
- Biyosensördeki hücreler, zardan difüzyon yapabilen diğer moleküller tarafından zehirlenebilir.

2.8 Biyosensörlerin Uygulama Alanları

Biyosensörlerin avantajları, düşük maliyetli, küçük boyutlu, hızlı ve kolay kullanımın yanı sıra mevcut cihazlardan daha büyük bir hassasiyet ve seçicilik içermektedir. Biyosensörlerin klinik analiz, genel sağlık bakımı izlemesinde birçok kullanımı bulunmaktadır. En popüler örnek, diyabet hastası olan kişiler tarafından kandaki glikoz seviyelerini izlemek için kullanılan glikoz oksidaz bazlı sensördür. Biyosensörler genel sağlık izleme [41], hastalık taraması [42], klinik analiz ve hastalık tanısı [43], veterinerlik ve tarım uygulamaları [44, 45], endüstriyel işlem ve izleme [46] çevre kirliliği kontrolü [47], gıda güvenliği [48] gibi uygulama alanlarında kullanılmaktadır [17].

Biyosensörler genellikle aşağıda listelenen farklı pozisyonlarda bulunmaktadır [49].

- *In-vivo*: Bu durumda, bir biyo-algılama bir bedenin veya canlı bir organizmanın içinde gerçekleşmektedir.
- *In vitro*: Bir *in vitro* biyosensör, bir kültür tabağında, test tüpünde veya canlı varlığın dışında başka bir yerde çalışan bir biyosensördür.
- *At-line*: Bir biyosensör, bir numunenin aranabileceği, analiz edilebileceği ve üretimin devam etmesi gerekip gerekmediği sonucuna varılabileceği bir üretim hattına uygulanmaktadır. Bir süt işleme tesisinde laktozun izlenmesi örnek olarak verilebilmektedir.
- *In-line*: Tamamen otomatik hale getirilmesi mümkün olan sürekli üretime sahip bir değişkeni incelemek için bir üretim hattı içine bir sıralı biyosensör yerleştirilebilmektedir. Su arıtma, sıralı bir biyosensörün uygulamalarından biridir.

Deney, cihazlar, test, algılama, biyomalzemelerde izleme ve bir biyoproses sürecinin diğer aşamaları ne olursa olsun, personel, zaman sınırlamaları, tesisler, özel koşullar

ve bütçe ile çok önemli olabilmektedir. Bu nedenle, laboratuvar çalışmasının ortadan kaldırılması süreci hızlandırabilir ve zaman ve paradan tasarruf edebilir.

2.9 Biyosensör ve Patojen Bakteriler

Patojenik mikroorganizmaların hızlı tespiti ve tanımlanması, bulaşıcı hastalığın yayılmasını en aza indirmek ve klinisyenleri hasta tedavi stratejileri hakkında bilgilendirmek için esastır [50]. Patojen bakterilerden kaynaklanan hastalıkları önlemede ilk kontrol noktası izlemedir. Geleneksel kültür yöntemleri bakteri saptanması ve tanımlanmasında yıllardır kullanılan standart bir uygulamadır [51]. Patojen bakterilerin tespit edilmesi ve tanımlanması için kullanılan yöntemler mikrobiyolojik ve biyokimyasal tanımlamadır [52, 53]. Mikrobiyolojik yöntemlerin genel olarak 4 farklı fazı vardır. Tüm organizmaların gelişmesine izin vermek için ön zenginleştirme, araştırılan organizmanın gelişmesine izin vermek ve bakteriyel popülasyonu saptanabilir bir düzeye çıkarmak için seçici zenginleştirme, seçici agar plakaları kullanılarak izolasyon ve belirli bir patojen mikroorganizmanın tanımlanmasını doğrulamak için, serolojik ve biyokimyasal testlerdir [31]. Ancak geleneksel yöntemlerde sonuçları elde etmek için 3-5 gün gibi bir süre gereklidir. Güvenilir olmasına rağmen, zaman alıcı ve yoğun emek gerektiren yöntemlerdir. Belirleme limiti genellikle ön zenginleştirme olmadan 10^5 - 10^9 hücre/mL'dir. Bu nedenlerden dolayı geleneksel yöntemler zenginleştirme olmadan bakterinin hızlı ve direkt tespit edilmesi için uygun değildirler [31]. Sonuçların alınması uzun sürdüğünden dolayı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), enzim bağlantılı immünosensör testi (ELISA) ve nükleik asit temelli moleküler biyoloji yöntemleri gibi hızlı tespit teknikleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler saptama zamanını, günlerden birkaç saate indirmektedir. Ancak bu yöntemler, eğitimli personel tarafından çalışılması, kapsamlı numune hazırlama, uzun ve sıkıcı prosedürler sırasında bakteriyel kontaminasyonun meydana gelmesi gibi çeşitli dezavantajlara sahiptir [54]. Ek olarak gelişen ülkelerde yüksek maliyet ve sınırlı kaynaklar çoğu hızlı tespit tekniğinin uygulanmasını sınırlandırmaktadır [18].

Patojenik bakteriler insan ve hayvan sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Patojenlerin hızlı multipleks tespiti bakteriyel salgınların etkili yönetimi için kritik öneme sahiptir. Zamanında tedavinin kaçınılmaz olduğu durumlarda

enfeksiyonların antibiyotiklerle tedavisi, ancak neden olan patojenlerin doğru bir şekilde tanımlanmamış olması, ilaca dirençli bakterilerin yayılmasında küresel bir tehdit oluşturmaktadır. Biyosensör teknolojisi patojen tespiti için hızla gelişen bir teknolojidir. Bunu en önemli sebepleri portatif, hızlı ve otomatik multipleks ölçümler için uygun olmasıdır [51, 55].

Bakteriyel tespit için biyosensörler genellikle reseptörler, nükleik asitler veya uygun bir transdüserle yakın temasta olan antikorlar gibi bir biyolojik tanıma bileşenini içermektedir. Sinyal transdüksiyon yöntemine bağlı olarak biyosensörler dört temel gruba ayrılabilir. Bunlar, optik, kütle, elektrokimyasal ve termal sensörlerdir. Ek olarak, biyosensörler iki geniş kategoriye ayrılabilir. Bunlar ise, hedef analitin doğrudan tespiti için sensörler ve dolaylı (etiketli) tespiti olan sensörlerdir. Doğrudan tespit biyosensörleri, biyospesifik reaksiyonun kompleks oluşumun neden olduğu fiziksel değişiklikleri ölçerek doğrudan gerçek zamanlı olarak belirleneceği şekilde tasarlanmıştır. Dolaylı tespit biyosensörleri, bir ön biyokimyasal reaksiyonun meydana geldiği ve bu reaksiyonun ürünlerinin bir sensör tarafından tespit edildiği biyosensörlerdir. Son olarak, bakteriler için biyosensörler kesikli (aralıklı) ve sürekli (izleme) modda çalışan sensörlere de ayrılabilir [56].

2.10 Biyosensör ve Kanser

İnsan sağlığına ilişkin daha katı gereklilikler, artan sayıda klinik testlere yol açtığından, son derece hassas, hızlı ve ekonomik analiz yöntemleri geliştirmeye giderek daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır [57].

Kanser, kontrolsüz büyüme ve anormal hücrelerin yayılması ile karakterize bir grup hastalıktır ve yayılması kontrol edilmezse ölümle sonuçlanmaktadır. Bir genin veya spesifik bir molekülün hasar görmesi, hücreler arasındaki iletişimi bozabilmekte ve sonuçta canlı bir organizmayı sürdüren tüm biyolojik fonksiyonların sona ermesine yol açabilmektedir [58]. Kanser, 200'den fazla kanser türü ile her gün 1500'den fazla ölüme neden olan, tüm dünyada yaşamı tehdit eden önde gelen bir hastalıktır. Kanser, son birkaç yıldır artan mortalite oranıyla dünyadaki ikinci en büyük hastalıktır. Hastanın sağkalım oranı, kanser teşhisi ve tedavisinin sınırlamaları

nedeniyle belirsizdir. Kanserin erken teşhisi, başarılı tedavisi için belirleyicidir [59, 60].

Kanser en sık ultrason, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) veya biyopsi ile tespit edilmektedir. Kansere genetik mutasyonların birikmesi neden olmakta ve bu nedenle hastalık ilerlemeden önce yakalanması gerekmektedir. Erken teşhis, tedavinin etkili olma şansını arttırmaktadır. Biyomarkerlar kanser tespitinde devrim yapmada büyük bir potansiyele sahiptir [61]. Biyomarkerların tespiti için geleneksel enzime bağlı immünosorban analizi (ELISA) veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bazlı yöntemler kullanılmaktadır. Her tahlilde pahalı reaktiflerin tüketimi ve yavaş tespit gibi teknolojik sınırlamalara maruz kalmak bu teknolojilerin dezavantajları arasındadır [62].

Biyomarkerlar, Ulusal Sağlık Enstitüleri'ndeki Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından "normal veya anormal bir süreci veya bir durumu veya hastalığı işaret eden, vücut sıvılarında veya dokularında bulunan biyolojik moleküller" olarak tanımlanmaktadır. Vücudun bir hastalık veya durum tedavisine ne kadar iyi tepki verdiğini kontrol etmek için de kullanılabilmektedirler [58]. Biyomarkerlar prognostik, öngörücü ve tanısal olarak sınıflandırılmaktadırlar. Tanısal biyomarkerlar hastalığın tespiti için kullanılırken, hastalığın nüksetme seyri hakkında bilgi, prognostik biyomarkerlar tarafından verilmektedir. Öte yandan, tedaviye yanıt öngörücü biyomarkerlarla tahmin edilmektedir [62]. Biyomarker konsantrasyonları, hastalığın tipini, durumunu veya ilerlemesini ve ayrıca hastanın tedaviye yanıtını tanımlamak için kullanılabilmektedir. Hastalıkla ilişkili biyomarkerlar üzerine araştırmalar devam eden bir süreçtir [63]. Biyomarkerlar tipik olarak kan, serum, idrar veya serebral omurilik sıvısı gibi insan sıvılarında tespit edilmektedir, ayrıca bunlar tümör hücrelerinin içinde veya üzerinde bulunabilmektedir [64].

Biyosensörler tıp alanında, özellikle kanser araştırmalarında başarıyla uygulanabilmektedir. Biyosensörler, daha erken aşamada hastalıkların tespit edilmesine ve vücuttaki değişen miktarda biyomarkerların saptanmasına izin vererek tanı yolunda devrim yaratmıştır. Biyolojik algılama bileşeni ilgili analit için

oldukça seçici olduğundan, tüm biyosensörler genellikle minimal numune hazırlığı içermektedir [65].

Kanser açısından, biyosensör tarafından tespit edilen analit bir tümör biyomarkerıdır. Bu nedenle, biyosensörler tümör hücreleri tarafından eksprese edilen ve/veya salgılanan bazı proteinlerin seviyelerini ölçerek, bir tümörün var olup olmadığını, iyi huylu veya kötü huylu olup olmadığını ve tedavinin kanserli hücreleri azaltmada veya ortadan kaldırmada etkili olup olmadığını tespit edebilmektedir [66]. Kanser antijenlerini saptamak için, monoklonal antikolar ve aptamerler genellikle tek sarmallı desoksibonükleik aside (ssDNA) karşılık gelen mikro ribonükleik asitleri (miRNA'lar) yakalamak için kullanılmaktadır [67].

Birden fazla analiti tespit edebilen biyosensörler, kanser teşhis ve takibinde özellikle yararlı olabilmektedir, çünkü çoğu kanser türü çoklu biyomarkerları içermektedir [68, 69]. Birçok kanser çeşidini tespit edebilen çoklu sensörlerin tasarlanması, bu hastalıktan ölüm oranını azaltabilecektir. Çoklu dönüştürücülere sahip bu tür biyosensörler, spesifik proteinlerin veya antijenlerin saptanması için ayrı ayrı işlevselleştirilmektedir [67]. Bir biyosensörün birden fazla biyomarkerı aynı anda test edebilmesi sadece tanıya yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda zaman ve finansal kaynaklardan da tasarruf sağlamaktadır [70]. Kanser testi için biyosensörler geliştirirken kanser biyolojisinin karmaşıklığını ve bazı temel unsurlarını anlamak da önemlidir [71].

Kanser araştırması temel olarak DNA veya RNA'daki mutasyonlar, proteinlerdeki ve protein düzeylerindeki değişiklikler gibi hücrelerin birçok özelliğinin tanımlanmasına ve ayrıca hücrelerin morfoloji, yapışma veya elastikiyet gibi özelliklerinin karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Analitik bir cihaz olarak, biyosensör seçilen analitin incelenen biyolojik materyale (örn. doku, hücreler, proteinler, RNA, DNA) bağlanmasını sağlamaktadır. Biyosensörlerde yapılan çoğu analiz, analitin belirli bir belirteç ile etiketlenmesini gerektirmektedir. Bununla birlikte, önceden etiketlenmeden analitlerin doğrudan saptanmasına izin veren birçok teknik de mevcuttur. Yaygın "etiketsiz" biyosensör teknolojileri, kuvars kristali mikro terazisi (QCM) ve yüzey plazmon rezonansıdır (SPR) [9]. Etiket içermeyen yöntemlerde analitin tanımlanması ve miktarının belirlenmesinde

antikor tabanlı tanımlama işlemi ile gerçekleştirilmektedir [65]. Bu teknolojilerle beraber mikroakışkanların kullanılması, bir teşhis testi sırasında katılan reaktanların mikrokanallar aracılığıyla kontrollü laminar akışına izin vermekte ve düşük malzeme tüketimi, azaltılmış örnek boyutu, gerçek zamanlı analiz ve yüksek verim taraması gibi faydalar sunmaktadır [72].

2.11 SPR ve Gıdalarda Kullanım Alanları

SPR, daha kısa sürede, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçları, duyarlılıkları, etiketsiz ve gerçek zamanlı tespiti ve kantitatif sonuçları nedeniyle yıllar boyunca yaygın bir yöntem olarak kullanılmıştır [73, 74]. SPR tekniği ilk olarak 1957'de teorik olarak öngörülmüştür [75]. Elektron uyarımı kullanılarak 1959'da doğrulanmıştır ve en son olarak 1968'de optik uyarım kullanılarak gösterilmiştir [76, 77]. Yüzey plazmonları genel olarak elektronlar veya ışık tarafından uygun uyarılma koşuluyla oluşturulabilmektedir.

SPR, bir metal ile dielektrik bir madde, tipik olarak bir sıvı veya hava arasında, yüzey plazmonu polaritonları (SPPs) oluşumunu ölçen bir olgudur. Monokromatik, p-polarize bir ışık kaynağından gelen ışık demeti, metal filmde bir diyot dizisi detektörüne yansıtılmaktadır. O zaman, metal yüzey üzerinde plazmon adı verilen iletken elektronların salınımları, gelen ışığın dalga fonksiyonu ile meydana gelmektedir. Plazmon, kaybolan bir dalga (evanescent wave) olarak adlandırılan bir elektromanyetik alan oluşturmaktadır. Bu dalga metal yüzeyden bir numune çözeltisine geçerken, yansıyan ışığın yoğunluğuna SPR açısı denmektedir. Moleküler etkileşimden kaynaklanan SPR açısı kayması zamana bağlı olarak izlenmektedir [1, 78]. Günümüze kadar, SPR uygulaması temel biyolojik çalışmalar, sağlık bilimleri araştırmaları, gıda güvenliği, klinik teşhis ve çevresel ve tarımsal izleme dahil olmak üzere çeşitli araştırma alanlarında kullanılmıştır. SPR bazlı biyosensörlerin kullanımı özellikle patojen [79, 80] ve hastalık tespitinde [81] artış göstermiştir.

SPR tekniği, sensör yüzeyindeki kütle değişimlerini ve her türlü molekül çiftinin bağlanmasını hassas ve anlık olarak, etiketleme yapmadan saptayabilen, opto-elektronik temelli, güçlü bir tekniktir. SPR tekniği, altın vb. materyallerin taşıdığı serbest elektronların karakteristik özelliklerden yararlanmaktadır. Yüksek kırılma indisine sahip bir malzemenin üzerine kaplanan ince altın katmanı, lazer ışını

emer ve altın yüzeyinde elektron dalgaları oluşur. Analiz edilmesi düşünülen kütle miktarındaki artış veya bir alıcının bağlanması halinde, altın katmanın yüzeyinde ışığın davranışı değişerek, kırılma indisi değişimine yol açar. Meydana gelen bu optik değişim sayesinde biyolojik etkileşimler, etiketlemeye ihtiyaç duyulmaksızın, yüksek hassasiyetle, gerçek zamanlı, nitel ve nicel olarak ölçülebilmektedir. SPR fenomeni çevresel faktörlere aşırı bağlıdır. Altın yüzeyine tek bir moleküler tabaka bile bağlansa ciddi bir sinyal değişimi oluşturabilmektedir. Bu tekniğin yüksek hassasiyete olan bağlılığı bir dezavantaj olarak şu şekilde karşımıza çıkabilmektedir: Hazırlanması sırasında yanlışlık yapılan bir örnekten sinyal alabilmek mümkün olmamaktadır. Bu nedenle çalışılacak sistemin simülasyonlarının yapılıp önceden planlanması, algılayıcı yüzeylerin modifikasyon işlemlerinin oldukça hassas ve kontrollü bir şekilde yapılması ve ölçümü yapılacak örneklerin kontrollü bir deney protokolü çerçevesinde yüzeye yerleştirilmesi hayati önem taşımaktadır.

Işık tarafından uyarılan plazmonlar, biyo-madde işleme, immüno-tanı ve antikor-antijen etkileşiminin kinetik analizi gibi biyo-materyal işlemlerinin incelenmesi için uygulanmıştır. SPR’de kullanılan materyalin refraktif indeksi ışığın rezonans giriş açısını, bağlanma verimliliğini, bağlanma dalga boyunu ve yansıyan ışığın optik fazını etkilemektedir. Tüm fiziksel miktarlar yansıyan ışıkla ölçülebilmektedir. Bu nedenle SPR tekniği floresans etiketlemeye gerek duymaz ve çok yüksek hassasiyetle gerçek zamanlı bilgi sağlamaktadır. Ayrıca çok az miktarda örnek ile refraktif indeks değişimleri belirlenebilmektedir. SPR’nin biyomedikal uygulamalarının çoğu, biyomoleküllerin saptanması ve tanımlanması üzerine odaklanmaktadır. SPR biyosensörleri, mikroorganizmalar, toksinler, proteinler ve nükleotitler gibi çeşitli analitleri saptamak için kullanılmıştır [82].

SPR biyosensörleri çeşitli sistemlere entegre edilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar bu konu ile ilgili bize geniş bir bilgi vermektedir. Genel olarak gıda kaynaklı patojenler üzerine yoğunlaşmıştır ve çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Fernández, vd. [83] 2010 yılında yapmış oldukları çalışmada süt örneklerinde antibiyotik saptamaya çalışmışlardır. Bu amaçla 6 kanallı SPR sistemi kullanılmıştır. Bu çalışma için üç önemli antibiyotik ailesinin (florokinolon, sülfonamid ve fenikol)

temsilci eşlenikleri kullanılmıştır. Çip yüzeyi polietilenglikol birimleri içeren iki tip merkaptalkil ayırıcı kullanarak kaplanmıştır. Bu şekilde kendiliğinden biriken moleküller (SAM) oluşturulmuştur. Örnek ve poliklonal antikor karışım şeklinde sisteme verilmiş ve saptanabilirlik başarısı enrofloksasin için 0,30 µg/L, sülfapiridin ve kloramfenikol için sırasıyla 0,29 µg/L, 0,26 µg/L olarak bulunmuştur. Vaisocherová-Lísalová, vd. [84] tarafından 2015 yılında yapılan çalışmada gıda enfeksiyonlarına yol açan *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella* spp. patojeninin SPR biyosensörü ile saptanmasına dair gerçekleştirilen çalışmada, yüzeyi poly(carboxybetaine acrylamide) kaplanmıştır. Daha sonra çip yüzeyine antikorlar immobilize edilmiştir. Gıda maddesi sisteme gönderilip inkübe edildikten sonra, biyotinlenmiş sekonder antikor (Ab₂) gönderilmiştir. En son olarak da çipin sinyalini arttırmak için streptavidin kaplı altın nanopartiküller gönderilmiştir. Çalışmada gıda numunesi olarak salatalık ve hamburger ekstraktı kullanılmıştır. Çalışmanın tespit limiti (LOD) salatalık ve hamburger ekstraktı için sırasıyla *E. coli* O157:H7 için 57 KOB/mL ve 17 KOB/mL ve *Salmonella* spp. için 7,4 x 10³ KOB/mL ve 11,7 x 10³ KOB/mL olarak bulunmuştur.

Optik bir biyosensör olan SPR yöntemi ile farklı mikroorganizmalar hızlı bir şekilde saptanabilmiştir. Barlen, vd. [85] 2007 yılında gerçekleştirmiş olduğu çalışmada SPR yöntemi ile *Salmonella* serovarları eş zamanlı ve spesifik olarak saptanmıştır. Bu çalışmada süt örnekleri inaktive edilmiş *Salmonella* Typhimurium ve *Salmonella* Enteritidis ile kontamine edilmiştir. Sistemde biyolojik tanımlama materyali olarak poliklonal anti-*Salmonella* antikor ve *Salmonella* Typhimurium ve *Salmonella* Enteritidis'e karşı O-spesifik (O:4 ve O:9) antikorları kullanılmıştır. Sandviç yönteminin kullanıldığı bu çalışmada 10 µl örnek hacminin yeterli olduğu belirtilmiştir. Ayrıca *Salmonella* Typhimurium ve *Salmonella* Enteritidis'in LOD değeri sırasıyla 2,5 x 10⁵ KOB/mL ve 2,5 x 10⁸ KOB/mL olarak saptanmıştır. Bir diğer çalışmada, yumurta sarısına *Salmonella enterica* serovar Enteritidis inoküle edilmiştir ve daha sonra SPR sistemi ile bu bakteriye özgü antikor kullanılarak mikroorganizma saptanmıştır [86]. Spesifik antikorlar kullanılarak gerçekleştirilen başka bir çalışmada süt örnekleri *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ve *E. coli* ile kontamine edilmiştir ve SPR sistemi ile süt örnekleri içerisinde bulunan bakteriler refraktif indeks değişimine bağlı olarak saptanmıştır [87].

Bakterilerden kaynaklanan enfeksiyonların yanı sıra üretmiş oldukları toksinler aracılığıyla meydana gelen intoksikasyon da halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. SPR yöntemiyle sadece bakteriler değil, toksinler de saptanabilmektedir. Nitekim Homola, vd. [88] 2002 yılında yapmış olduğu çalışmada süt ve tampon sıvısı staphylococcal enterotoxin B kontamine edilmiştir. Sandviç ve direkt assay tespit yöntemi ile kontamine edilen örneklerdeki toksin saptanabilmiştir. Direkt tespit yöntemi ile tampon sıvısı içinde bulunan toksinin belirlenme limiti 5 ng/mL olarak bulunurken, sandviç yöntemiyle hem tampon hem de süt örneğinde LOD değeri 0,5 ng/mL olarak saptanmıştır.

Patojenik mikroorganizmalar, gıda zehirlenmesi, açık yaraların enfeksiyonu, özellikle de yanık yaralanmaları ve sepsis gibi ağır klinik sonuçlara yol açabilmektedir. Bu patojenlerin hızlı bir şekilde saptanması, bu enfeksiyonların zamanında önlenmesini ve daha iyi klinik sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. Ancak geleneksel yöntemlerle bu bakterilerin saptanabilmesi uzun zaman almaktadır. Yapılan bir çalışmada altın yüzey iki farklı yüzey kimyası yöntemi kullanılarak işlevselleştirilmiştir. İlk yöntem NeutrAvidin tabanlı yüzey aracılığıyla biyotinlenmiş antikorun yüzeye immobilize edilmesidir. İkinci yöntemde üç farklı biyotinlenmemiş antikorun yüzeye protein G ile immobilize edilmesini içermektedir. İşlevselleştirilmiş yüzeye PBS çözeltisi içerisinde *E. coli* ile kontamine edilmiş kan, süt ve ıspanak örneği gönderilmiştir. Bu çalışma NeutrAvidin aracılı anti-LBP antikor-LBP immobilizasyonunun, *E. coli*'nin yüksek yakalama verimliliğine ulaşmak için daha iyi bir yöntem olduğunu ortaya koymuştur. PBS, kan, süt, ve ıspanak örneklerindeki bakterinin LOD değeri sırasıyla 50, 50, 50 ve 500 KOB/mL olarak bulunmuştur [89].

Bakteri üremesinin hızlı ve hassas olarak saptanması gıda endüstrisinde, su ve çevre kontrolünde ve klinik tanıda önem arz etmektedir. Kee, vd. [90] 2013'te bakteri üremesi ve antibiyotik duyarlılık testinin hızlı, hassas ve niceliksel izlenmesi için bir plazmonik nanohole sensörü üretmiştir. Konsept, plazmonik nanoholedeki olağanüstü optik transmisyon fenomenine dayanmaktadır. Bakterilerin yakalanması için *E. coli*'ye spesifik antikor uygulanmıştır. Çip yüzeyi polielektrolit multilayer olarak kaplanmıştır. Bu amaçla 3-mercaptopropionic acid, poly

(allylamine hydrochloride) ve poly (sodium-4 styrenesulfonate) kullanılmıştır. Antikor ile yakalanan bakterilere, minimum inhibisyon konsantrasyonu belirlenmiş tetrasiklin ve ampisilin gönderilmiştir. Bakteriler ampisilin gönderildikten sonra üremeyi sürdürürken, tetrasiklin gönderildiğinde üreme eğrisinde bir plato göstermiştir. Bu durum *E. coli*'nin ampisiline dirençli olduğunu, tetrasiklinin ise *E. coli*'nin üremesini engellediğini göstermiştir. Ayrıca bakterinin LOD değeri $<10^2$ KOB/mL olarak bulunmuştur.

Başka bir çalışmada, insan bağırsak sisteminin yaygın bir üyesi olan *Candida albicans*'ın hızlı bir şekilde saptanabilmesi için SPR metodu geliştirilmiştir. Analizde sandviç yöntemi ve direkt yöntem karşılaştırılmıştır. Yakalanan antikorlar karışık SAM üzerine kovalent olarak immobilize edilmiştir. 11-mercaptoundecanoic acid ve 3-mercaptopropanol farklı oranlarda karıştırılarak yüzey kaplanmıştır. Yapılan denemeler sonucunda *C. albicans*'ın saptanması için uygun yüzeyin sadece 11-mercaptoundecanoic acid ile kaplanan yüzey olduğu belirlenmiştir. LOD değeri direkt yöntem için 10^7 KOB/mL, sandviç yöntemi için 10^6 KOB/mL olarak bulunmuştur. Antikor *E. coli*, *Streptococcus mutans*, *S. aureus*, β -hemolitik streptokoklar ve *Lactobacillus casei* bakterileri üzerinde çapraz reaktivitesine bakılmıştır. Karışık kültür içerisinde bile *C. albicans*'ın saptanabileceği belirlenmiştir [91].

Başka bir çalışmada, *E. coli* O157:H7 ve MRSA, SPR aracılığıyla tanımlama elemanı olarak bakteriyofaj kullanılarak saptanmıştır. *E. coli*'yi saptamak için T4 bakteriyofajı, *S. aureus* için BP14 bakteriyofajı kullanılmıştır. İşlevselleştirilen bu sistem ile 10^3 KOB/mL konsantrasyonda bakteri 20 dakikadan daha kısa bir süre içerisinde saptanabilmiştir [92].

DİRENÇLİ *S. aureus* ve *Enterococcus* spp.

3.1 Giriş

Hastanede yatan hastalar için birincil mortalite nedeni olarak bilinen nozokomiyal enfeksiyonlar genellikle hastalar tarafından tıbbi bakım sırasında edinilmektedir. Bu enfeksiyonlar uzun süreli hastanede kalışlara, yaşam kalitesinde düşüşe, morbidite ve mortalitede artışa, insan gücü kaybına ve sağlık harcamalarında artışa neden olmaktadır [93]. WHO'ya göre, 4.544.100 nozokomiyal enfeksiyon vakası her yıl 4.131.000 hastayı etkilemekte ve yaklaşık 7 milyar Euro'luk ekonomik zarara neden olmaktadır [94]. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki nozokomiyal enfeksiyon oranları sırasıyla %7 ve %10'dur [95]. Halk sağlığı için risk oluşturan hastane enfeksiyonları erken teşhis edildiğinde bilinçli ve doğru seçim ile uygulanan antibiyotiklerle tedavi edilerek önlenabilmektedir. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve vankomisine dirençli *Enterococcus* (VRE), hastaneye yatırılan ve bağışıklığı baskılanmış hastalar için en yaygın hastane patojenleridir.

S. aureus, en sık kullanılan antibiyotiklere yavaş yavaş direnç geliştirmektedir [96]. *S. aureus*'un antibiyotiklere karşı direnci geliştikçe, tedavi süresi uzamakta, mortalite ve morbidite oranları artmaktadır. Bu dirençler arasında metisilin direnci en önemlisidir. Çünkü *mecA* geni tarafından metisiline dirençli genetik bir belirteç olarak kodlanan penisilin bağlayıcı protein 2a (PBP2a/PBP2) beta-laktam grubu antibiyotiklere düşük bir afinite göstermektedir [97].

Enterokoklar geniş bir antibiyotik direnci spektrumuna sahiptir [98]. Bu yetenekleri nedeniyle, nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan en yaygın ajanlar, *Enterococcus faecium* ve *E. faecalis* türlerini içeren enterokoklardır [99]. Dirençli *vanA* ve *vanB* genlerini taşıyan *E. faecium* ve *E. faecalis*, vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptid antibiyotiklerine vankomisin direnci gösterir ve bu suşlara VRE (vankomisine

dirençli *Enterococcus*) denir. VRE, tüm *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarının yaklaşık %6'sını oluşturmaktadır [100].

Antimikrobiyal ajanlar genellikle, hücre duvarı sentezini (örn., β -laktamlar ve glikopeptid ajanlar) engelleme, protein sentezinin engellenmesi (makrolidler ve tetrasiklinler), nükleik asit sentezinin (florokinolonlar ve rifampin) engellenmesi, metabolik yolun inhibe edilmesi (trimetoprim-sülfametoksazol) ve bakteriyel membran yapısının (polimiksinler ve daptomisin) bozulmasını içeren temel etki mekanizması dikkate alınarak sınıflandırılmaktadır [101]. Tez çalışmasında, dirençli ve duyarlı suşları tanımlamak için β -laktam ve glikopeptid antibiyotik üyesi sefoksitin ve vankomisin kullanılmıştır. Sefoksitin antimikrobiyal mekanizması, bakteriyel hücre otolizinleri aktive ederek, bakteriyel hücre duvarının sentezine müdahale ederek ve peptidoglikanın çapraz bağlanmasını inhibe ederek meydana gelmektedir. Vankomisin ise, duyarlı bakterilerde hücre duvarı sentezinin ikinci aşamasını engellemektedir [102].

Agar difüzyon [103], broth mikrodilüsyon [104], gradyan şerit testleri [105] ve disk difüzyon [106] gibi çeşitli fenotipik antimikrobiyal duyarlılık test yöntemleri geleneksel olarak araştırmacılar tarafından bakterilerin dirençli veya duyarlı olup olmadığını belirlemek için kullanılmıştır. Spesifik bir antibiyotiğe karşı direnç, dirençten sorumlu genlerin varlığını veya yokluğunu araştıran polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile de belirlenebilmektedir [107]. Bu yöntemler, özel mikrobiyoloji laboratuvarları, uzman personel ve uzun analiz süresi gerektirmektedir. Antimikrobiyal duyarlılık testinin dezavantajları, yeni, hızlı ve güvenilir yöntemlerin geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir. Yeni teknolojiler kullanarak patojenik bakterilerin hızlı ve hassas tespiti, hasta bakımını iyileştirmek ve hastane enfeksiyonlarını sınırlamak için hayati bir konudur.

Chiang, vd. [108] SPR sistemi kullanılarak dirençli veya duyarlı suşların saptanması için antimikrobiyal testin kullanımını tarif eden ilk kişilerdir. Bu araştırmacılar, tek bir kanal kullanarak altın çipe yapışan dirençli ve hassas bakterilerin antimikrobiyal duyarlılığını belirlemişlerdir. Syal, vd. [109] tarafından yapılan başka bir çalışmada, antimikrobiyal duyarlılık testi için tek bir kanal kullanılmış, ancak daha önce bahsedilen çalışmadan farklı olarak sensör yüzeyini işlevselleştirmek için SAM

oluşturulmuştur ve antibiyotiklerin antimikrobiyal aktivitesi, transmitter bir mikroskop görüntüsü ile izlenmiştir.

Literatürde SPR tespit sistemi ile ilgili çalışmalar göz önüne alındığında, sensör yüzeyinde çoklu kanalların kullanımının antimikrobiyal duyarlılık testi için sınırlı olduğu gözlenmektedir. Bu nedenle, tezin ilk kısmında MRSA ve VRE için antimikrobiyal duyarlılığın ve MRSA'nın protein G tabanlı bir sensör yüzeyinde çoklu ve eş zamanlı tespitine yönelik çalışmalar yapmıştır. Sensör yüzeyinde birden fazla kanalın kullanılması, referansların ve birden fazla numunenin aynı anda izlenmesi için kritik öneme sahiptir.

Deneylerde, bakterilerin duyarlı olması durumunda, bakteriler antibiyotik akışı ile altın yüzeyden ayrıldıkça daha fazla SPR açısı kayması meydana gelecektir. Başka bir deyişle, antibiyotiklerin test edilen bakteriler üzerindeki etkisi kırılma indeksindeki değişiklik ile belirlenebilecektir. Ek olarak, negatif veya pozitif kontrolün aç kaymaları gerçek zamanlı olarak izlenerek hangi bakterilerin dirençli veya duyarlı olduğunu aynı anda belirlemek mümkün olacaktır. Bu nedenle, bu tez çalışmasında, metisiline duyarlı ve metisiline dirençli *S. aureus*'un suşları ile vankomisine duyarlı ve vankomisine dirençli *Enterococcus* suşlarını ayırt etmek için SPR tekniği tek ve çok kanallı sistemlerle kullanılmıştır. Ayrıca MRSA'nın tek ve çok kanallı SPR sistemi üzerinde kantitatif olarak tespiti için spesifik antikorlar kullanılmıştır.

3.2 Literatür Özeti

3.2.1 Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*

Stafilokoklar 0,5-1,5 µm çapına sahip Gram-pozitif bakterilerdir [110]. Üzüm salkımına benzer kümeler oluştururlar. Şimdiye kadar, 32 tür ve 8 alt tür belirlenmiştir. Bunların birçoğu insan vücudunda kolonize olmuştur [111]. Bunlardan en yaygın olanı *Staphylococcus aureus*'tur [112]. İlk olarak 1884 yılında Anton Rosenbach tarafından keşfedilmiştir, fakat kökeni bilinmemektedir [113]. NaCl'nin yüksek konsantrasyonuna ve kurutma gibi birçok olumsuz şartlara dayanıklıdır [114]. *S. aureus* yaklaşık olarak 2.800 baz çiftine sahip dairesel bir kromozom içeren bir genoma sahiptir ve ayrıca profaj, plazmid ve transpozon içerir

[115]. *S. aureus* insanlarda bulunan en yaygın bakterilerden biridir. *S. aureus* doğal olarak burun ve deri mikroflorasında bulunmaktadır [116]. Ancak vücut üzerinden açık bir yarayı kontamine ettiği zaman enfeksiyona neden olabilmektedir. *S. aureus* çoğu enfeksiyondan sorumlu olan önemli bir insan patojenidir [117]. Yetişkinlerin %50'sinin *S. aureus* taşıyıcısı olduğu tahmin edilmektedir [118]. *S. aureus* nozokomiyal pnömoninin yanı sıra deri enfeksiyonu [119] [120] [121] ve kan dolaşımı enfeksiyonuna [122, 123] neden olan başlıca etkenler arasında sıralanmaktadır.

S. aureus, yüzeysel cilt ve yumuşak doku, kas ve iskelet sistemi, solunum sistemi, dolaşım sistemi, genitoüriner sistem, santral sinir sistemi enfeksiyonlarına, sepsise ve ölüme neden olan önemli bir bakteridir. [124]. *S. aureus*'un bu geniş hastalık spektrumuna sahip olmasında rol oynayan viruans faktörleri mevcuttur. *S. aureus*'un virulans faktörleri hücresel bileşenler (kapsül, protein A, peptidoglikan, teikoik asit vb.) ve hücre dışı üretilen proteinlerine (alfa toksin, beta toksin, gama toksin gibi enterotoksinler ve koagülaz, β -laktamaz, proteaz, katalaz, lizozim gibi enzimler) bağlıdır [125]. Sanayileşmiş dünyada, *S. aureus* bakteriyemisinin (SAB) nüfus insidansı her 100.000 kişi için yılda 10 ila 30 arasında değişmektedir. Toplam SAB oranları son 20 yılda stabil olmuş olsa da, metisiline dirençli *S. aureus*'un katkısı ile bu oran dalgalanmıştır [126]. Dünya çapında *S. aureus* enfeksiyonlarının %13-74'ünün metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) olduğunu göstermektedir [127]. MRSA uzun süredir sağlık ortamlarıyla ilişkili bir patojen olarak bilinmektedir [128]. MRSA ilk olarak Birleşik Krallık'ta 1960'ların başında bildirilmiştir. MRSA doğal seçim sürecinde mevcut tüm penisilinler ve diğer β -laktam antimikrobiyal ilaçlara direnç geliştiren *S. aureus* suşlarıdır [129, 130].

S. aureus'ta *mecA* geninin kodladığı bir PBP'nin (PBP2a/PBP2) yol açtığı metisilin direnci, diğer tüm β -laktamlarda da dirence yol açması nedeniyle hasta tedavisinde büyük sorun oluşturmaktadır [97]. β -laktam grubu antibiyotiklerin tedavide kullanılması durumunda penisiline düşük affinite gösteren bu protein MRSA suşlarının antibiyotik varlığında gelişmesine izin vermektedir [131].

Metisilin direncinin genetik belirleyicisi (*mecA* geni), stafilokokal kaset kromozomunda (SCC*mec*) bulunmaktadır. *mecA* geni, PBP2a olarak bilinen ve β -

laktamlar için düşük afiniteye sahip modifiye bir penisilin bağlama proteini (PBP) kodlamaktadır [132]. SCCmec yapısal organizasyonu ve genetik içerik, MRSA izolatları arasında kapsamlı varyasyon göstermektedir. Aksine, *mecA* geninin dizilimi ise oldukça korunmuştur [133].

Birleşik Krallık, Danimarka ve İrlanda'da MRSA izolatlarında 2011 yılında yeni bir *mecA* homologu tanımlanmıştır [134, 135]. Bu yeni varyant, *mecA* ile %70 özdeşliğe sahiptir ve başlangıçta *mecA*_{LGA251} olarak adlandırılmıştır ve daha sonra *mecC* olarak yeniden adlandırılmıştır [136]. *mecC* geni PBP2a ile aminoasit seviyesinde %63 özdeşliğe sahip bir PBP'yi (PBP2c) kodlamaktadır [133]. Bununla birlikte, *mecC* geninin *S. aureus*'ta sebep olduğu β -laktam direncinin moleküler kanıtı hala eksiktir [97]. *mecC* geni, DNA seviyesinde *mecA* ile %70 benzerlik taşımaktadır. PBP2c'nin, PBP2a'nın aksine, ısıya duyarlı olduğu ve etkinliğinin 37 °C'de düştüğü bulunmuştur. Dahası, PBP2c'nin, oksasilin antibiyotigine PBP2a'ya kıyasla 4 kat daha yüksek bir bağlanma afinitesi sergilediği belirtilmiştir [97, 133].

Antimikrobiyal direnç önemli bir küresel sağlık sorunudur ve Gram-pozitif bakterilerden ilaca dirençli *S. aureus* ciddi bir tehdittir [137, 138]. *S. aureus*'tan kaynaklanan enfeksiyonel hastalıkların tedavisinde kullanılan neredeyse bütün antibiyotiklere bu bakteri direnç geliştirmiştir. İlk olarak sülfonamid grubu antibiyotiklere karşı direnç geliştirmiştir. Daha sonra penisilin, metisilin, teikoplanin direnci ile devam etmiştir. Günümüzde ise linezolid, vankomisin ve daptomisine karşı da direnç geliştirdiği belirlenmiştir [139, 140].

Metisiline dirençli suşlar yüksek oranda morbidite ve mortalite göstermektedirler. MRSA yaygın antibiyotiklere direnç göstermektedir, ancak sıklıkla vankomisin ile başarılı bir şekilde tedavi edilmektedir. Bununla birlikte, bazı MRSA hastalarında vankomisin daha az etkilidir. Hatta 2002 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde vankomisin dirençli *S. aureus* ortaya çıkmıştır [141]. Tedavideki sınırlılıklar göz önüne alındığında MRSA'nın tedavisi için alternatif ajanların tanımlanmasına ihtiyaç vardır. Etkili tedaviye kadar geçen süre büyük oranda patojen tanımlamasına bağlıdır [137]. Tanıyı koymada ve tedavi etmede gecikmeler daha kötü klinik sonuçlara yol açmaktadır.

3.2.1.1 MRSA'nın Antibiyotik Direnci

Penisilinin 1940'ların ortalarında kullanılmasının ardından, *S. aureus*'un penisiline dirençli suşları bildirilmiş ve bunu penisiline dirençli *S. aureus* salgını izlemiştir. Başlangıçta sadece hastanelerde yaygın olmasına rağmen, penisilin direnci toplum izolatlarının %90'ından fazlasında mevcut olduğu belirlenmiştir. Bu suşlar, penisilin β -laktam halkasını bozan plazmid kodlu bir penisilinaz üretmektedirler. Penisilinaz enzimine kararlı bir β -laktam olan metisilin, 1950'lerin sonlarında tanıtılmıştır. Bununla birlikte, metisiline direnç raporları hızla ortaya çıkmıştır. Metisiline karşı direnç mekanizması, β -laktam antibiyotiklerin tüm üyelerine karşı geniş bir direnç sağlayan *mecA* geni tarafından kodlanan değiştirilmiş ve düşük afiniteli bir penisilin bağlayıcı protein (PBP2a) içermektedir. *mecA* geni, mobil genetik eleman stafilokok kromozom kaseti (SCC) üzerinde, tüm kompleks SCC*mec* elemanı olarak adlandırılmaktadır. Antimikrobiyal direnç elemanlarının boyutu ve bileşimi bakımından farklılık gösteren 11 tanımlanmış SCC*mec* varyantı (tip I-XI) vardır. Tipik olarak, çoklu dirençli nozokomiyal MRSA suşları, daha büyük olan ve çoklu direnç belirleyicileri içeren SCC*mec*II ve SCC*mec*III'i barındırmaktadır [121].

3.2.1.2 *S. aureus*'un Neden Olduğu Enfeksiyonlarda Kullanılan Antibiyotikler

Antimikrobiyal ajanlar genellikle hücre duvarı sentezine (β -laktamlar ve glikopeptid ajanları) müdahale eden, protein sentezinin (makrolidler ve tetrasiklinler) inhibisyonu, nükleik asit sentezine (florokinolonlar ve rifampin) müdahale, bir metabolik yolun (trimetoprim-sülfametoksazol) inhibisyonu ve bakteriyel membran yapısının (polimiksinler ve daptomisin) bozulmasını içeren temel etki mekanizması dikkate alınarak sınıflandırılmaktadır [101, 124, 142].

- Hücre duvarına etki eden antibiyotikler:

Beta-laktam antibiyotikler

β -laktam ajanlarının birincil hedefleri penisilin bağlayıcı proteinler (PBP)'lerdir. β -laktam halkasının, peptit zincirinin normalde PBP ile bağlı olan D-alanil D-alanin kısmını taklit ettiği varsayılmıştır. PBP, β -laktam halkası ile etkileşime girmekte ve

yeni peptidoglikan sentezini engellemektedir. Peptidoglikan tabakasının bozulması ise bakterinin lizisine yol açmaktadır.

Glikopeptitler

Glikopeptidler, öncü peptidoglikan alt biriminin peptit yan zincirinin D-alanil D-alanin kısmına bağlanmaktadır. Büyük ilaç molekülü vankomisin, bu D-alanil alt biriminin PBP ile bağlanmasını önlemekte ve böylece hücre duvarı sentezini inhibe etmektedir.

- Protein sentez inhibitörleri

İlk olarak bakteriyel DNA'daki bilgi, transkripsiyon olarak adlandırılan bir işlem ile transkripsiyon RNA (mRNA)'yı sentezlemek için kullanılmaktadır. Daha sonra ribozom adı verilen makromoleküler yapı, translasyon adı verilen bir süreç olan mRNA'da bulunan proteinleri sentezlemektedir. Protein biyosentezi ribozomlar ve sitoplazmik faktörler tarafından katalize edilmektedir. Bakteriyel 70S ribozom, iki ribonükleoprotein alt biriminden, 30S ve 50S alt birimlerinden oluşmaktadır. Antimikrobiyaller, bakteriyel ribozomun 30S veya 50S alt birimini hedefleyerek protein biyosentezini inhibe etmektedir. Bu antibiyotikler aminoglikozidler, makrolidler, oksazolidinonlar, streptograminler, linkozamidler, ve kloramfenikollardır.

- DNA replikasyon inhibitörleri

Sülfonomidler ve trimethoprim, kinolonlar, rifampisin bakteriyel DNA'nın replikasyonunu inhibe eden ajanlardır.

- Hücre zarı inhibitörleri

Daptomisin bakteriyel hücre zarına etki ederek inhibe etmektedir.

3.2.1.3 Metisilin Direncinin Gelişimini Etkileyen Faktörler

- **Test Edilen Ajan**

MRSA ile metisilin ve diğer β -laktam ajanları arasında çapraz direnç vardır. Direnç en çok metisilin veya oksasilin ile yapılan testlerde tespit edilmektedir ve bu ajanlardan herhangi biriyle yapılan testler tüm β -laktam ajanlarının temsilcisi olarak alınmalıdır [143].

- **Kültür Ortamı**

Mueller-Hinton ve Columbia agarları, duyarlı suşlar ve MRSA arasında IsoSensitest ve DST agarlardan daha iyi seçicilik sağlamaktadır. Farklı üreticilerin Mueller-Hinton ortamının performansında ve tek bir üreticinin farklı Mueller-Hinton ortam grupları arasındaki farklılıklar rapor edilmiştir. Farklı üreticilerin Columbia agar grupları arasındaki olası farklılıklar henüz araştırılmamıştır. Mueller-Hinton broth dışındaki ortamlarla ilgili raporlar nadir olduğundan, farklı sıvı ortamların performansı hakkında çok az veri bulunmaktadır [143].

- **NaCl Konsantrasyonu**

Yaygın olarak MRSA için test ortamına %5'e kadar NaCl eklenmektedir. Ancak NaCl konsantrasyonun etkisi, bazal ortama, inkübasyon sıcaklığına, aşıya ve test formatına bağlıdır. Mueller-Hinton, Columbia ve DST ortamlarına NaCl ilavesi metisilin direncinin saptanmasını geliştirmektedir [143].

- **İnokülasyon**

Direnç ekspresyonu için diğer koşullar uygunsa, inokülasyonu arttırmanın çok az etkisi olabilmektedir. Daha yüksek NaCl konsantrasyonları ile birlikte yüksek bir inokülasyon, dirençli ve duyarlı popülasyonlar arasındaki seçiciliği zorlaştırmakta ve seyreltme yöntemlerindeki duyarlı suşlar için MİK uç noktalarının okunması çok zor olabilmektedir. Özellikle oksasilin ile yapılan disk difüzyon testlerinde, daha yüksek bir NaCl konsantrasyonu ile birlikte daha yüksek oranda inokülasyon yapılması, yanlış sayıda dirençli rapor sayısının artmasına neden olabilmektedir [143].

- **İnkübasyon Koşulları**

Testlerin inkübasyon sıcaklığının azaltılması genellikle direnç tespiti geliştirmekte ve 30 °C'de inkübasyon, duyarlı ve dirençli popülasyonların 35 °C'de inkübasyondan daha iyi ayırt edilmesini sağlamaktadır. Bazı suşlarda, dirençli alt popülasyonlar yavaş büyümekte ve inkübasyon 48 saate uzatılarak direnç tespiti geliştirilebilmektedir. Ancak yine de bu durum diğer test koşullarına da bağlıdır [143].

3.2.1.4 Metisilin Direncinin Tespitinde Kullanılan Yöntemler

MRSA, halk sağlığı ve hayvan sağlığı konularında giderek artan bir endişe kaynağıdır ve bu nedenle MRSA'nın tanımlanması için etkili ve güvenilir yöntemlerin sağlanması önemlidir [144]. Ayrıca MRSA'nın tespiti zordur ve birçok faktör nedeniyle karmaşık hale gelmiştir. *S. aureus*'ta metisiline direnç, izolatların çoğunda heterojendir. Heterojen suşlar iki bakteri popülasyonundan oluşmaktadır; biri nispeten duyarlı, diğeri oldukça dirençli bir nüfustur. Çoğu MRSA izolatlarının tespiti için, agar difüzyon, E-test, kromojenik besiyeri, lateks aglütinasyon, disk difüzyon, minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi, agar tarama yöntemi gibi fenotipik yöntemler ve VITEK, Phoenix, ve Microscan gibi otomatize duyarlılık sistemler kullanılmaktadır [125][134, 145-147]. MRSA için geleneksel kültür ve duyarlılık testlerini tamamlamak için 16 ila 24 saatlik bir inkübasyon ve 16 ila 24 saatlik bir süre de dahil olmak üzere 48 ila 72 saat arasında sürmektedir [146]. MRSA'nın saptanmasında kullanılan geleneksel yöntemler kullanım kolaylığı ve düşük maliyetinden dolayı daha çok tercih edilmektedir. Antimikrobiyal testleri doğrulamak amacıyla *mecA* geninin saptanmasında PCR [148] [149], PBP2a proteinin saptanmasında ise "slide agglutination testi" kullanılabilmektedir [147] [144]. Moleküler yöntemlerde, metisilin direnci için *mecA*'nın saptanması ile, nükleaz (*nuc*), koagülaz (*coa*), protein A (*spa*), *femA* ve *femB*, *Sa442*, 16S rRNA fibrinojen bağlayıcı protein genleri gibi türe özgü genlerin araştırılmasıyla elde edilebilmektedir [150]. Metisilin direnci SCC*mec* genindeki klonal varyantlarla da ilişkilendirilmiştir [151]. MRSA'nın saptanması için geleneksel yöntemler arasında oksasilin disk difüzyonu, oksasilin MİK ve oksasilin screen agar yöntemleri de bulunmaktadır. Son zamanlarda, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü, MRSA tespiti için sefoksitin disk difüzyon yönteminin kullanılmasını önermektedir. Sefoksitin, sefamisin tipi bir antibiyotiktir ve PBP2a kodlayan *mecA* geninin bir indükleyicisi olarak tarif edilmiştir [152].

Test edilen ajan, kültür ortamı, NaCl konsantrasyonu, inokülasyon ve inkübasyon koşulları geleneksel yöntemlerde metisilin direncinin gelişimini etkileyen faktörlerdir [143]. Bu faktörlerden dolayı, rutin tanı laboratuvarları MRSA'nın tespiti için hassas, hızlı, basit ve doğru bir yönteme ihtiyaç duymaktadır [153].

Pahalı moleküler teknikler oldukça hassas ve hızlı sonuçlar sunarken, kültürel yöntemler daha uzun bir zaman gerektirmektedir. Ancak daha düşük bir fiyat için karşılaştırılabilir bir hassasiyet sağlayabilmektedir [154].

3.2.1.5 MRSA'nın Epidemiyolojisi

MRSA kaynaklı hastane enfeksiyonları, son 20 yıl boyunca dünya çapında önemli bir sorun haline gelmiştir. Bunlar başlıca hastanelerde ve hastaneler arasında yayılma özelliğine sahip klonlar (HA-MRSA/Healthcare-acquired methicillin-resistant *S. aureus*) ile ilişkilendirilmiştir. Ancak 1990'ların sonuna gelindiğinde, MRSA suşlarının hastanelerden bağımsız olarak toplumda paralel olarak ortaya çıktığı belirlenmiştir. Toplumla ilişkili MRSA (CA-MRSA/Community-associated methicillin-resistant *S. aureus*) açık bir şekilde HA-MRSA'dan ayrı olarak ortaya çıkmıştır ve bunların çoğunluğu HA-MRSA'dan farklı klonları temsil etmiştir. Hayvanlarda, özellikle hayvancılıkta 2005 yılında MRSA'nın ortaya çıkışı dikkat çekmiştir (LA-MRSA/Livestock-associated methicillin-resistant *S. aureus*) [120, 155]. Ancak bunlar arasından hastane kaynaklı klonal MRSA suşları (HA-MRSA) hastanede yatan hastalarda morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenidir. Bu durum, klinik mikrobiyoloji laboratuvarına, hastanın enfeksiyonundan sorumlu etkeni hızla tanımlama ve mikroorganizmaların inhibe edilmesi için etkili bir tedavi rehberi sunmak açısından çok büyük bir yük meydana getirmiştir [138].

- **Hastane Kaynaklı/İlişkili MRSA (HA-MRSA)**

İlk vaka 1961'de İngiltere'de bildirildiğinden, MRSA'nın sağlıkla ilişkili (HA) MRSA olarak bilinen nozokomiyal ortamlara maruz kalan hastalarda çeşitli enfeksiyonlarla ilişkili olduğu kabul edilmiştir [156]. HA-MRSA, hastanede yatan hastalarda cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, kan dolaşımı enfeksiyonu ve pnömoni dahil olmak üzere ciddi, invaziv hastalıklarla ilişkilidir. HA-MRSA suşları çoklu ilaç direncine sahip olma ve SCCmec tip II taşıma eğilimindedir. HA-MRSA, 1960'lardan beri hastane ortamlarında endişe kaynağı olmuştur. O zamandan beri, hastane kaynaklı *S. aureus* enfeksiyonlarında antimikrobiyal direnç prevalansı giderek artmıştır. HA-MRSA enfeksiyonunun risk faktörleri arasında antibiyotik kullanımı, uzun süreli hastaneye yatış, yoğun bakım, hemodiyaliz, MRSA kolonizasyonu veya enfeksiyonu olan bireylere yakınlık yer almaktadır [157].

- **Topluluk Tarafından Edinilmiş/İlişkilendirilmiş MRSA (CA-MRSA)**

Toplumla ilişkili (CA) MRSA'nın ortaya çıkışı, MRSA izolatlarının epidemiyolojisinde önemli bir değişikliğe yol açmıştır. Topluluk ortamlarında CA-MRSA'nın neden olduğu artan enfeksiyon sayısı dünya çapında bilim insanlarının dikkatini çekmiştir. Her ne kadar CA-MRSA klinik olarak hastanede yatma ve HA-MRSA enfeksiyonları için risk faktörlerinin yokluğu ile tanımlansa da benzersiz ilaç direnci paternleri ve moleküler özelliklerine sahip olarak HA-MRSA'dan da ayırt edilmiştir. CA-MRSA SCC_{mec} IV veya V8 taşımaktadır. β -laktam antimikrobiyal ilaçlara direnç göstermesine rağmen, CA-MRSA geleneksel olarak HA-MRSA'dan daha az antibiyotik kategorisine dirençli kalmaktadır. Ek olarak, çoğu CA-MRSA izolatı, *lukSF-PV* genlerinin varlığı ile klinik sonuç arasındaki korelasyon tartışmalı olmasına rağmen, iki bileşenli bir toksin sitolitisini nötrofillere kodlayan *lukSF-PV* (Panton-Valentine lökositidin-PVL) genlerini taşımaktadır [156]. Yani tipik olarak bazı metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) suşlarına benzerler, daha geniş bir yelpazede antistafilokok antibiyotiklerine duyarlı (bazıları sadece β -laktamlara dirençlidir) ve genellikle beyaz kanı yok eden bir toksin olan PVL üretmektedirler [158].

- **Hayvancılıkla İlişkili MRSA (LA-MRSA)**

İnsanlarda zoonotik hastalığa neden olabilen hayvancılıkla ilişkili metisiline-dirençli *S. aureus* (LA-MRSA) klonunun ortaya çıkması önemli bir halk sağlığı sorunu olmuştur [159]. MRSA dizi türü (ST) 398 domuzlardan insanlara, ancak nadiren kişiden kişiye yayılmıştır. Bu MRSA suşu, diğerlerinden daha az öldürücü olarak kabul edilmiştir. Hayvancılıkla ilişkili MRSA ST398'in (LA-MRSA ST398) özellikle domuz çiftçilerini kolonize ettiği bilinmektedir [160]. Domuzlar, bu MRSA soyunun rezervuarları olarak kabul edilmektedir. ST398 ile kolonizasyonun kümes hayvanlarında ve sığırlarda da rapor edildiği bildirilmiştir [161]. Domuzlarla yakın temasta olan işçiler, zoonotik potansiyelini destekleyen ve gıda güvenliği ile ilgili soruları gündeme getiren ST398 tarafından kolonizasyon açısından önemli risk altındadır [162].

3.2.1.6 MRSA'nın Tespitinde Kullanılan Biyosensörler

MRSA'nın hızlı ve doğru tanısı, hasta tedavisi, enfeksiyonun kontrolü ve epidemiyolojinin izlenmesi için hayati öneme sahiptir. MRSA'nın önemli bir belirteç proteini olan penisilin bağlayıcı proteinler (PBP2a), MRSA'nın toleranslı bakterileri için tarama testi hedefi olarak önerilmiştir. Bununla birlikte, PBP2a aktivitesine veya PBP2a immünoanalizlerine dayanan mevcut teknolojiler, yetersiz spesifiklik ve duyarlılıktadır. Fan, vd. [163] PBP2a'ya yüksek afinite ve seçiciliğe sahip DNA aptamerleri aracılığıyla MRSA izolatlarının tespiti için kolorimetrik biyosensör geliştirmiştir.

Çok farklı biyosensör sistemleri patojenlerin tespitinde kullanılmıştır. Nanofotonik interferometrik biyosensör, DNA aptamerleri kullanılarak immobilize edilmiştir ve daha sonra MRSA'nın tespitinde kullanılmıştır. Ayrıca yüzeyde bakterilerin spesifik olmayan bağlanmalarını önlemek için silane-PEG-COOH kullanılmıştır [164]. Lee, vd. [165] tarafından yapılan bir çalışmada *mecA* genini içeren hedef DNA çoğaltılmıştır ve PCR yerine nanogap elektrot tabanlı impedimetrik sensör kullanılarak MRSA'nın direkt tespiti sağlanabilmektedir.

Çoklu çapraz yer değiştirme (MCDA) amplifikasyonu MRSA'yı metisiline duyarlı *S. aureus*'tan ayırmaktadır. *nuc* genini (*S. aureus*'a özgü gen) ve *mecA* genini (penisilin bağlayıcı proteini-2a kodlayan) hedefleyen multipleks MCDA (m-MCDA), *S. aureus* suşlarını tespit edebilmekte ve 85 dk içinde MRSA'yı tanımlayabilmektedir. Wang, vd. [166] MRSA'nın tespiti için tek kullanımlık yanal akış biyosensörü geliştirmiştir.

Başka bir çalışmada biotin-streptavidin interaksyonundan yararlanılarak DNA tabanlı elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. Bu çalışmada da *mecA* geni hedef alınmıştır. Ancak DNA'nın amplifikasyonunda PCR metodu kullanılmıştır [167]. Elektrokimyasal biyosensör kullanılan başka bir çalışmada ise PCR metodu kullanılmadan MRSA'dan elde edilen DNA, nanopartiküller ile modifiye edilmiş probalar aracılığıyla hassas bir şekilde tespit edilebilmiştir [168].

Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP), alternatif bir analiz olarak, yüksek özgüllük, duyarlılık ve daha az zaman alan nükleik asit amplifikasyonu için bir tekniktir ve PCR gibi termal döngüye ihtiyaç duymamaktadır. Araştırmacılar, LAMP

aracılığıyla MRSA klinik izolatlarından elde edilen *mecA* geninin DNA fragmenti SPR biyosensöründe tespit edebilmiştir. Bu amaçla, yüzey streptavidin ile immobilize edilerek biyotinlenmiş DNA problemleri bağlanarak *mecA* geni tespit edilebilmiştir [169].

Biyotanınma elemanı analitin yakalanmasında önemli bir yere sahiptir. Litik fajın ligand olarak kullanıldığı bir çalışmada magnetoelastik biyosensör kullanılmıştır. Bu şekilde MRSA izolatları hassas bir şekilde tespit edilebilmiştir [170].

Genel olarak literatürde yapılmış olan çalışmalar incelendiğinde sensör türü farketmeksizin bir sistem tasarlandığında metisilin direncinin oluşmasına sebep olan *mecA* geninin tespiti için DNA problemleri kullanılmaktadır [171]. Ayrıca bu sistemlerde MRSA kültürleri olduğu gibi kullanılamamıştır. Bunu yerine DNA ekstraksiyonu yapılmıştır ve problemlerde tespiti gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.7 MRSA ve Gıda Güvenliği

Gıda kaynaklı hastalıklar dünya çapında bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bugüne kadar, çoğu bakteri, virüs ve parazitin neden olduğu 250'den fazla farklı gıda kaynaklı hastalık meydana gelmiştir [172]. *S. aureus* insan ve hayvanlarda meydana gelen hastalıkların en önemli nedenlerinden biridir. Gıda açısından durum değerlendirildiğinde, kontamine olmuş gıdada *S. aureus* salgılanan stafilokokal enterotoksinler gıda kaynaklı intoksikasyonlara sebep olabilmektedir. Gıdaların kontrolsüz depolama koşullarıyla birlikte uygun olmayan hazırlama prosesleri, *S. aureus*'un kontaminasyon riskini arttırmakla beraber, ısıya ve düşük pH'ya dayanıklı SE'lerin üretiminde artışa da sebep olabilmektedir [173]. *S. aureus* peynir, süt ve diğer süt ürünleri ile ilişkili gıda kaynaklı salgınların %10'undan fazlasından sorumludur [174].

Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA), sağlıkla ilişkili ciddi enfeksiyonların ana nedenidir [175]. MRSA, dünya çapında hastane (HA-MRSA) ve toplum kaynaklı (CA-MRSA) enfeksiyonlarından sorumlu patojen olarak bilinmektedir [176]. Ancak, son on yılda, MRSA'nın bir klonu CC398 (ST398) domuz ve çiftlik hayvanlarında (LA-MRSA) ortaya çıkmıştır [177]. LA-MRSA ilk defa Hollanda'da domuzlarda ve domuz üreticilerinde tanımlanmıştır [178]. Domuz, domuz yetiştiricileri ve aynı zamanda

kontamine et yoluyla tüketicileri enfekte edebilen LA-MRSA için rezervuar görevi görmektedir [179]. Bu suş hayvancılık üretimini etkilememesine rağmen, insanlarda kolonize olabilmektedir ve ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedir [180-183]. Ek olarak, enfekte veya kolonize olmuş hayvan patojeninin personeli kontamine etmesine ve daha sonra gıda zincirine bulaşmasına sebep olmaktadır [13]. LA-MRSA klonları hayvanlarla doğrudan temasta bulunmamış kişilerde izole edilmesi ise bakterinin bulaşmasında ek olarak çevreden insana ve insandan insana taşıma gibi diğer iletim yollarının da varlığını düşündürmektedir [184]. LA-MRSA hayvan üretim ortamında havayla taşınarak gıda olarak tüketilen hayvan üretim zincirinde çalışan görevliler tarafından solunabilmektedir ve tozda bulunması sebebiyle gıdayı kontamine edebilmektedir [179, 185].

MRSA dünya çapında klinik olarak sorun oluşturmaktadır. Antimikrobiyal tedavi için veya büyümeyi teşvik etmek için uygun olmayan antibiyotik kullanımının bir sonucu olarak antimikrobiyal dirençli bakterilerin ortaya çıkması, gıda zincirinde kullanılan hayvanları ve ilişkili gıda maddelerini kontamine ederek gıda zinciri sektörlerini etkilemektedir [186].

İlk çalışmalarda, MRSA'nın antimikrobiyal direnci ve genetik geçmişinin spesifik konakçılara göre farklı olduğu düşünülmüştür. Ancak, farklı kaynaklardan elde edilen MRSA'nın düşük konakçı spesifisitesine ve benzer genomik diziye sahip olduğu tespit edildiğinde bu bakış açısı değişmiştir. Bu nedenle, bu MRSA'nın hayvandan insana ve insandan hayvana bulaşabileceğini düşündürmüştür [187, 188]. Çeşitli çalışmalar LA-MRSA'nın insanlardan kaynaklandığını ancak zamanla HA-MRSA ve CA-MRSA için bir marker olan PVL, toksik şok sendromu toksin 1 ve eksfoliyatif toksinlerini üretme yeteneklerini kaybettiğini belirtmektedir [189]. Ayrıca *mecA* ve *tetM* gibi antibiyotiğe direnç genlerinin çiftlik hayvanlarında adapte olduğu bildirilmektedir [190]. Ayrıca, çeşitli araştırmalar hayvanlarla temas eden kişilerin LA-MRSA ile kolonize olma riskinin daha yüksek olduğunu göstermektedir [191]. Bununla birlikte, kolonizasyonun hayvan teması sıklığına ve yoğunluğuna ve maruz kalma süresine bağlı olduğu düşünülmektedir [192].

MRSA mastitisli ineklerden 1972 yılında ilk defa izole edilmiştir [193]. Hayvanlar, MRSA tarihinin çoğunda önemli bir rol oynamışlardır. O zamanlar mevcut olan

biyotip yöntemlerine dayanarak bu ilk izolatların insan kaynaklı olduğu sonucuna varılmıştır [194]. Daha sonra MRSA problemi büyümüşür ve Hollanda'da domuz yetiştiriciliği ile ilişkili olduğu tespit edilen MRSA ortaya çıkmıştır [178]. Bir bölgeden başka bir bölgeye gelen bir domuz çiftçisi ve domuzlarla çalışan bir veteriner, veteriner hekimin oğlu ve çocuğu tedavi eden bir hemşirenin ilgili MRSA suşu ile kolonize olduğu tespit edildiğinde, domuz yetiştiriciliğinin insanlarda MRSA taşınması için önemli bir risk oluşturabileceği sonucuna varılmıştır [178]. Daha sonra yayınlanan raporlarda, MRSA'nın sadece domuzlar arasında yaygın olmadığı aynı zamanda dana, tavuk, at, köpek ve sıçanlar gibi hayvan türlerinde de kolonize olduğu [195-198] [199], hayvanlar [200] ve insanlarda [201, 202] hastalığa neden olabileceği belirlenmiştir.

MRSA, sağlıklı ve mastitisli süt hayvanlarının sütünden izole edilmiştir [203, 204]. Bu konu ile ilgili yapılan bir çalışmada test edilen süt, süt ürünleri, insan ve hayvanlardan alınan burun sürüntü örneklerinin %99,6'sı en az bir antibiyotiğe dirençli ve %13,3'ünün ise çoklu ilaç direncine sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Örneklerin toplam %3'ünün de *mecA* genini taşıyan MRSA ile kontamine olduğu belirlenmiştir. MRSA çiftlik çalışanlarının %2,4'ünde, süt endüstrisinde çalışanların ise %6,5'inde tespit edilmiştir [205]. Başka bir çalışmada, çiğ sütlerde MRSA'nın izolasyonu, *mecA* ve *mecC* gen varlığı ve antibiyotik direnç profilini belirlemek için farklı süt sığırlarından 63 süt örneği ve 32 burun sürüntü örneği alınmıştır. Örneklerin %17,89 ve % 15,79'unda sırasıyla *mecA* ve *mecC* genleri için pozitif bulunmuştur. *mecC* pozitif izolatlardan 12'si hem *mecA* hem de *mecC* için pozitif olarak tespit edilmiştir [206]. Yapılan diğer çalışmalarda, çiğ süt ve süt ürünlerinden izole edilen üç MRSA suşunun (%1,2) enterotoksijenik olduğu [207] ve süt tanklarından izole edilen iki adet MRSA'nın (% 1,33) çoklu stafilokokal enterotoksin ürettiği tespit edilmiştir [208]. Özellikle pastörize ve pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinde MRSA'nın tespit edilmesi halk sağlığı için tehdit oluşturmaktadır. MRSA'nın süt ve süt ürünlerinde varlığını kontrol etmek için sağlıklı hayvanların kullanılması gerekmektedir. Ayrıca peynir üretiminde çiğ sütün kullanılmasından kaçınılmalıdır [209]. Çiğ süt ve bazı süt ürünlerinde MRSA'nın yaygınlığı belirlemek için yapılan bir çalışmada, çiğ süt ve süt ürünlerinde koagülaz pozitif olarak belirlenen *S. aureus* izolatlarından 5 tanesi *mecA* geni pozitif bulunmuştur [210].

Türkiye’de tulum peynirleri üzerine yapılan çalışmada da çoklu ilaç direncine sahip MRSA izolatları tespit edilmiştir [211]. Süt ürünlerinde çoklu ilaç direncine sahip *S. aureus*’un ve özellikle MRSA’nın varlığı, bu patojenin toplumda yayılması için potansiyel bir tehdit oluşturmaktadır. İnsan, hayvan ve çevre kaynaklarının süt ürünlerinin üretim zincirleri boyunca kontaminasyonuna karışabileceğini ve bu nedenle toplumda MRSA dağılımını kontrol etmek için kontaminasyon kaynaklarının daha fazla araştırılması gerektiğini göstermektedir.

Besi hindi ve besi hindi barındıran çiftliklerde yaşayan insanların LA-MRSA taşıma olasılığı da yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Yapılan bir çalışmada, hindi sürüsü ve çiftlik çalışanları incelenmiştir. İncelenen 20 sürünün 18’i (%90) ve çiftliklerin 12’sinde örneklenen 59 kişiden 22’si (%37,3) MRSA için pozitif olarak tespit edilmiştir [212]. Hindi sürüsü ve çalışanlarında MRSA’nın tespit edilmesi hayvanların işlenme prosesi sırasında kontaminasyonun meydana geleceğini açıkça göstermektedir. Yapılan bir çalışma perakende satılan hindi etlerinde MRSA’nın varlığı açıklanmıştır [196]. Perakende olarak satılan çiğ etlerde MRSA’nın varlığını ve dağılımı belirlemek için İngiltere’de bir çalışma yapılmıştır. Toplanan örneklerde MRSA’nın kökeni belirlendikten sonra stafilokokal gıda zehirlenmesine neden olan enterotoksin gen varlığı ve antibiyotik direnci belirlenmiştir. LA-MRSA’nın gıda zincirindeki varlığı doğrulanmıştır [213]. Bir çalışmada, MRSA’nın varlığı ve izolasyonu için 3.520 perakende et, Amerika’nın sekiz eyaletinden toplanmıştır. MRSA prevelansının en yüksek çıktığı ürün grubu hindi olurken bunu sırasıyla domuz eti, sığır bifteği ve tavuk izlemiştir [214]. Almanya’da yapılan bir çalışmada ise çiftlikten izole edilen MRSA izolatlarının gıda zincirinin sonraki tüm aşamalarında kontaminasyon meydana getirebileceği elde edilen sonuçlara göre belirtilmiştir [215].

Gıda olarak tüketilen hayvanların PVL-pozitif çoklu ilaç direncine sahip *S. aureus* ve MRSA’nın çiftlikten çalışanlara taşınmasında bir araç olduğu yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir. Nijerya’da yapılan bir çalışmada, tavuk karkaslarının %64,3’ünde çoklu ilaç direncine sahip *S. aureus* tespit edilmiştir [216]. Yine aynı çalışmada toplam 53 adet *S. aureus* izolatından, 19’unun PVL pozitif ve 12’sinin *mecA* genini taşıdığı sonucuna varılmıştır.

Gıdaların antimikrobiyal dirençli *S.aureus* varyantlarının iletiminde birer araç olduğunun önemi Danimarka'da yapılan bir çalışmada da belirtilmiştir. Bu amaçla, çiğ tavuk, hindi, domuz, suşi ve makarnadan izole edilen toplam 88 adet *S. aureus* izolatına biyoinformatik analizler yapılmıştır ve 31 izolatta CC398 dominant klon olarak bulunmuştur. Ayrıca izolatların %39,8'inin çoklu direnç genlerine sahip olduğu tespit edilmiştir [217].

İtalya'da ve İngiltere'de yapılan çalışmalarda çiğ olarak satılan sığır, domuz eti, tavuk ve at eti örneklerinde MRSA pozitif olarak bulunmuştur. Bu etlerde MRSA'nın varlığı, bu bakteri ile kolonize olmuş gıda çalışanları nedeniyle insan kontaminasyonu veya gıda işleme sırasında karkasların çapraz kontaminasyonun meydana geldiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, bu araştırmada tespit edilen MRSA klonları toplum enfeksiyonlarından sorumlu olduğu, ve gıdaların MRSA'nın çevreye yayılmasına katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir [191, 218].

İnsanlar ve domuzlar arasındaki doğrudan temas, MRSA CC398 (ST398) tarafından kolonizasyon ve enfeksiyon için bir risk faktörü olarak kabul edilmiştir. Portekiz'de yapılan bir çalışmada domuz karkaslarında %20 oranında MRSA izole edilmiştir [14]. MRSA domuzda kolonize olmakla beraber aynı zamanda bu hayvanlarda fırsatçı bir patojendir ve halk sağlığı üzerindeki etkisi nedeniyle üreticiler ve kesimhaneler düzeyinde kontrol edilmelidir.

Gıda olarak tüketilen hayvanlarda MRSA varlığı ve perakende et örneklerinde saptanması, MRSA'nın potansiyel gıda kaynaklı bulaşma endişesini arttırmaktadır. Bir çalışmada, oral enfeksiyonu takiben MRSA suşlarının olası yollarını incelemek ve kaynaklarının ve iletiminin sonuçlarını anlamak için oral yoldan alınan örnekler için bir fare modeli kullanılmıştır [172]. Sonuç olarak farelerin iç organlarında MRSA'nın kolonize olduğu ve ayrıca dışkıları aracılığıyla da MRSA'nın çevreye bulaşabileceği tespit edilmiştir. Bu nedenle hayvancılıktan hayvansal ürünlerin tüketimine kadar, gıda zincirinin tüm aşamalarında iyi hijyen ve üretim uygulamaları, hayvan yeminden bakteriyel kontaminasyonun ortadan kaldırılmasında ve daha sonra enfeksiyonlarının ve antimikrobiyal dirençli bakterilerin dağılmasının önlenmesinde çok değerlidir.

MRSA CC398, esas olarak domuzdan tespit edilen hayvancılıkla ilişkili (LA) bir suştur [183]. Her ne kadar, et, süt, tavuk ve benzeri gıdalarda tespit edilebilmesine rağmen, domuzun LA-MRSA'nın rezervuarı olarak bildirilmesi nedeniyle herhangi bir gıdada bu türün tespit edilmesi müslüman toplumlar tarafından gıdanın helal olup olmaması konusunda tartışmaya yol açması beklenmektedir. Çünkü bu durum gıdanın hazırlama prosesinin herhangi bir aşamasında domuzdan kaynaklanan bir bulaşının meydana gelme ihtimalini düşündürmektedir.

Antimikrobiyal direnç yirmi birinci yüzyılın en büyük sorunlarından biridir. Küresel olarak bu sorunun ele alınması insanlar, hayvanlar ve çevre açısından uyumlu bir ortam oluşmasını sağlayacaktır. Antibiyotik dirençli bakterilere bağlı gıda kaynaklı salgınlara ilişkin mevcut veriler, esas olarak izole edilmiş bakterilerin rutin olarak antimikrobiyal duyarlılık testine tabi olmamaları nedeniyle genellikle yetersizdir ve testler yapılsa bile, sonuçların yetkili sağlık otoritelerine bildirilmesi zorunlu değildir [219]. Antimikrobiyal maddelere dirençli patojenlerin neden olduğu gıda kaynaklı hastalıkların büyük çoğunluğu, hayvansal kökenli veya çok bileşenli kontamine gıdalarının tüketilmesinin sonucu meydana gelmektedir. Bunun güçlü kanıtı, hayvancılıkta antimikrobiyal madde kullanımının, antibiyotik dirençli, zoonotik, gıda kaynaklı bakterilerin ortaya çıkmasında ana etmen olması ve bu mikroorganizmaların hayvansal gıdaları kontamine etmesinin sonucu olarak insanlarda enfeksiyona neden olmasıdır [220]. Antimikrobiyal direnç ayrıca insanlarda artan virülans ile ilişkili gibi görünmektedir. Birçok epidemiyolojik çalışma, antimikrobiyal dirençli gıda kaynaklı patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların morbidite ve mortalitesinde artış olduğunu göstermektedir [221]. Örnek olarak antimikrobiyal maddelere dirençli bakterilerin kontamine olmuş bir gıda ile tüketimi bunların bağırsakta kolonize olmasıyla beraber bu dönemde uygulanan herhangi bir antibiyotik tedavisinin dirençli gıda kaynaklı patojenlerin bağırsak mikroflora üzerinde hakim olmasına neden olacağı için ciddi klinik hastalıkların gelişmesine neden olabilmektedir [222].

MRSA'nın gıda zinciri yoluyla yayılması bir gıda güvenliği sorunu olma ihtimalini göstermektedir. Bu nedenle hızlı MRSA tespiti ve kontrolü gıda güvenliği için gerekmektedir.

3.2.2 Vankomisine Dirençli Enterokoklar

Enterokoklar, insanların ve hayvanların bağırsaklarında doğal mikrobiyotanın bir parçası olarak yaşayan Gram-pozitif, fakültatif anaerobik bakterilerdir ve ayrıca hastanelerde onkoloji, hematoloji, nefroloji ve transplantasyon ünitelerinde bağışıklığı baskılanmış hastaları enfekte eden düşük patojeniteli bakteriler olarak da kabul edilmektedirler [223].

Enterokoklar gerek hastanelerde kullanılan çeşitli tıbbi malzemeler, gerekse sağlık personeli ile hastadan hastaya taşınarak hastane enfeksiyonu olarak salgınlara yol açabilmektedir. Glikopeptid yapıda antibiyotiklere (vankomisin ve teikoplanin gibi) direnç *vanA* ve *vanB* genlerini taşıyan *Enterococcus faecium* ve *E. faecalis* türlerinde görülmekte [224] ve bu türler VRE (Vankomisine dirençli enterokok) olarak adlandırılmaktadır. VRE, tüm *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarının yaklaşık %6'sını oluşturmaktadır [100]. En yaygın enterokok izolatları arasında *E. faecium*, *vanA* ve *vanB* aracılığıyla glikopeptidlere direncin rezervuarı olarak düşünülmektedir. *vanA* genine sahip dirençli enterokoklar direnç genlerini diğer enterokoklara ve Gram-pozitif bakterilere aktarabilmektedirler. Bu nedenle, vankomisine dirençli enterokokların izlenmesi glikopeptid direncinin yayılmasının önlenmesi için çok önemlidir [225]. VRE suşları ilk kez 1988'de bildirilmiştir. O zamandan beri teikoplanin ve/veya vankomisine dirençli suşlar tüm dünyada saptanmıştır. VRE'nin ampisilin ve aminoglikozidleri (yüksek düzey direnç dahil) içeren birden fazla antibiyotik için ek direnç oluşturduğu belirtilmektedir [226]. Enterokoklarda β -laktamlara ve aminoglikozidlere direncin yanı sıra artan glikoprotein direncinin varlığı sıklıkla bildirilmektedir. Enterokoklarda literatürde dört fenotipik glikopeptid direnci bildirilmiştir: vankomisin (Vm) ve teikoplana karşı direnci yüksek *vanA* fenotipi, sadece Vm'ye dirençli *vanB* fenotipi, Vm'ye karşı indüklenemeyen düşük seviyeli direnç gösteren *vanC* fenotipi ve *vanC* geni ile hiçbir homoloji paylaşmayan "*vanC* benzeri" direnç fenotipidir [227].

İyi huylu ve fırsatçı patojenler olarak kabul edilmelerine karşın, enterokok enfeksiyonları küresel olarak hastane ortamında bir klinik sorun olarak kabul edilirler ve enfektif endokardit, nozokomiyal enfeksiyonların yanı sıra yenidoğanlarda menenjit, merkezi sinir sistemi enfeksiyonları, osteomyelit, akciğer

enfeksiyonları ve erişkinlerde kateterle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları ve kaynağı bilinmeyen bakteriyemiye yol açabilmektedirler [228, 229].

Sınırlı tedavi seçenekleri nedeniyle [230], VRE'nin ortaya çıkması ve yayılması, halk sağlığı için tehdit oluşturmaktadır. VRE enfeksiyonlarının çoklu ilaç direncine yol açabilmeleri nedeniyle bu izolatların hızlı tanımlanmaları gerekmektedir [231]. Patojen mikroorganizmaların saptanmasında plak sayımı [232], PCR [233], ELISA [234], biyosensörler [79, 235, 236] ve biyoluminesans [237] gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Plak sayma, ELISA ve PCR gibi yöntemlerde, patojenleri pozitif olarak tanımlayabilmek için zenginleştirme yöntemlerine, izolasyon, morfolojik inceleme, biyokimyasal ve serolojik testlere gereksinim duyulabilmektedir.

Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının belirlenmesinde en yaygın kullanılan yöntemler, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ve sıvı mikrodilüsyon yönteminin çeşitleridir. Bu yöntemlerin esası antibiyotik etkisi altında bakteri üreme yeteneğinin saptanmasına dayanmaktadır. Bu nedenle test süresi test edilen bakterilerin çoğalma süreleri ile belirlenmektedir. Bu yöntemlerden sonuç alınması bir günden bir haftaya kadar uzamaktadır. İnkübasyon süresinin uzaması hastaya uygun bir tedavi sürecinin başlamasına da engel olmaktadır. Antimikrobiyal duyarlılık testlerinin ortaya çıkarmış oldukları dezavantajlar yeni, hızlı ve güvenilir yöntemlerin geliştirilmesi gerektiğini göstermiştir [238].

3.2.2.1 VRE ve Gıda Güvenliği

Enterokoklar, insanların ve hayvanların gastrointestinal sisteminin normal florasına ait bir grup bakteridir. Muhtemelen çevrenin, insan ve hayvan dışkısı ile kontamine olması nedeniyle sebze, bitki materyali, su ve gıdalardan izole edilmektedirler. Son zamanlarda, bağışıklık sistemleri baskılanmış olan hastalarda dünya çapında hastane enfeksiyonlarının ana nedeni olarak ortaya çıkmaktadırlar. Vankomisine dirençli enterokoklar (VRE) insanlardaki ana enfeksiyon kaynağı ve aktarılabılır vankomisine direnç genlerinin taşıyıcıları olarak bilinmektedir [239]

Antibiyotiğe dirençli enterokoklar için rezervuarlar tarif edilmiştir [240]. VRE için iki tür şüpheli kaynak vardır. Bunlar insan tedavisinde vankomisin kullanımından kaynaklanan klinik kaynaklar [226] ve hayvansal kaynaklı gıdalardır [241]. Gıda olarak tüketilen hayvanlarda bulunan enterokoklar hayvanlar için patojen değildir. Ancak hayvanların büyümesini teşvik etmek için avoparsin takviyeli yemlerin kullanılması [242], bu antibiyotiğin enterokoklarda vankomisin ve teikoplan adı verilen antibiyotiklere karşı direnç gelişimini desteklemektedir. Meydana gelen vankomisin dirençli suşlar hayvan için patojen olmayabilir ancak türler arası ve cins seviyelerinde vankomisine dirençli genler için rezervuar havuzu görevi görebilmektedir [243].

Enterokoklar, fırsatçı patojen olmaları nedeniyle çeşitli ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedirler. Çünkü antibiyotiğe dirençli enterokokların tedavisi sınırlıdır. Vankomisin, Gram-pozitif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda en son çare olarak kullanılan bir antibiyotiktir [244]. Eğer bakterinin ampisilin direnci varsa vankomisin ve linezolid kullanılarak enfeksiyon sınırlandırılabilir. Fakat bakteri yüksek oranda gentamisin, ampisilin ve vankomisine direnç gösteriyorsa enfeksiyon için başarılı bir tedavi imkansızdır [245].

Antibiyotik kullanımının kümes ve domuz çiftliklerinde büyümeyi arttırıcı olarak kullanılması sonucunda VRE'nin kolonizasyonunda artışa sebep olmuştur [246]. Bu artış VRE'nin hayvanlardan insanlara bulaşmasına neden olmuştur [247]. Hayvansal kökenli suşlar, hayvanlarla doğrudan temas yoluyla veya kontamine gıdalara maruz bırakılarak insanlara bulaşabilmektedir. Sanayileşmiş ülkelerde, kontamine hayvanlarla doğrudan temas yoluyla zoonotik bulaşma riski, genel insan nüfusunun küçük bir kısmını temsil eden çiftçiler, veterinerler ve mezbaha çalışanları ile sınırlıdır. Ancak gıda kaynaklı bulaşma, kontamine bir gıda maddesinin veya mutfakta çapraz kontamine olabilecek diğer gıda maddelerinin tüketimi ve işlenmesi yoluyla nüfusun daha büyük bir bölümünü etkileyebilmektedir [248].

Enterococcus faecium ve *E. faecalis* insan bağırsak sisteminde bulunan ve probiyotik olarak etki gösteren bakterilerdir. Fermente olmuş gıdalarda bu iki bakterinin varlığı ve probiyotik etkisi çeşitli araştırmalar ile çalışılmıştır [249, 250]. Probiyotik

olarak kabul edilen bazı enterokoklar hayvan ve insan bağırsak sisteminde antibiyotiklere karşı direnç kazanabilmektedir. Yapılan bir çalışmada hayvanlardan ve insanlardan toplanan feçes örneklerinde VRE varlığı araştırılmıştır. VRE'yi taşıma oranı insanlardan alınan örneklerde %9 olduğu belirlenmiştir [251].

VRE'nin gıdalardaki prevelansını belirlemek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Türkiye'de yapılan bir çalışmada çiğ süt, peynir, yoğurt, tereyağı, et ve et ürünlerinden toplanan 270 örnekte VRE varlığı araştırılmıştır. Toplam 12 adet VRE izole edilmiştir [252]. Malezya'da yapılan çalışmada ise, toplam 150 adet dondurulmuş biftek ve biftek ürünleri VRE açısından incelendiğinde 22 adet VRE izole edilmiştir [253]. İtalya'da yapılan bir çalışmada yine çiğ et ürünlerinde VRE tespit edilmiştir [254]. Kore'de yapılan çalışmada perakende çiğ etlerde ve balık ürünlerinde toplam 9 adet VRE izole edilmiştir [255]. Mastitisli inek sütü, tavuk kumu ve hindi kumlarından alınan örneklerden elde edilen verilere göre 30 adet çoklu ilaç direncine sahip *Enterococcus* spp. izole edilmiştir [256]. Ayrıca VRE'nin su kaynaklarından izole edilmesi epidemik bir salgın oluşumu riskine işaret edebilmektedir [257].

İlaça direnç transferi riskini en aza indirmek, gıda güvenliği ve halk sağlığını güvence altına almak için, et ve et ürünlerinde ve çiftliklerde bu tür patojenik bakterilerin varlığını tespit etmek için titiz bir tarama ve izleme programına ihtiyaç bulunmaktadır.

4.1 Giriş

Kanser, ekonomik olarak gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ölümlerin önemli bir nedenidir. Gelişmekte olan ülkelerin çoğunda kanser insidansı ve mortalite oranları artmaktadır. Türkiye ayrıca bireysel ve çevresel risk faktörleri nedeniyle kanser insidansında bir artışa sahiptir. Ayrıca, kayıt sistemindeki gelişme ve sağlık hizmetlerine erişimdeki artış kanser görülme oranında büyük rol oynamıştır [258].

Zaman kanser tedavisinde kritik bir parametredir. Hızlı tanı konulması devam eden bir metastatik sürecin erken tespit edilmesine ve aynı zamanda da kanser önleyici etkenlerin etkinliğinin kolay izlenmesine olanak tanıyabilmektedir.

Hastalarda tümöral doku varlığı çoğu teşhisin hedefi olmaya devam etmektedir. Ne yazık ki, erken aşamalarında, kanser kolayca görülememekte olup, bazı gecikmiş bulgular ağır veya ölümcül sonuçlar ile neticelenmektedir. Ayrıca, yanlış tanıyı önlemek için, hastalara ağrı ve rahatsızlık veren çok sayıda gereksiz ameliyat eylemiyle sonuçlanan klinik kararı teyit/ertelemek için sayısız biyopsi yapılmaktadır. Kanserli hastalar için hayatta kalmanın erken evre tanı ile kuvvetle ilişkili olduğu iyi bilinmektedir.

Kanserin tespitinde etkili teşhis araçlarının geliştirilmesi yoğun araştırma konusudur. Etkin tümör belirteçlerinin keşfi ve bunların tespiti tanı ve tedavi yaklaşımlarında önemlidir. Kimyasal veya biyolojik maddeler olabilen (proteinler, antijenler, hormonlar, reseptörler, genetik belirteçler ve mikro RNA) biyomarkerlar son zamanlarda kanserin erken teşhisi, etkili tedavisi ve prognozu hakkında bilgi vermek için kullanılmaktadır. Biyomarkerların kuantifikasyonu, hücresel ambalajın analizi, doku biyopsilerinde morfoloji ve mamografi, kolonoskopi gibi bazı görüntüleme yöntemleri çoğu kanseri teşhis etmek için kullanılmaktadır. Bununla birlikte, hastanın kanserle hayatta kalmasının erken tanı ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, *in vivo* klinik tanıyı yüksek seçicilik ve duyarlılıkla

kolaylaştırmak ve spesifik olarak hızlandırmak için analitik yöntemleri kullanan yeni cihazlara ihtiyaç vardır.

Biyolojik belirleyicilerin tespiti onlarca yıldır önemli bir trend olmuştur [259]. Aslında bu belirleyicilerin çok sayıda patojenik süreçte önemli rol oynadığı üzerine çalışılmış ve yapılan çalışmalar kanıtlanmıştır [260]. Biyolojik belirteçler üzerine yapılan araştırmalar, kanser tanısı için rutin olarak yürütülmektedir, çünkü biyolojik belirteçlerin varlığı kanser türünü belirlemeye yardımcı olmaktadır. Biyolojik belirteçlerin tanımlanması şu anda biyopsileri gerektiren dokular üzerinde gerçekleştirilmektedir [261]. Cerrahi girişimlerden kaçınmak amacıyla, biyolojik belirteçleri *in vivo* olarak tespit etme fikri ortaya çıkmış ve bu da özel biyosensörlerin hazırlanmasına neden olmuştur.

Biyosensörler esas olarak ilgilenilen biyolojik belirteçleri tespit etmek amacıyla geliştirilmiştir [262]. Bu teknoloji tarafından önerilen etiketsiz ve gerçek zamanlı saptama, klasik tekniklerle karşılaştırıldığında önemli bir varlık olmaya devam etmektedir. Minimalize boyut, iyi bir hassasiyete bağlı olarak, biyolojik belirteç algılaması için de önemlidir. Uzun yıllardır bu amaçla hedef moleküllerin (örneğin; proteinler, hücreler) detaylandırılması ve ayırt edilmesi için elektrokimyasal veya optik teknikler kullanılarak çeşitli biyosensörler geliştirilmiştir [64]. Özellikle SPR bazlı sistemler hızlı ve hassas sonuç vermesi dolayısıyla büyük ilgi görmektedirler. SPR biyosensörleri sayesinde biyomoleküler etkileşimlerin etiketlemesiz (yani herhangi bir ekstra boyar madde kullanımına gerek kalmadan), gerçek zamanlı, niceliksel, hızlı, güvenilir, uygun maliyetli, çok parametrelili ve yüksek verimli bir şekilde ölçülebilmeleri mümkün olabilmektedir (Şekil 4.1). SPR sisteminde genel olarak altın yüzey kullanılmaktadır. Metallerin içerisinde serbest elektronlar bulunmaktadır, metallerin iletken olmasının sebebi de budur. Bu serbest elektronlar ısı etkenlerinden dolayı titreşirler. Elektronlar, yüklü parçacıklar oldukları için birbirleriyle etkileşirler ve bu titreşimler düzenli dalgalara dönüşür. Bu dalgalar bilimsel literatürde elektron plazması yani plazmon olarak adlandırılır [108]. Yüksek kırılma indisine sahip bir malzemenin üzerine kaplanan ince altın katmanı, lazer ışını emer ve altın yüzeyinde elektron dalgaları oluşur. Analiz edilmesi düşünülen kütle miktarındaki artış veya bir alıcının bağlanması halinde, altın

katmanın yüzeyinde ışığın davranışı değişerek, kırılma indisi değişimine yol açar. Meydana gelen bu optik değişim sayesinde biyolojik etkileşimler, etiketlemeye ihtiyaç duyulmaksızın, yüksek bir hassasiyette ve gerçek zamanlı olarak, nitel ve nicel olarak ölçülebilir [263]. Buna göre konsantrasyon analizi, antijen-antikor, virüs-antikor, bakteri-antikor, DNA-DNA, DNA-protein gibi etkileşime sahip biyolojik moleküllerin afinite ve avidite analizi, kinetik analizi, aktif konsantrasyon tespiti ve daha pek çok analiz çeşidi yapılabilir. SPR tekniği sağladığı bu avantajlar nedeniyle diğer birçok yeni sensör teknolojisinden de ayrılmaktadır [264].



Kanserin tespitinde çeşitli biyolojik belirteçler kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları prostat spesifik antijen (PSA), interlökin 6 (IL-6), interlökin 8 (IL-8), karsinoembriyonik antijen (CEA) kanser antijenleri (CA-125, CA15-3, CA19-9, CA27-29), c-reaktif protein (CRP), p53 proteini, tiroglobülin ve α -fetoprotein (AFP) gibi hücre yüzeyi veya salgılanmış proteinlerdir [265]. Kanser biyolojik belirteç proteinleri, enzime bağlı immünosorbent deneyler, radyoimmünoassay, elektroforetik immünoassay ve kütle spektrometresi temelli proteomik içeren yöntemlerle ölçülebilmektedir. Güvenilir olmasına rağmen, bu yöntemlerin maliyet, kompleks protokoller, uzun test süresi ve/veya çoğulculuğun zorluğu gibi klinik ve bakım noktası kullanımı için sınırlamaları bulunmaktadır [266]. Ancak kanser biyomarkerlarının belirlenmesinde SPR tabanlı biyosensörler etiketsiz ve gerçek zamanlı saptama sistemi sağlamaktadır. Ayrıca SPR tabanlı biyosensörler, doku ya da vücut sıvılarında ya da her ikisinde de bulunan genetik ya da protein belirteçleri

kullanarak çok yüksek insidans düzeyinde ortaya çıkan diğer hastalıklar için de kullanılmaktadır [267].

Solüsyondaki biyomarker ile yüzeye bağlı reseptör arasındaki bağlanmaya dayanan SPR ile biyotanımlama, erken tanı için umut verici olduğu düşünülmektedir. Bunun nedeni, SPR ile tespit sınırının, pikomolar ile zeptomolar arasında geniş bir aralıkta manyetik partiküller kullanılarak belirlenebilmesidir. Bu durum, SPR yönteminin, kanserin erken teşhisinde kan veya serum iz seviyelerinde bulunan bazı kanser biyomarkerlarının hızlı ve hassas belirlenmesinde önemini ortaya koymaktadır.

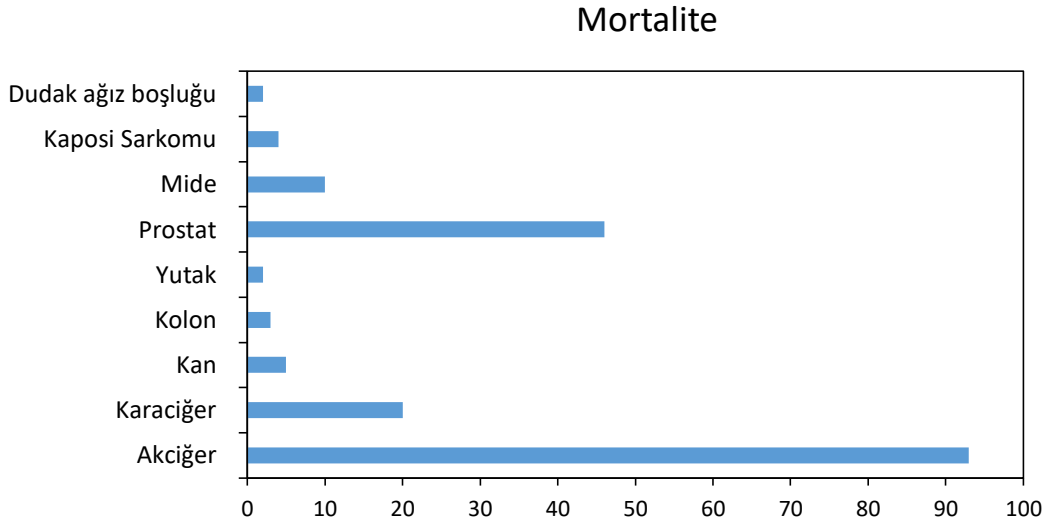
SPR sistemine sahip spesifik kanser biyomarkerları ile çeşitli çalışmalar yapılmıştır. SPR çipi üzerinde hareketsizleştirilen aptamer ve antikör reseptörlerinin kullanılması, serum örneklerinde farklı protein biyomarkerlarının seçici olarak saptanmasına izin vermiştir [268]. Bir çalışmada aptamer fonksiyonel SPR arayüzlerinde immünoglobulin E'nin attomolar tespiti için anti-IgE modifiye edilmiş altın nanorodlar kullanılmıştır [269]. Başka bir çalışmada, aptamer ile değiştirilmiş kuantum noktaların SPR sinyal arttırıcı olarak kullanılması, zeptomolar saptama limitli serumda C-reaktif proteinlerin algılanmasına izin vermiştir [270]. Uludag ve Tothill [271] antikör modifiye edilmiş altın nanopartikülleri kullanarak bir sandviç testi yaparak prostat spesifik antijen (PSA) biyolojik belirteçleri için 8,5 pM tespit limiti bildirmişlerdir.

Tez çalışmasında, mikroakışkan bir kanal ile donatılmış yüksek hassasiyetli SPR bazlı bir biyosensör yoluyla kanser biyomarkerlarını tespit etmek amaçlanmıştır. Deneyler, mikroakışkan kanaldaki spesifik proteinler yoluyla kanser tipini tanımlamak için aynı anda yapılmıştır. Dört biyomarker paneli, Prostat Spesifik Antijen (PSA) [272], Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü-D (VEGF-D) [273], İnsülin Benzeri Büyüme Faktör-I (IGF-I) [274] ve Serum Monosit Farklılaşma Antijeni (CD-14)[275] çalışmada kullanılmıştır. Agresif prostat kanserine spesifik olduğu düşünülen dört protein biyomarker paneli, hastalığın yayılma ilerlemesi hakkında bilgi vermek için seçilmiştir. Bu biyomarkerların tespit edilmesi sadece prostat değil (PSA hariç) diğer kanser türleri hakkında da bilgi vermektedir.

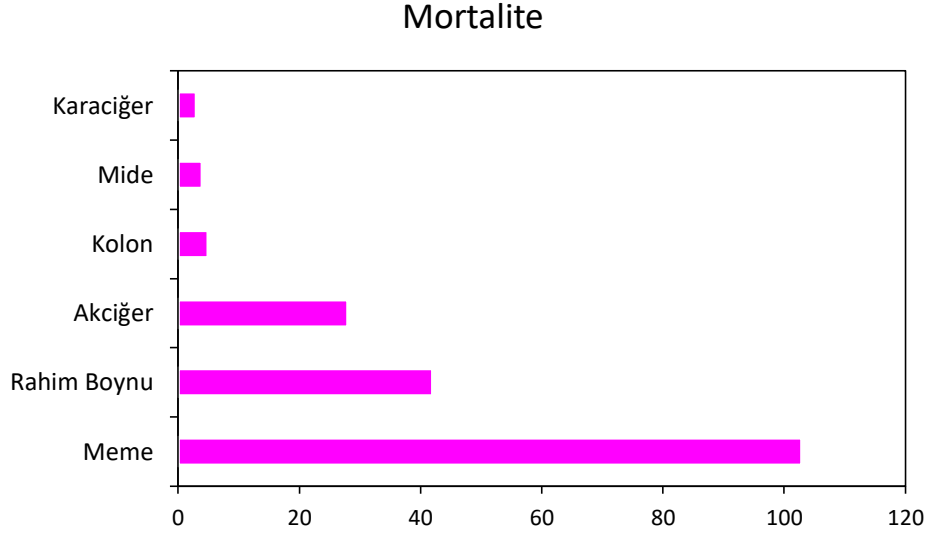
4.2 Literatür Özeti

4.2.1 Kanser Prevelansı

Tüm dünyada 200'den fazla kanser türü tespit edilmiştir ve günde 1500'den fazla kanser kaynaklı ölüm meydana gelmektedir. WHO'nun verilerine göre 2018 yılında dünya genelinde erkeklerde en fazla mortalite oranına sahip kanser çeşidi akciğer kanseridir. İkinci sırayı prostat kanseri almaktadır. Yine aynı verilere dayanarak dünya çapında kadınlarda en fazla mortalite oranına sahip kanser türü meme kanseridir. Meme kanserinden sonra yine kadınlara özgü bir kanser türü olan rahim boynu kanseri ikinci sırada yer almaktadır. WHO'nun dünya genelindeki kanser prevalansı cinsiyete göre ayrıntılı olarak Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir [276, 277].



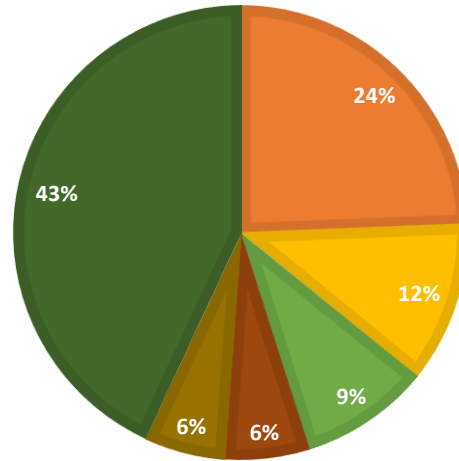
Şekil 4.2 Erkeklerde dünya genelinde kanser türüne göre mortalite oranları



Şekil 4.3 Kadınlarda dünya genelinde kanser türüne göre mortalite oranları

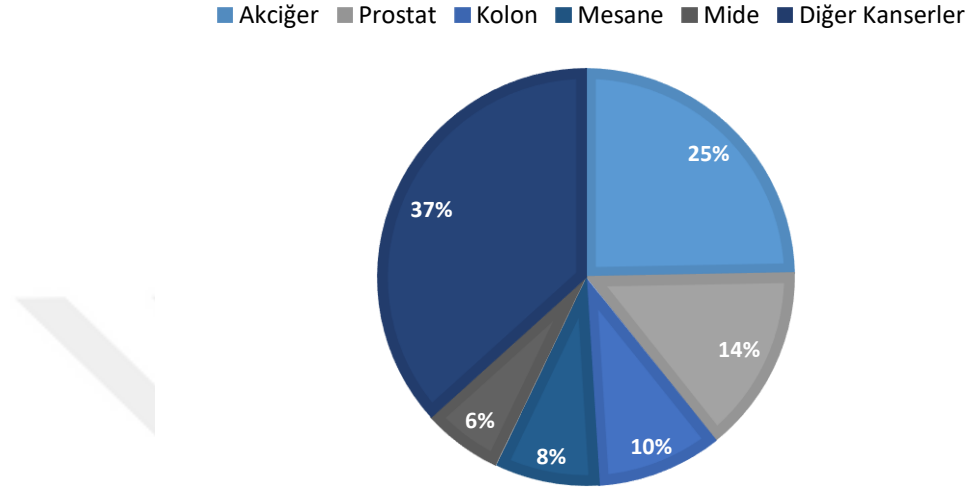
WHO tarafından yayınlanan raporda Türkiye için 2018 yılı içinde tüm yaşlar göz önüne alındığında kadınlarda toplam 91.655 yeni vaka meydana gelmiştir. Bu vakaların yüzdesel dağılımları incelendiğinde en fazla görülen kanser türünün %24,4 ile meme kanseri olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4).

■ Meme ■ Tiroid ■ Kolon ■ Dölyatağı Gövdesi ■ Akciğer ■ Diğer Kanserler



Şekil 4.4 Kadınlarda Türkiye genelinde 2018 yılında kanser türünün vaka sayısına göre dağılımı

Aynı sene erkeklerde tüm yaşlar göz önüne alındığında toplam 118.882 yeni vaka olduğu açıklanmıştır. Bu vakalardan en yüksek oran %24,7 ile akciğer kanseri hastalarını içermektedir (Şekil 4.5). Her iki cinsiyet beraber değerlendirildiğinde en fazla kanser oranı akciğer kanserinde bunu izleyen kanser türü ise meme kanseridir [276].



Şekil 4.5 Erkeklerde Türkiye genelinde 2018 yılında kanser türünün vaka sayısına göre dağılımı

4.2.2 Kanser Biyomarkerları

Kanseri tespit etmek için ultrason, manyetik rezonans görüntüleme ve biyopsi gibi bazı geleneksel yöntemler bulunmaktadır. Bununla birlikte, bu yöntemler tümörün fenotipik özelliklerine dayanarak kanserin erken evresini teşhis edemeyebilmektedir [59]. Kanser sırasında önemli değişikliklerden geçen biyomarkerlar klinik açıdan büyük öneme sahiptir. Bunlar hastalığın tespiti ile ilişkili tanı biyomarkerları, hastalığın nüksü hakkında bilgi sunan prognostik biyomarkerlar ve tedaviye yanıtı tahmin eden öngörücü biyomarkerlar olarak listelenmektedir [278]. Kanser gelişimini göstermek için, biyomarkerlar için nükleik asitler, proteinler, metabolitler, izoenzimler veya hormonlar kullanılabilir [62]. Biyomarkerlar, dokular, hücreler veya sıvılar gibi biyolojik ortamlarda bulunabilmektedir. Öte yandan, verimliliği en üst düzeye çıkarmak ve tarama masrafını en aza indirmek için biyomarkerların serum, idrar veya balgamda bulunması arzu edilmektedir [279].

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi [280] tarafından yayınlanan raporda kanserlere özgü biyomarkerlar belirlenmiştir. Tablo 4.1’de görüldüğü gibi bir kanser türüne özgü tek bir biyomarker bulunmamaktadır. Prostat kanserinin tespitinde onaylanan ve o kansere özgü kullanılan tek biyomarker PSA’dır. Diğer kanser türleri için onaylanan en az iki tane biyomarker bulunmaktadır. Ancak kanserin başlangıç döneminde ve agresif olduğu dönemde bu kanser biyomarkerlarına ek olarak vücutta üretilen farklı biyomarkerlarda bulunmaktadır. Ek olarak, FDA (Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından onaylanmayan ancak çeşitli araştırmalarda kullanılan biyomarkerlar da bulunmaktadır. Genel olarak tek bir biyomarker tek bir kanser türüne özgü bilgi vermemektedir.

Tablo 4.1 Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanan kanser biyomarker listesi

Biyomarker	Kaynağı	Kanser Türü
Prostat		
PSA	Serum	Prostat
Meme		
HER2	Serum	Meme
CA15-3	Serum	Meme
CA27-29	Serum	Meme
OPR	Tümör	Meme
HER2/NEU	Tümör	Meme
Mesane		
FDP	İdrar	Mesane
BTA	İdrar	Mesane
HMW CEA	İdrar	Mesane
NMP	İdrar	Mesane
Kromozom 3, 7, 9p21, 17	İdrar	Mesane
Testis		
α -fetoprotein	Serum	Testis
HCG- β	Serum	Testis
Kalın Bağırsak		
CEA	Serum	Kalın Bağırsak
EGFR	Kolon	Kalın Bağırsak
Diğerleri		
CA19-9	Serum	Pankreas
CA125	Serum	Yumurtalık
Tiroglobülin	Serum	Tiroid
KIT	Tümör	GIST

4.2.2.1 İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri (IGF'ler)

İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF'ler), karsinogeneze dahil olmanın yanı sıra normal ve transforme edilmiş hücreler üzerinde promitotik ve antiapoptotik etkilere sahiptir. IGF-I ve IGF-II olmak üzere iki tip IGF bulunmaktadır. IGF-I'in miyositler, osteoblastlar ve kondrositler gibi bazı mezotel hücrelerinde hücre farklılaşmasını teşvik ettiği bildirilmiştir. Özellikle, doğrudan prostat kanseri gelişimi için bir risk faktörüdür [281]. Roddam, vd. [274] artan IGF-I seviyelerinin, sonraki prostat kanseri için orta derecede artmış bir riskle istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir.

4.2.2.2 Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), kan damarlarının oluşumunu uyaran hücreler tarafından üretilen bir sinyal proteininin vasküler geçirgenlik faktörü (VPF) olarak da adlandırılmaktadır. Hem vaskülojenez (embriyonik dolaşım sisteminin de novo oluşumu) hem de anjiyogenez (önceden var olan vaskülatürden kan damarlarının büyümesi) ile ilgili önemli sinyal proteinleri üretmektedir. VEGF ailesinin bir üyesi olan VEGF-D, endotelyal hücreler üzerinde lokalize olan VEGFR-2 ve yetişkin dokularında lenfatik endotelyum üzerinde eksprese edilen bir reseptör olan VEGFR-3 üretimini aktive etmektedir. Bu, VEGF-D'nin tümör anjiyogenezini ve lenfanjiyogenezi teşvik ettiği anlamına gelmektedir [282, 283]. VEGF-D, VEGF-C ile hemen hemen aynı yapıya sahiptir. VEGF-C'nin ekspresyonu, göğüs, kolon, akciğer, tiroid, mide ve yassı hücreli kanserler, mezotelyomalar, nöroblastomlar, sarkomlar ve melanomlar gibi çeşitli insan tümörleriyle bağlantılıdır [284-287].

4.2.2.3 Monosit Yüzey Antijeni (CD14)

CD14, hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakteriler için bir reseptör olan 53 kD moleküler ağırlığa sahip bir glikoproteindir. Membrana bağlı CD14 (mCD14) veya çözünür form (sCD14), enflamatuar sitokinler ürettiklerinden insan doğuştan gelen bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynamaktadır. Kültürlenmiş CD14 hücrelerinin süpernatantlarında veya serum ve idrarda çözünür bir CD14 formu tespit edilebilmektedir [288]. CD14, monositler, makrofajlar, nötrofiller gibi miyeloid hücrelerin ve endotelyal ve epitelyal hücreler (mCD14) gibi miyeloid olmayan

hücrelerin yüzeyinde eksprese edilmektedir. Serumdaki sCD14 konsantrasyonundaki artış, artan enfeksiyon oranları, sepsis veya mortalite oranları ile ilişkilendirilmiştir [289]. Üç fonksiyonel alt gruba (klasik, orta ve klasik olmayan) ayrılan ve CD14 ile ifade edilen monositler, kanserin ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır [290]. CD14'ün vücuttaki işlevi hala tam olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle, işlevi yoğun bir araştırma konusudur [291]. Bir çalışmada, oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC) hastalarında CD14⁺⁺CD16⁺ ara monositlerinin sıklığının belirgin şekilde arttığı belirtilmiştir [290]. CD14 ekspresyonunun başka bir çalışmada, mide kanseri hücresi invazyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir [292]. Li, vd. [292], CD14⁺CD169⁺ hücrelerinin frekansında bir artış olması durumunda kolorektal kanserin gelişebileceğini ve ilerleyebileceğini öne sürmüştür. Kanser ve iltihaplanma arasında bir bağlantı bulunmaktadır. Enflamatuvar hastalıklar, birçok kanser türünün (mesane, servikal, gastrik, bağırsak ve prostat ve tiroid kanseri dahil) gelişme riskini arttırmakta ve bu durum tüm kanser türleri geliştikçe CD14'ün hasta kanında yüksek oranda tespit edilebileceği anlamına gelmektedir [293].

4.2.2.4 Prostat Spesifik Antijeni (PSA)

Prostat spesifik antijen (PSA), prostat tarafından üretilen bir glikoproteindir. PSA 1994 yılında FDA tarafından kanser tespiti için onaylanmıştır. Fonksiyonu seminal sıvıyı sıvılaştırmaktır. Serum PSA seviyeleri 1-3 ng/mL arasında değişmektedir. Serumda toplam 4 ng/mL PSA seviyesi, prostat kanseri için muhtemel bir endikasyondur. Tedaviden sonra, konvansiyonel test prosedürlerini kullanarak serumda PSA seviyesinin belirlenmesi, hastalığın nüksetmesini göstermektedir. Bu nedenlerden dolayı, özellikle pg/mL bölgede serumdaki PSA'nın aşırı hassas algılanması, sadece prostat kanserinin erken saptanması için değil aynı zamanda hastalığın tekrarında bilgi sağlamak için önemlidir [294]. Ayrıca PSA'nın kana salınması iyi huylu prostat hastalıkları ile yorumlanabilmektedir. Ancak, PSA testi çoğunlukla prostat kanseri riskinin tahmini için kullanılmıştır. Öte yandan, PSA taramasının prostat kanseri için kesin sonuçlar verip vermediği konusunda bazı çelişkiler bulunmaktadır [295, 296]. PSA tespitinde testin doğruluğu ve hassasiyeti olmadığından PSA türevlerini ve diğer biyomarkerları kullanarak PSA etkinliğini artırmak için ek yöntemler geliştirilmelidir.

4.2.3 Kanser Biyomarkerlarının Tespiti

Kanser biyomarkerları genellikle kanda bol miktarda bulunmaktadır. Daha yüksek bir tedavi etkinliği sağlamak için klinik semptomla karşılaşmadan önce hastalığın erken tanısı önemlidir. Biyolojik sıvılardaki biyomarker seviyesi son derece düşük olduğundan, konvansiyonel yöntemler ultra hassas algılama sağlayamamaktadır [270].

Biyolojik sıvılardaki biyomarkerların tespiti için çeşitli araştırmalar SPR yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir. Karsinoembriyonik antijeni (CEA) saptamada, sinyali arttırmak için altın nanopartiküller (GNP'ler) kullanılmıştır [297]. İki kanser biyomarker adayı ALCAM ve TAGLN2'nin etkileşimleri SPR sensörü yanıtı dikkate alınarak araştırılmıştır [298]. SPR algılama, ilaç geliştirme, gıda kalite kontrolü, çevresel izleme ve klinik analiz gibi çeşitli alanlarda kullanılmıştır. Gelişen teknolojinin yanı sıra SPR algılama alanında da bazı önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. "SPR mikroskopisi" olarak da adlandırılan SPR görüntüleme [84], tarama açısı SPR ölçümlerinin hassasiyetini görüntülemenin mekansal yetenekleriyle birleştiren ilerlemeye bir örnektir [299]. DNA/DNA, RNA/DNA, DNA bağlayıcı protein, RNA aptamerleri/protein, antikör-antijen ve karbonhidrat/proteinden oluşan birkaç afinite sisteminin SPRi üzerinde kullanımı kaydedilmiştir. Herhangi bir etiket kullanılmadan ligand ve analit arasında meydana gelen afinite etkileşimleri, klasik SPR algılamasında olduğu gibi gerçek zamanlı olarak izlenebilmektedir. Bununla birlikte, sadece sensorgramlar (yani rezonans sinyali zamana karşı) aynı anda izlenmekle kalmaz, aynı zamanda kamera kullanılarak tüm biyoçip yüzeyini görselleştirilebilir.

Tez çalışmasında PSA, CD14, IGF-I ve VEGF-D kullanılan biyomarkerlardır. Bunların serumdaki miktarı Tablo 4.2'de gösterildiği gibidir. Vücutta meydana gelen metastaz ile serumdaki miktar artış göstermektedir. Hastalığın erken evresinde bu biyomarkerların kantitatif olarak hassas bir şekilde tespit edilmesi uygun bir tedavinin seçim süresini kısaltacak ve mortaliteyi azaltacaktır.

Tablo 4.2 Çalışmada kullanılan biyomarkerların serumdaki miktarları

Biyomarker	Serumdaki Miktarı	Referans
CD-14	1,9 µg/mL	[289, 300]
IGF-I	160 ng/mL	[301]
VEGF-D	657 (±43) pg/mL	[302, 303]
PSA	1-3 ng/mL	[295]

5.1 Materyal

5.1.1 Mikroorganizmalar

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA), vankomisine dirençli *Enterococcus* (VRE) ve vankomisine duyarlı *Enterococcus* (VSE), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium* B764, *Escherichia coli* ATCC 25922 Acibadem Labmed Tıbbi Laboratuvarlarından (İstanbul, Türkiye) temin edilmiştir. Amerikan Tip Kültür Koleksiyonunun (ATCC) suşları, antimikrobiyal duyarlılıklarını belirlemek için tek bir kanalla donatılmış sistemin optimizasyonda kullanılmıştır. Protein G tabanlı bakteri tespitinde *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC 43300 pozitif kontrol olarak tek kanallı sistemin optimizasyonunda kullanılmıştır. *E. coli* ATCC 25922 ise negatif kontrol olarak çok kanallı sistemde çalışılırken çapraz reaktiviteyi tespit etmek için kullanılmıştır. Çok kanallı SPR sisteminde toplam 40 izolat (MRSA, MSSA, VRE ve VSE) kullanılmıştır. Bütün suşlar -80 °C'de %15 gliserol ile depolanmıştır.

5.1.2 Antimikrobiyal Duyarlılık Testi için Kimyasallar

Poly-L-lysine, 200 µg/mL konsantrasyonda bir altın çip kaplama malzemesi olarak kullanılmıştır. Poly-L-lysine (P8920) solüsyonu Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) temin edilmiştir. Antimikrobiyal duyarlılık testi için kullanılan sefoksitin ve vankomisin Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) temin edilmiştir. Her iki antibiyotik de tüm antimikrobiyal duyarlılık testler sırasında minimum antimikrobiyal etki seviyesi olarak 3 µg/mL'lik bir konsantrasyonda kullanılmıştır. Tüm deneyler boyunca akan bir tampon olarak steril ultra damıtılmış su (DI su) kullanılmıştır.

5.1.3 Bakteri Tespiti için Kimyasallar

Au kaplı (47 nm) çipler NanoDev® (İstanbul, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. 11- mercaptoundecanoic acid (11-MUA) Santa Cruz Biotech'ten (Dallas, TX, ABD) satın alınmıştır. 11-MUA hazırlamak için analitik etanol (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Almanya) kullanılmıştır. N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide Hydrochloride (EDC, 03450, ABD), N-Hydroxysuccinimide (NHS, 130672, ABD) ve bovine serum albumin (BSA, A2153, ABD) Sigma Aldrich'ten satın alınmıştır. Metisiline dirençli *S. aureus*'u hedefleyen saflaştırılmış monoklonal antikor (mAb_{MRSA}, LS-C342883, ABD), Lifespan Biosciences'tan temin edilmiştir. Saflaştırılmış rekombinant Protein G (PG, 101201, ABD), Invitrogen/Thermo Fisher Scientific'ten satın alınmıştır. Tüm deneyler boyunca kullanılan pH 7,4'e sahip fosfat tamponlu tuz (PBS-P8920, ABD) Sigma Aldrich'ten alınmıştır. Kullanılan su bir PURELAB® Plus ünitesinden (USF Elga, Almanya) elde edilmiştir. Brain Heart Infusion (BHI) Broth , Brain Heart Infusion Agar ve Blood Agar Merck'ten (Merck, Darmstadt, Almanya) sağlanmıştır. Defibrinated sheep blood Thermo Fisher Scientific'ten (Oksoid, Darmstadt, Almanya) alınmıştır. Mueller Hinton Broth Sigma-Aldrich (Darmstadt, Almanya)'ten temin edilmiştir.

5.1.4 Kanser Biyomarkerlarının Tespiti için Reaktifler

SpotReady çipler 16 SPRI için Playtpus Technologies, Inc. (ABD)'den ve 16 SPRI için GWC Technologies, Inc. (ABD)'den temin edilmiştir. Prostat spesifik antijen (PSA), monoklonal primer antihuman PSA antikor (Ab₁, clone no. CHYH1), ve sekonder anti-PSA antikor (Ab₂, clone no.CHYH2), vasküler endotelyal büyüme faktörü-D (VEGF-D), monoklonal primer antihuman VEGF-D antikor (Ab₁, cat no: MAB2861), sekonder anti-VEGF-D antikor (Ab₂, cat no: BAF286), insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I), monoklonal primer antihuman IGF-I antikor (Ab₁, lot no: BIM1113041), sekonder anti-IGF-I antikor (Ab₂, lot no: AJS1718091), serum monosit yüzey antijeni (CD14), monoklonal primer antihuman CD14 antikor (Ab₁, cat no: MAB3833) ve sekonder anti-CD14 antikor (Ab₂, cat no: BAF383) Origene Technologies, Inc. (ABD)'den satın alınmıştır. Streptavidin-coated superparamagnetic beads (Dynabeads MyOne Streptavidin T1, Invitrogen, ABD), monothiol alkane PEG₃-OH (Sigma-Aldrich, ABD), monothiol alkane PEG₆-COOH

(Santa Cruz, ABD) ve 10 mM pH 7,4 fosfat tamponlu tuz (PBS- 0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl içerisinde 0,01 M sodyum fosfat) ve 10 mM pH 7,4 fosfat tamponlu tuz-Tween20 (PBS-T- 0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl ve %0,5 Tween20 (Sigma-Aldrich, ABD) içerisinde 0,01 M sodyum fosfat), NaOH (Sigma-Aldrich, ABD), etanolamin (Sigma-Aldrich, ABD) ve buzağı serumu (Sigma-Aldrich, ABD) çalışmada kullanılan diğer reaktiflerdir.

5.2 Yöntemler

5.2.1 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Bütün suşlar -80 °C'de %15 gliserol ile depolanmıştır. SPR biyosensör sisteminde kullanmadan önce, tüm MRSA, MSSA, VRE ve VSE suşlarının steril 96'lık mikroplakalarda uygulanan broth mikrodilüsyon yöntemi (MİK) ile antimikrobiyal duyarlılıkları belirlenmiştir [304-307]. Sefoksitin ve vankomisin antimikrobiyal duyarlılık testinde kullanılan iki antimikrobiyal ajandır. Sefoksitin *S. aureus* suşları için vankomisin ise *Enterococcus* spp. suşları için kullanılmıştır. Antibiyotikler, steril ultra damıtılmış su içerisinde çözündürülmüş ve 512 µg/mL'lik bir stok çözelti haline getirilmiştir. Stok antibiyotik çözeltisi, Mueller Hinton Broth ile iki katlı 0,25 µg/mL'ye seri olarak seyreltilmiş ve kontrol numuneleri dışında kuyucuklara ilave edilmiştir. Pozitif kontrol olarak antibiyotik içermeyen bakteri süspansiyonu ve negatif kontrol olarak steril broth kullanılmıştır. Her kuyucuk negatif kontroller hariç 5×10^5 KOB/mL bakteri süspansiyonu içermiştir. Sefoksitin ve *S. aureus* içeren mikroplakalar 37 °C'de 20 saat, vankomisin ve *Enterococcus* spp. içeren mikroplakalar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra mikroplaka okuyucu (BioTek, ABD) kullanılarak 630 nm'de absorbanları ölçülmüştür. Minimum inhibisyon konsantrasyonu [285], görünür büyümeyi tamamen inhibe eden en düşük antibiyotik konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [308] kılavuzuna göre yorumlanmıştır.

5.2.2 Türbidimetrik Ölçüm

MRSA, MSSA, VRE ve VSE örneklerinden -80 °C'de bulunan kriyolarından BHI agar üzerine öze ile ekim işlemi yapılmıştır. Çizimi yapılan besiyerleri 37 °C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Koloni oluşumu gerçekleştirdikten sonra BHI brotha tek koloni

olacak şekilde aktarılmıştır ve 37 °C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Bakterilere 1:2, 1:4, 1:8 ve 1:16 olacak şekilde BHI broth içerisinde seyreltme işlemi yapılmıştır [309]. Bu solüsyonların peptone water (%0,1) dilüsyon çözeltisi ile bir seri seyreltme işlemi yapılmıştır. Yayma plak yöntemine göre seri dilüsyonlardan BHI agara 0,1 mL paralelli olarak ekim yapılmıştır ve 37 °C'de 18 saat inkübe edildikten sonra 30-300 arası koloniler sayılıp hesaplanmıştır. BHI broth içerisinde seyreltilen (1:2, 1:4, 1:8 ve 1:16) örneklerin ayrıca spektrofotometrede (Shimadzu UV-1800, Japonya) 696 nm dalga boyunda ölçümleri yapılmıştır ve absorbans değerleri belirlenmiştir. Absorbans değerlerine karşılık gelen bakteri sayısı belirlendikten sonra standart kurve çizilmiştir. Standart kurvenin çiziminde istatistik hesaplamalar ile elde edilen regresyon doğrusu kullanılmıştır. Kurve aracılığıyla elde edilen regresyon doğrusu ile herhangi bir absorbans değerine karşılık gelen mikroorganizma sayısı kültürel yöntemle gerek kalmadan direkt olarak hesaplanabilmiştir [310].

5.2.3 Dirençten Sorumlu Genlerin PCR Yöntemiyle Araştırılması

MİK çalışmaları sonrasında dirençli bulunan suşlarda direncin genotipik incelenmesi amacıyla dirençten sorumlu genler (metisilin direnci için *mecA* ve *mecC*, vankomisin direnci için *vanA*, *vanB* ve *vanC*) polimeraz zincirleme tepkimesi (PCR) yöntemiyle araştırılmıştır.

Metisilin direncinden sorumlu genlerin araştırılmasında Stegger, vd. [311] geliştirdiği PCR yöntemi, vankomisin direncinden sorumlu genlerin araştırılması Clark, vd. [227] geliştirdiği PCR yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır.

Bakteriyel DNA ekstraksiyonu 100 µL steril su içerisine eklenen 4-5 koloninin 95 °C'de 15 dk kaynatılıp, daha sonra -20 °C'de 10 dk bekletilip, 3000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmesiyle elde edilmiştir. Elde edilen DNA'nın nükleik asit konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla Nanodrop cihazından (BioSpec-nano, Shimadzu, Japonya) ölçüm alınmıştır.

Metisilin direnç genlerinin PCR yöntemiyle araştırılmasında kullanılan primerler (5'-3' yönünde):

mecA_P7- CCACTTCATATCTTGTAACG

mecA_P4- TCCAGATTACAACCTTCACCAGG

mecA_{LGA251}_MultiRP- GAAGATCTTTTCCGTTTTTCAGC

mecA_{LGA251}_MultiFP- GAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC

PCR testi için kullanılacak karışım: her örnek için; 5 µL H₂O, 12,5 µL Taq master mix 0,5 µL Mg, 0,5'er µL *mecA* P4/P7 ile hazırlanmıştır. PCR tüplerine 19 µL karışım dağıtılmıştır. DNA örneklerinden 1'er µL karışımların üzerine pipetlenmiş, tüplerin kapakları kapatılmıştır. Tüpler XP Thermal Cycler (Biorad, ABD) cihazına yerleştirilmiştir. Program; 94 °C 15 dk, 94 °C 0,5 dk x 30 döngü, 59 °C 1 dk x 30 döngü, 72 °C 1 dk x 30 döngü, 72 °C 10 dk şeklinde ayarlanmıştır. Aynı koşullar *mecA_{LGA251}* Multi FP/RP için kullanılmıştır. PCR ürünleri %1,8'lik poliakrilamid jelde (1,5 saat, 120 V) yürütülmüş, DNA'nın görülmesi amacıyla etidyum bromür (Merck, Almanya), yükleme tamponu olarak 6X DNA loading dye (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. PCR ürün bantları jel görüntüleme cihazı (Biorad, ABD) ile görüntülenmiştir.

Vankomisin direnç genlerinin PCR yöntemiyle araştırılmasında kullanılan primerler (5'-3' yönünde):

vanA-F- CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA

vanA-R- CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA

vanB-F- GTGACAAACCGGAGGCGAGGA

vanB-R- CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA

vanC-F- GAAAGACAACAGGAAGACCGC

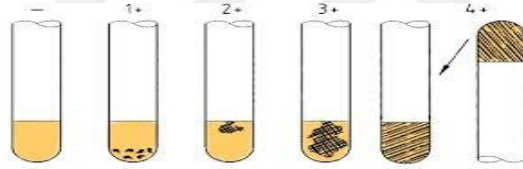
vanC-R- ATCGCATCACAAGCACCAATC

PCR testi için kullanılacak karışım: her örnek için; 5 µL H₂O, 12,5 µL Taq master mix 0,5 µL Mg, 0,5'er µL *vanA* F/R hazırlanmıştır. PCR tüplerine 19 µL karışım dağıtılmıştır. DNA örneklerinden 1'er µL karışımların üzerine pipetlenmiş, tüplerin kapakları kapatılmıştır. İşlem şu şekilde gerçekleşmektedir: Tüpler XP Thermal Cycler (Biorad, ABD) cihazına yerleştirilmiştir. Program; 94 °C 1 dk x 35 döngü, 50 °C 1,5 dk x 35 döngü, 72 °C 1,5 dk x 35 döngü, 72 °C 3 dk şeklinde ayarlanmıştır. Aynı işlemler *vanBF*/R ve *vanCF*/R primerleri için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

PCR ürünleri %1,2'lik poliakrilamid jelde (2,5 saat, 110 V) yürütülmüş, DNA'nın görülmesi amacıyla etidyum bromür (Merck, Almanya), yükleme tamponu olarak da 6X DNA loading dye (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. PCR ürün bantları jel görüntüleme cihazı (Biorad, ABD) ile görüntülenmiştir.

5.2.4 Koagülaz Testi

Koagülaz üretimi için test edilecek olan suşlar, 35 °C'de BHI broth içinde gece boyunca inkübe edilmiştir. Tüp koagülaz testi, bir tüp içinde bulunan 0,5 mL koagülaz plazma etilendiamintetraasetat (EDTA, Sigma-Aldrich, ABD) içine gece boyunca BHI brothta inkübe edilen kültürünün 0,2 ml'si ilave edilerek yapılmıştır. Nazik karıştırmadan sonra, testler bir inkübatörde 35 °C'de inkübe edilmiştir ve 2, 4 ve 24 saat sonra incelenmiştir. Tepkimeler Şekil 5.1'e göre yorumlanmıştır. Tipik 4+ reaksiyon, tüp tarafına doğru döndüğünde yerinde kalan çok sıkı, opak bir pıhtıdır. Karşılaştığımız tipik 2+ ve 3+ reaksiyonlar, 4+ reaksiyon kadar opak değildir ve şeffaf plazma ile çevrilidir [312, 313].



Şekil 5.1 Koagülaz testinde meydana gelen muhtemel sonuçlar (3 ve 4 pozitif)

5.2.5 Yüzey Plazmon Resonans (SPR) Cihazı

Çalışmamızda kullanılan SPR sistemi, Nanodev şirketi (Ankara, Türkiye) tarafından üretilmiştir (Şekil 5.2). Bu portatif cihaz sensör, peristaltik pompa (Ismatec, ISM597D, Wertheim-Mondfeld, Almanya) ve veri toplama modülü olmak üzere üç bileşenden oluşmaktadır. Bu cihazda 850 nm dalga boyunda çalışan ışık yayan diyot (LED) kullanılmıştır. Yüksek dalga boyu ölçümü, daha derin bir ölçüm oluşturan plazmonik etki alanını ve aynı zamanda bakteri ölçümlerinde hassasiyeti arttırmıştır.



Şekil 5.2 Analizler için kullanılan SPR sistemi

Silindirik lens, LED kaynağından gelen ışığı bir araya getirerek toplamak için ve bunu dikdörtgen prizmaya (N-BK7, $n = 1,51$) göndermek için entegre edilmiştir. CMOS sensör tarafından prizmadan yansıyan ışık toplanmaktadır. Sistemde kullanılmak üzere çip üretmek için, 0,15 mm kalınlığında dairesel bir cam slayt kullanılmıştır. Tek kullanımlık bir mikroçip tasarlamak için, bu cam slayt 3 nm krom ve ardından 47 nm altın ile kaplanmıştır. Optik iletimdeki kayıpları önlemek için prizmaya kırılma indisi ile eşleşen bir yağ ($n = 1,50$) uygulandıktan sonra, altın çip prizmanın merkezine yerleştirilmiştir (Şekil 5.3).



Şekil 5.3 SPR sisteminde kullanılan çipin, prizmanın ve bunların kanala takıldıktan sonraki görüntüsü

Sıvının sızmasını önlemek için çipe bir O-ring takılmıştır. Çip daha sonra bir vida kullanılarak tekli veya çoklu mikrokanal ile donatılmıştır. Çözeltinin bir peristaltik pompa vasıtasıyla sensörün yüzeyinden akmasını sağlamak için bir giriş ve bir çıkış portuna sahip tekli ve çoklu bir mikrokanal imal edilmiştir (Şekil 5.4). Sıcaklık kontrolü deney boyunca 0-60 °C ve 0,1 °C sıcaklık kontrol kararlılığına sahip bir termistör ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.5). Sistem, çip yüzeyindeki değişiklikleri izlemek için bir kamera ile desteklenmiştir. Kırılma indisi değişikliklerine bağlı olarak kaydedilen görüntüler, özel tasarım yazılım kullanılarak gerçek zamanlı olarak rezonans açılarına dönüştürülmüştür.



Şekil 5.4 SPR cihazı tek kanallı ve çok kanallı sistemlere ait görüntü



Şekil 5.5 Sistemin sıcaklık göstergesi

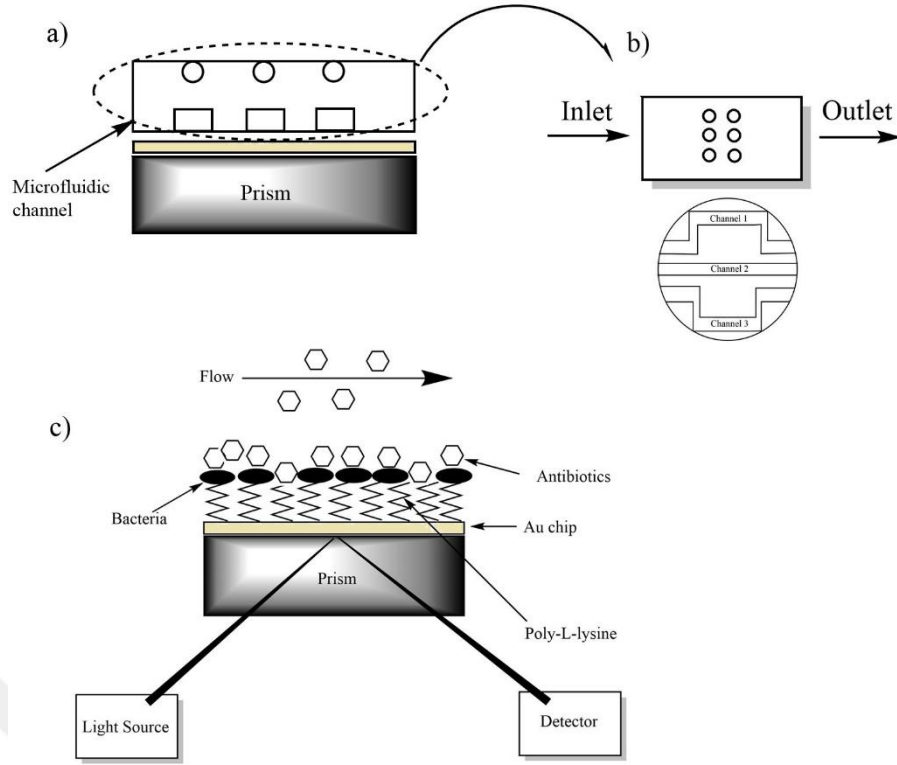
5.2.6 Sensör Sistemi için Bakteri Kültürünün Hazırlanması

Tüm MRSA, MSSA, VRE ve VSE suşları, %15 gliserol ile -80 °C'de saklanmıştır. Suşlar, %5 defibrin edilmiş koyun kanı ile desteklenmiş Blood agar üzerinde kültürlenmiştir ve her bir deney için 24 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Tek koloni bakterileri BHI broth içinde kültürlenmiştir ve gece boyunca 37 °C'de bir inkübatör çalkalayıcıda (Wisecube®WIS-30,Korea) saptama sisteminde kullanılmak üzere inkübe edilmiştir. *E. coli* ATCC 25922, kontrol bakterisi olarak kullanılmıştır. İnkübe edilen suşlardaki bakteri sayımı türbidimetrik yöntem ile hesaplanan eğriye göre spektrofotometrede gerçekleştirilen ölçümden sonra belirlenmiştir. Antikor deneyinde kullanılacak olan bakteriler PBS içinde seyreltme işlemi yapılarak sisteme verilmiştir.

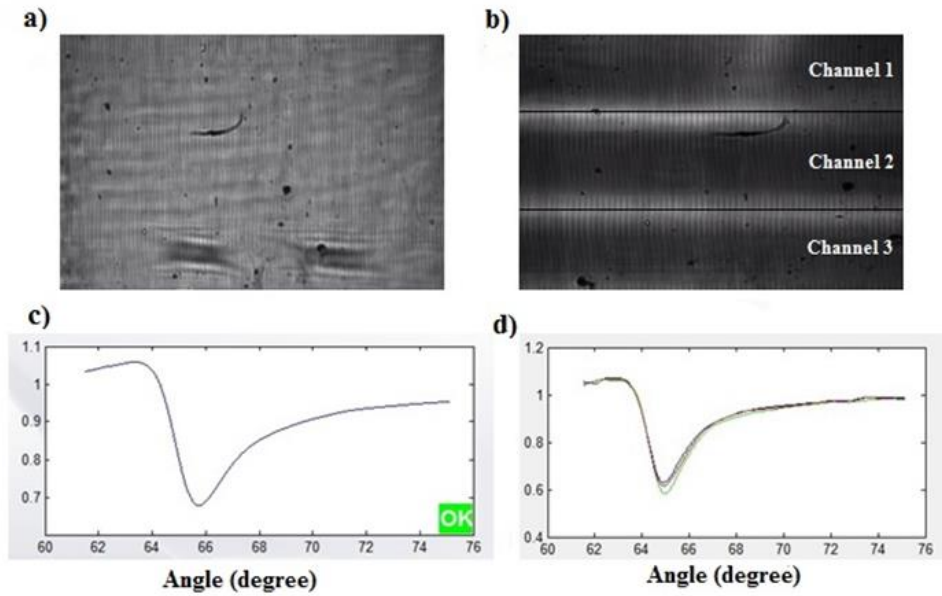
5.2.7 Altın Yüzeyinin Modifikasyonu ve Antimikrobiyal Prosedür

Sensör çipi olarak 47 nm altın kaplanmış yuvalak bir cam lamel kullanılmıştır. Daha ilerde yapılacak olan kimyasal modifikasyondan önce, altın çip oda sıcaklığında 3:1

(v/v) oranında taze olarak hazırlanmış konsantre H_2SO_4 ve %30'luk H_2O_2 [92] içeren piranha çözelti ile 2 dk boyunca nanofabrikasyondan kaynaklanan organik kalıntıları uzaklaştırmak için temizlenmiştir ve daha sonra DI su ile yıkanmıştır. Yıkamadan sonra, azot gazı ile kurutulmuştur. Altın çip yüzeyi, 200 $\mu g/mL$ poly-L-lysine içinde 4 °C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir [108]. İnkübasyondan sonra yüzey, bağlanmamış malzemeleri uzaklaştırmak için DI su ile yıkanmıştır ve azot akışında kurutulmuştur. Yüzey modifikasyonundan sonra, altın kaplı SPR çipi ince bir indeks eşleme yağı tabakası ile cam prizma üzerine yerleştirilmiş ve mikroakışkan hücre parçası, sürekli akışı sağlamak için mekanik kavrayıcılar ile SPR cihazına monte edilmiştir. Bakterilerin antimikrobiyal testi için deney düzeneği Şekil 5.6'da şematik olarak gösterilmektedir. Bu şemanın çizimi için ChemDraw Prime 16.0 uygulaması kullanılmıştır. Modifiye edilmiş altın çip yüzeyi, analize başlamadan önce sistemin kamerası tarafından görüntülenmiştir (Şekil 5.7). Analizi gerçekleştirmek için, Şekil 5.7'de gösterildiği gibi SPR'nin 30 dk boyunca verdiği yanıt dikkate alınarak DI su ile 25 $\mu L/dk$ sabit akış hızında sabit bir taban çizgisi oluşturulmuştur. Test için bakteri, yıkama için DI su ve ilaç direncinin incelenmesi için antibiyotik solüsyonu, peristaltik pompa kullanılarak sisteme enjekte edilmiştir. Bağlanma tepkileri bir aç derecesi olarak kaydedilmiştir. SPR açısı kaymaları, bakteriyel bağlanma sonrası elde edilen değerlerin antibiyotik uygulamasından sonra elde edilen değerlerden çıkarılmasıyla hesaplanmıştır.



Şekil 5.6 SPR sisteminin şematik görüntüsü. (a) Çoklu mikroakışkan kanal entegre edilmiş SPR platformunun gösterimi. (b) Mikroakışkan bir hücre odasının üst ve alt görünümü. (c) Bakterilerin antimikrobiyal testi için protokol



Şekil 5.7 (a) Tek kanallı altın yüzeyin görüntüleri; (b) üçlü hücre odası ile altın yüzeyin görüntüleri; (c) DI suyunun tek kanal üzerindeki rezonans açısı; (d) DI suyunun üçlü kanal üzerindeki rezonans açısı

5.2.8 Bakteri Tespiti için Çipin Hazırlanması ve SPR Prosedürü

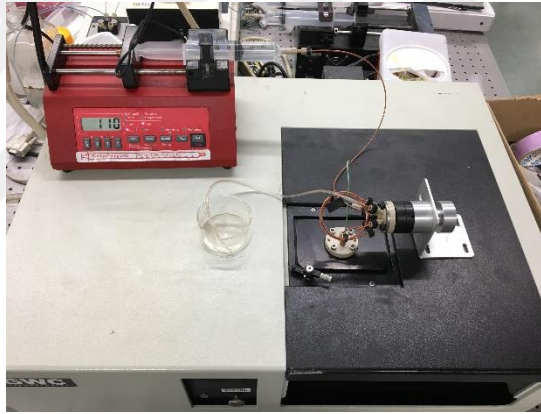
Sensör çipi olarak 47 nm altın kaplanmış yuvarlak bir cam lamel kullanılmıştır. Daha ileride yapılacak olan kimyasal modifikasyondan önce, altın çip oda sıcaklığında 3:1 (v/v) oranında taze olarak hazırlanmış konsantre H_2SO_4 ve %30'luk H_2O_2 [92] içeren piranha çözelti ile 2 dk boyunca nanofabrikasyondan kaynaklanan organik kalıntıları uzaklaştırmak için temizlenmiştir ve daha sonra DI su ile yıkanmıştır. Yıkamadan sonra, azot gazı ile kurutulmuştur. Altın çiplerinin yüzeyi, yüzeye karboksil grupları ile SAM oluşturmak için gece boyunca 1 mM 11-MUA çözeltisi içinde inkübe edilmiştir. Daha sonra etanol ve ultra saf su ile yıkanarak temizlenmiştir. Son olarak azot gazı ile kurutularak sistemde kullanılmaya hazır hale gelmiştir. 11-MUA modifikasyonundan sonra, altın kaplı SPR çip, ince bir tabaka indeks yağ ile cam prizma üzerine yerleştirilmiştir ve mikroakışkan hücre, mekanik kavrayıcılar ile SPR cihazına monte edilmiştir. SPR'nin 30 dk boyunca verdiği yanıt dikkate alınarak su ile sabit bir taban çizgisi oluşturulmuştur. Stabil bir taban çizgisi elde edildikten sonra 1:1 oranında 0,4 M EDC ve 0,1 M NHS, 10 mL saf su içinde olacak şekilde taze olarak hazırlandıktan sonra sisteme 10-15 dk boyunca gönderilmiştir. SAM'in karboksil-terminal grubu, NHS ilavesiyle stabilize edilmiş aminle reaktif ara ürünün oluşumu için EDC ile aktive edilmiştir. Oluşan amid bağları organik bileşiklerle reaksiyona girebilmektedir. Gevşek bağlanmış molekülleri yüzeyden yıkmak için 200 μ L saf su ilave edilmiştir. Antikorların bağlanması için kanala, PBS içinde 0,1 mg/mL'lik bir konsantrasyonda 100 μ L Protein G enjekte edilmiştir. Yüzey, daha sonra bağlanmamış molekülleri uzaklaştırmak için 300 μ L PBS ile yıkanmıştır. MRSA'ya (5 μ g/mL) karşı 100 μ L mAb (monoklonal antikor), PBS pH 7,4 içerisinde süspanse edilmiştir ve Protein G kaplı tabakadan geçirilmiştir. Antikor çözeltisi, bir saat boyunca yüzey üzerinde hareketsiz kılmak üzere inkübe edilmiştir. Geri dönüşümlü olarak bağlanmış antikorları temizlemek için 300 μ L PBS ile başka bir yıkama prosedürü gerçekleştirilmiştir ve altın yüzeyinde mevcut herhangi bir serbest bağlanma yeri, spesifik olmayan herhangi bir bağlanmayı ortadan kaldırmak için BSA (100 μ g/mL) kullanılarak bloke edilmiştir. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda PBS içerisinde bakteri gönderilerek kalibrasyon eğrisi belirlenmiştir.

5.2.9 Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile Yüzey Görüntüleme

SEM görüntüleme, bakterilerin sensörün yüzeyine bağlanmasını kontrol etmek ve iki yöntemi karşılaştırmak için bir SEM cihazı (Zeiss, EVO® LS 10, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Bakterili altın çip, SEM'de daha iyi iletkenlik sağlamak için 60 dk boyunca altınla kaplanmıştır. En iyi görüntüleri yakalamak için farklı büyütme seviyeleri (1,32 KX (KX = 1000X) ila 517 X) ve 20.000 kV voltaj kullanılmıştır.

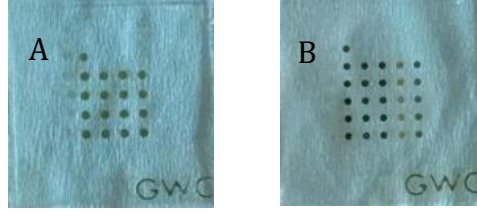
5.2.10 SPR Imager'ın Çalışma Prosedürü

Mikroakışkan şırınga pompası (Model No. NE4002X, New Era Pump Systems, Inc., ABD) ve çipe akışkan numuneleri istenilen akış hızında enjekte etmek için 100 µL numune döngüsü bulunan bir Rheodyne kromatografik enjektör (Ürün No. 9725i, IDEX Health & Science LLC., ABD) ile donatılmış GWC SPR görüntüleyici II (GWC technologies, WI, ABD), SPRi ölçümü yapmak için kullanılmıştır (Şekil 5.8).



Şekil 5.8 Tüm malzemelerle donatılmış SPRi cihazının resmi

Bir SpotReady™ 16 ve 25 SPRi dizisinin 16 ve 25 altın spotlarını içeren çipler, SPRi sisteminde meydana gelen spesifik bağlanmanın saptanması için kullanılmıştır (Şekil 5.9).



Şekil 5.9 SPRi deneyinde kullanılan çipler: (A) 16 altın spot SPRi dizisi; (B) 25 altın spot SPRi dizisi

5.2.11 SPRi Sistemi için Rejenerasyon Metodunun Belirlenmesi

Rejenerasyon yöntemini belirlemek için, SPRi cihazı üzerindeki bazı çalışmalar dikkate alınarak farklı NaOH ve HCl çözeltileri konsantrasyonu hazırlanmıştır [314] [297]. Deneyler yapılarak, rejenerasyon çözeltilerinin etkisi ölçülmüş ve PBS-T tamponun taban seviyesine ulaştığı görülerek en iyi rejenerasyon çözeltisine karar verilmiştir.

5.2.12 İki Tip SPRi Çipi için Antikor Konsantrasyonunun Optimizasyonu

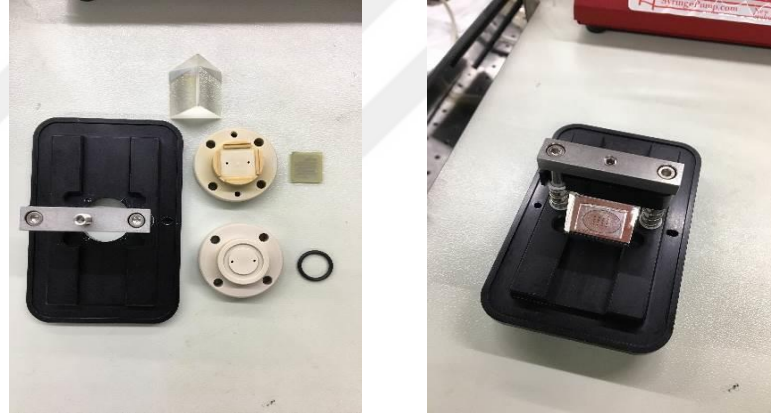
Altın spot sayısı 25 olan çipler, primer (Ab_1) ve sekonder antikor (Ab_2) açısından zaten optimize edilmiştir [315]. Bu nedenle, 16 altın spot içeren çiplerin optimizasyonu, hem hassasiyeti hem de sinyal/gürültü oranını geliştirmek için yapılmıştır. Yakalama antikoru (Ab_1) konsantrasyonu, 50 $\mu\text{g/mL}$ 'lik sabit bir tespit antikoru (Ab_2) konsantrasyonu ve standart protein (Ag) için 12,5, 25, 50 ve 100 pg/mL 'lik çeşitli standart konsantrasyon kullanılarak değerlendirilmiştir. Yakalama antikorunun konsantrasyonları 5-1000 mg/mL olarak belirlenmiştir.

5.2.13 SPRi Sistemi için Çip Hazırlık Prosedürü

Çip, üretim sırasında istenmeyen toz ve kiri temizlemek için saf etanol ve damıtılmış su ile yıkanmıştır. Daha sonra temizlenen çip, oda sıcaklığında monotirol alkan $\text{PEG}_6\text{-COOH}$ ve monotirol alkan $\text{PEG}_3\text{-OH}$ (1:9 oranı, 2 mM toplam konsantrasyon) etanol çözeltisini içeren bir beherde 12 saat boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ya da oksijeni uzaklaştırılmış etanol içinde hazırlanmış 1 mM konsantrasyonunda 11-MUA içeren bir beher içerisinde 18 saat karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Çözeltiyi hazırlamak için kullanılan etanol, içinde bulunan oksijeni uzaklaştırmak için azot gazı ile 30 dk boyunca muamele edilmiştir. İnkübasyondan sonra, sensör yüzeyi üzerindeki SAM katmanında oluşturulan

karboksil grupları, oda sıcaklığında 400 mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) ve 100 mM N-hydroxysuccinimide (Sulfo-NHS) içeren taze hazırlanmış sulu bir çözelti ile 10 dk süreyle aktive edilmiştir. Su ile yıkama aşaması, EDC/NHSS inkübasyonunun ardından gerçekleştirilmiştir. Aktive edilen çip, azot gazı ile yavaş bir şekilde kurutulmuştur. Ab₁ ve PBS içinde hazırlanmış %2'lik BSA (negatif kontrol) spotlara ekilerek nemlendirilmiş bir hazne içinde oda sıcaklığında 4 saat veya buzdolabında 24 saat bekletilerek inkübe edilmiştir.

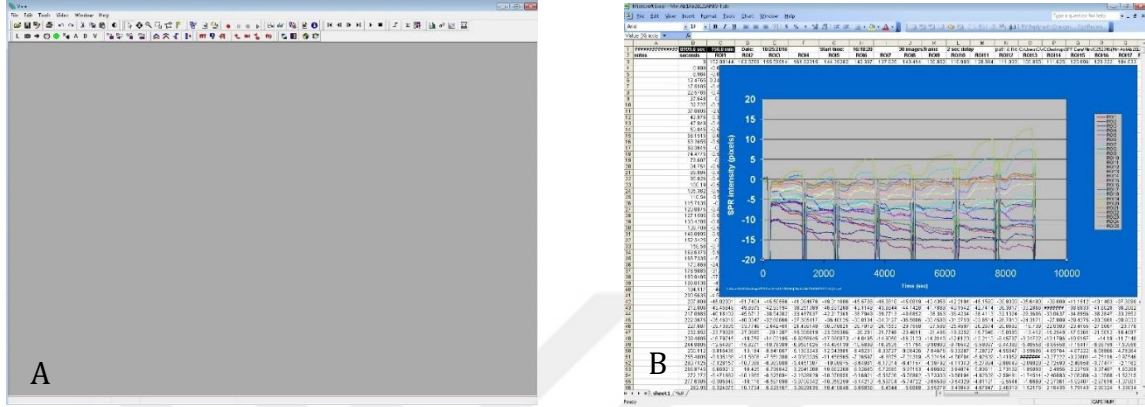
İnkübasyondan sonra, yakalama antikoru ve negatif kontrol içeren çip, %0,05 Tween 20 ihtiva eden ihtiva eden 10 mM fosfat tamponlu tuzlu çözelti (PBS-T) ile durulanmış ve sisteme takılmıştır. PBS-T ile yıkanan çip, O-ring veya bir serpantin kanal parçası, birleştirme yağı, kanal bileşeni kullanılarak sisteme yerleştirilmiştir ve PEEK tüpü kullanılarak pompa ve enjektöre bağlanmıştır (Şekil 5.10). 10 mM PBS-T, aksi belirtilmedikçe 105 µL/dk akış hızında çalışma tamponu olarak kullanılmıştır.



Şekil 5.10 Çipi sisteme monte etmek için SPRi sisteminin bileşenleri

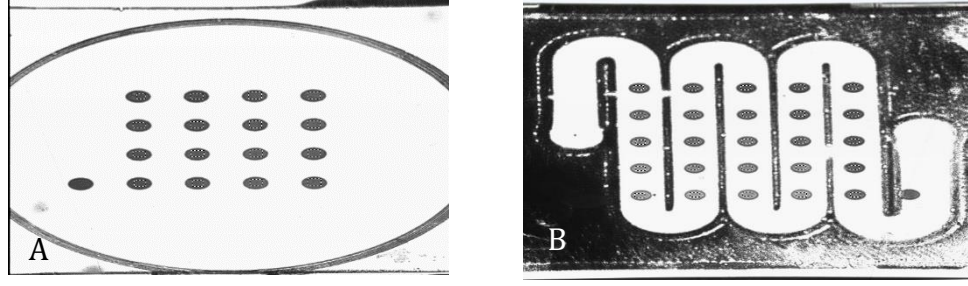
Yüzeyde aktif olarak bulunan karboksil gruplarını inaktive etmek ve spesifik olmayan bağlanmaları gidermek için iki aşamalı bloklama işlemi yapılmıştır. Çip sisteme takıldıktan sonra, 1 M etanolamine 10 dk boyunca 10 µL/dk hızla sisteme gönderilmiştir. PBS-T ile yapılan yıkama işleminden sonra %2 BSA aynı süre ve aynı hızda gönderilmiştir. Yüzeyi analizden önce şartlamak ve yüzeyde duran, bağlanmayan maddeleri uzaklaştırmak için 10 mM NaOH, 3 saniye boyunca 105 µL/dk hızla sisteme gönderilmiştir.

Gelen ışık açısı manuel protokole göre vida ile ayarlanmıştır. SPRI sisteminde, ışığın dalga boyu (800 nm) ve geliş açısı (40°-70°) sabittir. Her noktadan piksel yoğunluğu değerlerini dönüştüren dijital optik V ++ yazılımı, bu değerleri zamana karşı aynı anda çizen bir Excel programı aracılığıyla tüm bağlayıcı olayları gerçek zamanlı olarak kaydetmiştir (Şekil 5.11).



Şekil 5.11 (A) V ++ yazılımının arayüz görünümü; (B) Kayıt verilerinin bir Excel sayfasında gerçek zamanlı olarak görüntülenmesi

Her çalışmadan sonra, çip yüzeyi eğer 25 spotluk çip ve O-ring kullanılıyorsa yaklaşık 10-16 kez 210 $\mu\text{L/dk}$ hızla 60 saniyelik bir 10 mM NaOH darbesi kullanılarak rejenere edilmiştir. Ancak 16 spotluk çip ve mikroakışkan kanal kullanılıyorsa 105 $\mu\text{L/dk}$ hızla 6-20 saniye, 1-3 kez 10 mM NaOH çözeltinin kullanılmasının yeterli olduğu tespit edilmiştir. Analizden önce, çip yüzeyinin görüntüsü (TIF formatında) kaydedilmiştir (Şekil 5.12). Analiz boyunca çip yüzeyinde meydana gelen bütün bağlanmaların görüntüsü zamana bağlı sürekli olarak kaydedilmiştir.



Şekil 5.12 Analiz öncesi SPR çip yüzey görüntüleri: (A) O-ring kullanılan 16 altın spot içeren çipin yüzey görüntüsü, (B) bir serpantin kanal parçası kullanılan 25 altın spot içeren çipin yüzey görüntüsü

5.2.14 MP-Ab₂ Biyokonjugatlarının Sentez Prosedürü

Tespit antikoru olan Ab₂, Thermo Fisher tarafından sağlanan protokolü takiben 1 µm çaplı streptavidin kaplı süperparamanyetik partiküllere (MP) kovalent olarak konjüge edilmiştir. 40 µL streptavidin kaplı MP (10 mg/mL) üç kez 400 µL, %0,1 BSA içeren 10 mM PBS (pH 7,4) ile yıkanmıştır ve son olarak 380 µl %0,1 BSA içeren PBS içinde yeniden disperse edilmiştir. Daha sonra MP dispersiyonuna 20 µL biyotinile Ab₂ (50 µg/mL) ilave edilmiştir ve 1,5 mL mikrosantrifüj tüpünde yavaş eğim rotasyonu ile 30 dk boyunca 37 °C'de karıştırılmıştır. İnkübasyondan sonra süpernatant, Invitrogen DynaMag™-Spin Magnet (Şekil 5.13) kullanılarak manyetik olarak uzaklaştırılmıştır ve daha sonra biyotin-streptavidin etkileşimi yoluyla MP-Ab₂ biyokonjugatları oluşturulmuştur. Üç kez PBS-T tamponu ile yıkanarak bağlanmayan Ab₂ uzaklaştırılmıştır. MP-Ab₂ biyokonjugatlarının stok dispersiyonunu hazırlamak için 400 µL PBS-T içinde disperse edilmiştir.



Şekil 5.13 Manyetik partikül-antikor kompleksi hazırlamak için kullanılan Invitrogen DynaMag™-Spin Magnet ve Dynabeads™ MX mikserinin görüntüsü

5.2.15 MP-Ab₂ Biyokonjugatlarında Ag'nin Çevrimdışı Yakalama Prosedürü

PBS içinde farklı antijen (Ag) konsantrasyonları hazırlanmıştır. Ag yakalamak için, 30 µL stok MP-Ab₂ ve 30 µL antijen, 240 µL PBS-T ile karıştırılmıştır. Karışım, 30 dk boyunca 37 °C'de Dynabeads™ MX mikseri aracılığıyla sürekli karıştırma ile döndürülmüştür. İnkübasyondan sonra, bu karışım üç kez yıkanmıştır ve manyetik olarak ayrılmıştır. MP-Ab₂-Ag, 300 µL PBS içinde yeniden disperse edilmiştir. Oluşan çözelti, O-ring kullanılan sistemde 10 µL/dk bir akış hızında sisteme enjekte edilmiştir. Eğer mikroakışkan kanal kullanıldıysa, 5 µL/dk'lık bir akış hızında sisteme enjekte edilmiştir.

5.2.16 Çoklu Tespit için MP-Ab₂ Kompleksinde Ab₂ Optimizasyonu

Çoklu tespit için 3 farklı MP-Ab₂ kompleksi hazırlanmıştır. Bunlar:

- Birinci prosedür: Her bir Ab₂'den 5 µL karıştırılmıştır ve daha sonra manyetik partiküllere ilave edilmiştir ve aynı vialde 30 dk boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir.
- İkinci prosedür: Her bir Ab₂'den 10 µL karıştırılmıştır ve daha sonra manyetik partiküllere ilave edilmiştir ve aynı vialde 30 dk boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir.
- Üçüncü prosedür: Her bir Ab₂ (10 µL) manyetik partiküllere ayrı ayrı ilave edilmiştir ve daha sonra 30 dk boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir.

5.2.17 Analizin Uygulanması

Hazırlanan çip sistem üzerine yerleştirilmiştir. Tüm mikroakışkan sistem herhangi bir sızıntı olup olmadığını anlamak için kontrol edilmiştir. Bilgisayarda bir taslak excel sayfası açılmıştır ve SPR veri dosyalarına kaydedilmiştir. Gelen ışık açısı GWC kılavuzuna göre ayarlanmıştır. PBS-T, tüm deneyler sırasında çalışan tampon olarak kullanılmıştır. Sabit bir taban çizgisi oluşturmak için, PBS-T, 105 µL/dk bir akış hızında 10-15 dk boyunca sisteme enjekte edilmiştir. MP-Ab₂ ile yakalanan en düşük antijen konsantrasyonu alınmıştır ve "yükleme" enjektör pozisyonunda numune döngüsüne enjekte edilmiştir. Enjeksiyon pozisyonunda, numune 25 saniye boyunca 105 µL/dk'da şırınga edilmiştir ve akış hızı 5 µL/dk'ya değiştirilmiştir ve 25 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sona erdikten sonra, sistem PBS-T ile

105 µL/dk, 5 dk yıkanmıştır ve daha sonra bir PBS-T taban çizgisi elde etmek için 6-20 saniye boyunca 105 µL/dk hızla 10 mM NaOH ile birçok kez rejenere edilmiştir. PBS-T ile yıkama aşaması, sabit bir taban çizgisi oluşana kadar 5 dk boyunca 105 µL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. MP-Ab₂ ile yakalanan diğer antijen konsantrasyonları, yukarıda belirtildiği gibi sisteme arka arkaya uygulanmıştır.

5.2.18 Tekrar Kullanma Metodunun Tespiti

SPRi sistemde kullanılan çiplerde bulunan spotlar üzerinde sıvının yayılmaması için hidrofobik bir katman bulunmaktadır. Çipin yeniden kullanılabilmesi için hidrofobik katmana verilecek zararın en aza indirilmesi gerekmektedir. SPRi çipini yeniden kullanmak için; biri %5 sodium dodecyl sulfate (SDS) ve ultraviyole (UV) işlemi kullanılarak, diğeri hızlı piranha çözeltisi (3:1 konsantre H₂SO₄ ve %30 H₂O₂ karışımı) ve UV işlemi olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır.

İlk prosedür için aşağıdaki adımlar gerçekleştirilmiştir:

- Kullanılan çip SPRi cihazından dikkatlice çıkarılmıştır.
- Etanol ve DI su ile durulanmıştır.
- %5 SDS çözeltisi içinde 10 saniye ultrasona tabi tutulmuştur.
- DI su ile durulanmıştır ve azot gazında kurutulmuştur.
- Daha sonra 1 saat boyunca UV'ye (350 nm) maruz bırakılmıştır.
- UV işleminden sonra SPRi çipi birkaç kez etanol ile durulanmıştır ve azot gazı ile kurutulmuştur.

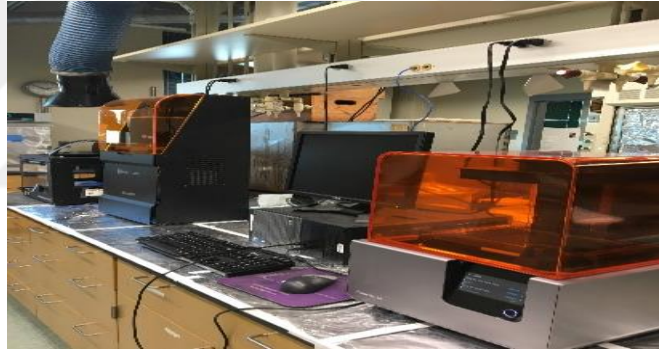
İkinci prosedür :

- Kullanılan çip SPRi cihazından dikkatlice çıkarılmıştır.
- Etanol ve DI su ile durulanmıştır.
- Hızlı piranha çözeltisi ile yıkanmıştır (10 saniye boyunca 3:1 konsantre H₂SO₄ ve %30 H₂O₂ karışımı).
- Su ve etanol ile sırasıyla durulanmıştır.
- Azot gazı ile kurutulmuştur.

- Daha sonra 1 saat boyunca UV'ye (350 nm) maruz bırakılmıştır.
- UV işleminden sonra SPRI çipi birkaç kez etanol ile durulanmıştır ve azot gazı ile kurutulmuştur.

5.2.19 3D Baskılı Kanal Parçasının Tasarımı

SPRI SpotReady™ 16 ve 25 spot dizileri için mikroakışkan kanalı, Autodesk 123 tasarım yazılımı kullanılarak tasarlanmıştır. Tasarlanan kanal Autodesk sürümünden Preform sürümüne dönüştürülmüştür. Bir serpantin kanal parçası, Formlabs Form 2 SLA 3D Printer (Formlabs, Inc., USA) ile akrilat esaslı esnek reçine kullanılarak imal edilmiştir (Şekil 5.14). Oluşturulan kanal, 20 dk boyunca izopropanol ile sonike edilmiştir ve daha sonra fırında kurutulmuştur. SPRI spot dizi ile bir araya getirmeden önce, kanal parçası kanal yüzeyini bloke etmek için 30 dk boyunca %0,1 BSA ihtiva eden PBS-T tamponuna batırılmıştır. Kanalın hacmi yaklaşık 10 µL'dir.



Şekil 5.14 Formlabs Form 2 SLA 3D Yazıcısının görünümü

5.2.20 Micro Bicinchoninic Asit (µBCA)² Protein Deneyi

MP-Ab₂ biyokonjugatlarının, farklı konsantrasyonlarında manyetik partiküllere bağlanan Ab₂ miktarı ve streptavidin-biyotin arasındaki etkileşim, µBCA (Thermo Scientific, USA) analizi kullanılarak saptanmıştır. Bu deneyde MP-Ab₂, manyetik partiküllere bağlı antikor miktarını tahmin etmek için BSA bloke etme adımı kullanılmadan hazırlanmıştır. MP-Ab₂ stok çözeltisi ilk önce 10 kez seyreltilmiştir. Bunu farklı konsantrasyonlar elde etmek için 2 katlı seyreltme serisi izlemiştir. Kontrol için, ikincil antikor ve BSA içermeyen MP, MP-Ab₂ ile aynı konsantrasyonlara seyreltilmiştir. µBCA analizi için mikrolaka yöntemi (96 oyuklu

plaka) kullanılmıştır. Deney için BCA reaktif çözeltisi, Thermoscientific'ten elde edilen protokole göre hazırlanmıştır. Bunun için, 150 µL MP-Ab₂ çözeltisi, 150 µL BCA çözeltisi ile karıştırılmıştır ve 37 °C'de eğim rotasyonu altında 2 saat reaksiyonu sağlanmıştır. Bu reaksiyonda, BCA reaktifinde sunulan Cu⁺², protein varlığında Cu⁺¹ oluşturmak üzere indirgeme geçirmektedir. Cu⁺¹ böylece protein konsantrasyonuna karşılık gelen 562 nm'de karakteristik bir absorbans vermek için 2 BCA molekülü arasında şelatlar oluşturmuştur. Her MP-Ab₂'deki Ab₂ konsantrasyonu bu yöntemle belirlenmiştir.



6.1 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Sonuçları

Toplam 40 bakteri suşu, mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak antibiyotiklere duyarlılık açısından değerlendirilmiştir. MRSA5'in minimum inhibitör konsantrasyonu değerinin 1 µg/mL olduğu tespit edilmiştir. MRSA5 hariç, kalan MRSA suşlarının MİK değerlerinin 32 µg/mL->128 µg/mL arasında olduğu bulunmuştur. MSSA suşlarının MİK değerleri MSSA1 ve MSSA10 hariç 1-4 µg/mL aralığında tespit edilmiştir. MRSA ve MSSA suşlarına ait MİK değerleri ayrıntılı olarak Tablo 6.1'de verilmiştir. VRE suşlarının MİK değerleri 64 µg/mL->128 µg/mL aralığında değişirken VSE suşlarının MİK değerleri 2-4 µg/mL aralığında bulunmuştur. VRE ve VSE suşlarına ait MİK değerleri Tablo 6.2'de gösterilmiştir. Suşların MİK aralıklarının belirlenmesinden sonra, bu izolatlar SPR sisteminin daha ileri analizleri için kullanılmıştır.

Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü'ne [308] göre *S. aureus*'un sefoksitine olan kırılma noktası duyarlı suşlar için ≤ 4 µg/mL ve dirençli suşlar için ≥ 8 µg/mL ve duyarlı ve dirençli *Enterococcus* spp. suşları için sırasıyla ≤ 4 µg/mL ve ≥ 32 µg/mL'dir. Bu tez çalışmasında, MRSA'nın MİK değerleri MRSA5 hariç 32 µg/mL- ≥ 128 µg/mL'dir. MRSA5'te *mecA* geninin bulunmasına rağmen MİK değerinin düşük çıkması *mecA* geninin aktif olmadığını göstermektedir. Öte yandan, MSSA'nın MİK değerleri MSSA1 ve MSSA10 hariç 1-4 µg/mL arasında tespit edilmiştir. MSSA1 ve MSSA10'da *mecA* geni olmamasına rağmen MİK değerlerinin yüksek çıkması aşırı beta-laktamaz üretimi gibi dirence yol açan başka mekanizmalara işaret edebilmektedir. Yapılan bir çalışmada, von Ah, vd. [316] MSSA ve MRSA'nın MİK değerlerinin sırasıyla 4 mg/L ve 32 mg/L olduğunu göstermişlerdir. Tez çalışmasından elde ettiğimiz sonuçlar, bu çalışmanın sonuçları ile tutarlıdır. VRE ve VSE'nin MİK değerleri için, Schouten, vd. [226] ve Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [308] tarafından rapor edilen sonuçlar ile uyum içerisindedir.

Table 6.1 MRSA ve MSSA suşlarının minimum inhibisyon konsantrasyonları değerleri

Suşlar	Sefoksitin Konsantrasyonu (µg/mL)										MİK
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	
MRSA1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	32
MRSA2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	64
MRSA3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	64
MRSA4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	64
MRSA5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1
MRSA6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	64
MRSA7	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	16
MRSA8	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	16
MRSA9	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	64
MRSA10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128
MSSA1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128
MSSA2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	2
MSSA3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	4
MSSA4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	4
MSSA5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	4
MSSA6	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	4
MSSA7	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	2
MSSA8	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	4
MSSA9	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	4
MSSA10	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	32

'+' gelişme var, '-' gelişme yok.

6.2 Türbidimetrik Ölçüm Sonuçları

Bir besiyeri içerisinde üreme meydana geldiğinde üremeye bağlı olarak bulanıklık artmaktadır. Sıvı besiyeri içerisindeki bulanıklığı tespit etmek için spektrofotometre kullanılabilir. Solüsyon içerisindeki bulanıklık arttıkça içerisinden geçen ışık miktarı azalmaktadır. Bu şekilde spektrofotometre yöntemi ile üremenin olup olmadığı konusunda bilgi edinilmektedir. SPR sisteminde kullanılacak olan bakterilerin sayımı için türbidimetrik yöntem kullanılarak spektrofotometrede standart bir kurve oluşturulmuştur. Standart kurve aracılığıyla oluşturulan regresyon doğrusu ile aynı koşullarda üretilen bakterinin logaritmik gelişme evresinin belirli bir anında popülasyonun sayısı hakkında fikir elde edilebilmiştir. Bu amaçla kültürün sadece spektrofotometrede absorbans değeri ölçülmüştür ve kurvede buna karşı gelen mikroorganizma sayısı hesaplanmıştır. Ancak kullanılan bu yöntem ile canlı hücre sayısı hakkında kesin bir bilgi elde edilememektedir [317-319].

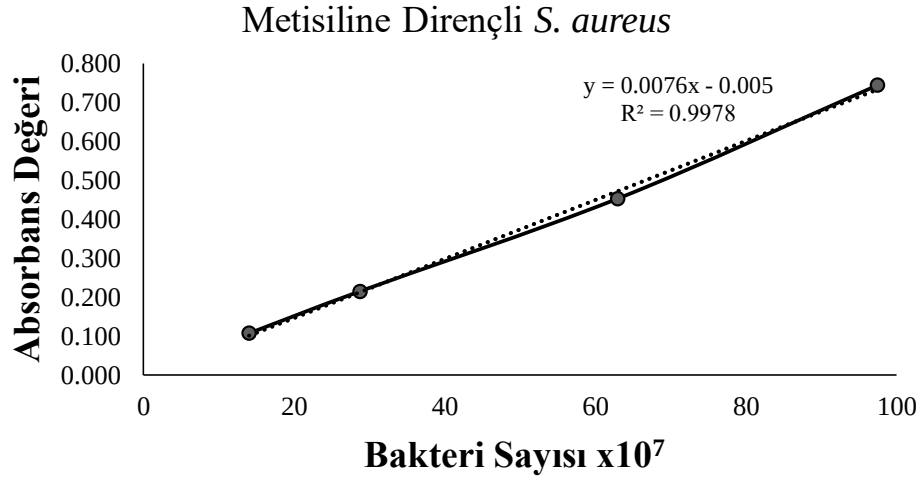
Table 6.2 VRE ve VSE suşlarının minimum inhibisyon konsantrasyonları değerleri

Suşlar	Vankomisin Konsantrasyonu (µg/mL)										MİK
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	
VRE1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128
VRE2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128
VRE3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128
VRE4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128
VRE5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128
VRE6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128
VRE7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128
VRE8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128
VRE9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	64
VRE10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>128
VSE1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	4
VSE2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	2
VSE3	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	2
VSE4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	4
VSE5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	4
VSE6	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	2
VSE7	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	4
VSE8	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	4
VSE9	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	4
VSE10	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	2

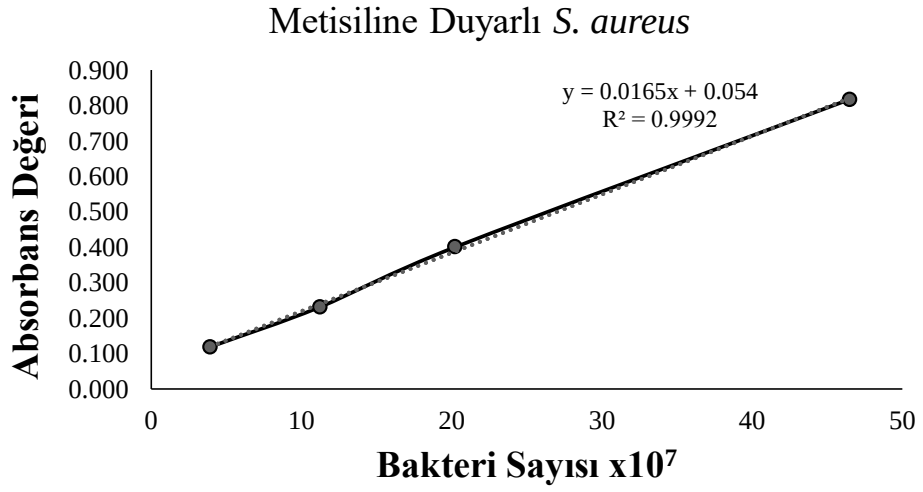
‘+’ gelişme var, ‘-’ gelişme yok.

İki katlı dilüsyonları hazırlanan bakteri solüsyonlarının spektrofotometrede alınan absorbans değerleri ve bu değerlere karşılık gelen kültürel sayımları sonuçları ile oluşturulan standart kurve ve regresyon değerleri Şekil 6.1, 6.2, 6.3 ve 6.4’te sırasıyla verilmiştir. Elde edilen eğriler aracılığıyla SPR sisteminde gerçekleştirilecek analizlerde bakterileri saymak için kullanılmıştır.

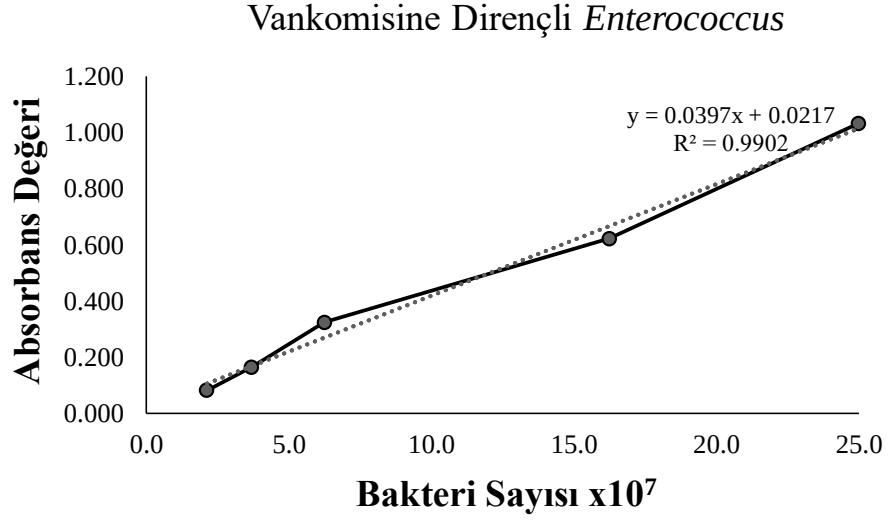
İnkübasyon sonunda elde edilen kültürlerin seyreltilmeleri sonucunda elde edilen absorbans değerlerine bağlı regresyon değerleri ile standart bir kurve elde edilmiştir. MRSA ve MSSA kültürlerinden elde edilen R^2 değerleri sırasıyla 0,9978 ve 0,9992 olarak belirlenmiştir. VRE ve VSE kültürlerine ait R^2 değerlerinin 0,9902 ve 0,9937 olduğu tespit edilmiştir. Kültürlerin sayımı standart kurveden elde edilen eşitliğe göre hesaplanmıştır.



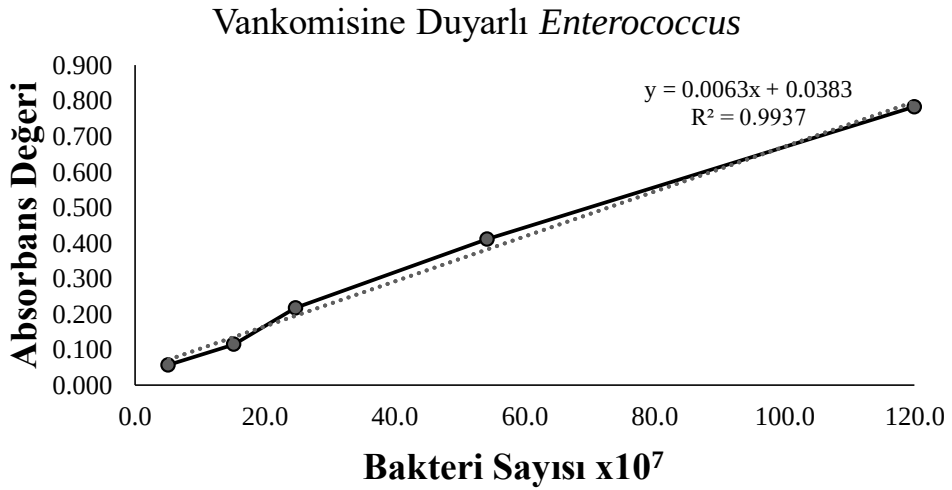
Şekil 6.1 Metisiline dirençli *S. aureus* sayımı için standart kalibrasyon kurvesi



Şekil 6.2 Metisiline duyarlı *S. aureus* sayımı için standart kalibrasyon kurvesi



Şekil 6.3 Vankomisine dirençli *Enterococcus* sayımı için standart kalibrasyon kurvesi



Şekil 6.4 Vankomisine duyarlı *Enterococcus* sayımı için standart kalibrasyon kurvesi

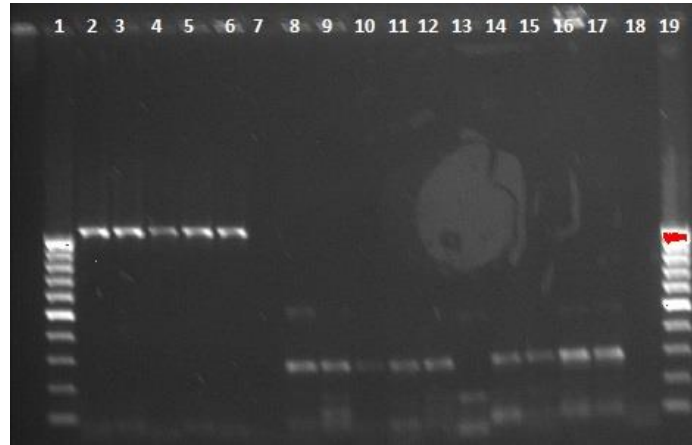
6.3 Direnç Genlerinin PCR Yöntemiyle Doğrulanması

Şekil 6.5'te görüldüğü gibi MRSA olduğunu düşündüğümüz 10 örnekte metisiline dirençten sorumlu *mecA* geni saptanmıştır. MSSA örneklerinin hiçbirinde *mecA* geni saptanmamıştır. *mecA_{LGA251}* geni için literatürde belirtilen şartlar ile PCR çalışması yapılmış fakat herhangi bir bant gözlemlenmemiştir.

mecA geni için 162 bp internal fragment pozitifdir. *mecA* geninin test edilmesi MRSA için direncinin kanıtıdır. *mecA* genini içermeyen *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213 suşu kontrol olarak kullanılmıştır ve herhangi bir bant oluşumu gözlemlenmemiştir. Suşların tamamına yapılan PCR testinde tamamının *mecA* genine sahip olduğu tespit edilmiştir. Metisilin direncinin ayrıca *mecA_{LGA251}* geni tarafından da meydana geldiği literatürde belirtildiğinden ayrıca bu genin aranması için de PCR testi yapılmıştır [320].



Şekil 6.5 MRSA ve MSSA izolatların *mecA* gen varlığı jel görüntüsü. Bant 1: 100 bp ladder. Bant 2-11: MRSA1-MRSA10 izolatları. Bant 12-21: MSSA1-MSSA10 izolatları. Bant 22: Kontrol



Şekil 6.6 VRE ve VSE izolatların *vanA* ve *vanC* gen varlığı jel görüntüsü. Bant 1: 100 bp ladder. Bant 2-6: VRE1-VRE5 izolatlarının *vanA* gen bant görüntüsü. Bant 7: *vanA* geni negatif kontrol. Bant 8-12: VRE1-VRE5 izolatlarının *vanC* gen bant görüntüsü. Bant 13-17: VSE1-VSE5 izolatlarının *vanC* gen bant görüntüsü. Bant 18: *vanC* geni negatif kontrol. Bant 19: 100 bp ladder

Ancak hiçbir örnekte bu gen tespit edilememiştir. PCR ve MİK değerleri beraber değerlendirildiğinde MRSA5'te *mecA* geninin bulunmasına rağmen MİK değerinin düşük çıkması *mecA* geninin aktif olmadığını göstermektedir.

Vankomisin direnç genleri olan *vanA*, *vanB* ve *vanC* için PCR denemeleri yapılmıştır. VRE suşlarının tamamında *vanA* geni saptanırken *vanB* ve *vanC* geni saptanmamıştır (Şekil 6.6).

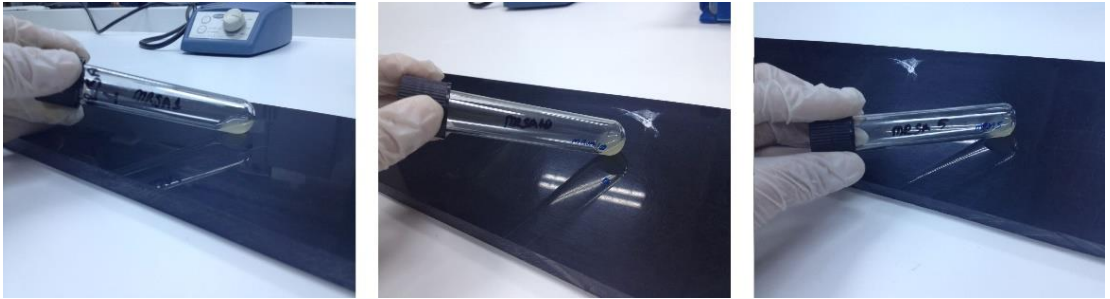
6.4 Koagülaz Test Sonuçları

Metisiline dirençli ve duyarlı *S. aureus* suşları üzerine yapılan koagülaz test sonuçları Tablo 6.3'te verilmiştir. *S. aureus*, hem normal immün tepkisi hem de antimikrobiyal ajanlara karşı yüksek dirençli olabilen fırsatçı bir patojendir. Direnç kısmen bir koagülaz enzim üretimine bağlıdır. Koagülaz, ayrı ayrı bakteriyel hücrelerin veya hücre gruplarının etrafındaki koruyucu fibrin bariyerlerini oluşturmak için normal serum bileşenleriyle birlikte çalışmakta, böylece onları fagositoz ve diğer tipte saldırılardan korumaktadır [321]. Bakterinin yapısında bulunan koagülaz enzimi kalın bir fibrin tabakası oluşturarak mikroorganizmayı fagositozdan koruyarak patojenitesini arttırdığı düşünülmektedir [322]. Koagülaz plazma fibrijonenine bağlandığında organizmaların aglütinasyona veya plazma pıhtılaşmasına neden olmaktadır. [323, 324].

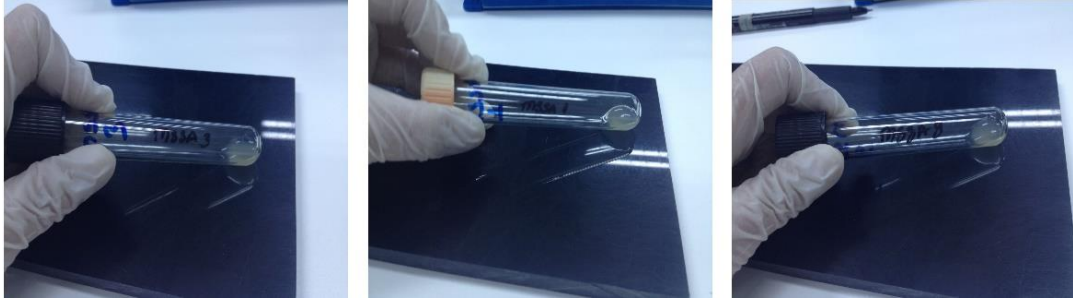
Stafilokoklar çeşitli enzimlere sahiptirler. Bunlardan katalaz enzimi tüm stafilokoklarda bulunurken, koagülaz enzimi bir patojenite kriteri olarak bilinir ve *Staphylococcus* türleri koagülaz pozitif ve negatif olarak ikiye ayrılabilirler. MRSA ve MSSA suşlarına yapılan test ile suşların tamamının koagülaz pozitif olduğu ve patojenite özellik gösterdiği belirlenmiştir. Analiz sonuçlarının bir kısmı Şekil 6.7 ve Şekil 6.8'de resim olarak verilmiştir.

Tablo 6.3 Metisiline dirençli ve duyarlı *S. aureus* suşlarının biyokimyasal özelliği

Mikroorganizma Kodu	Koagülaz
MRSA1	+
MRSA2	+
MRSA3	+
MRSA4	+
MRSA5	+
MRSA6	+
MRSA7	+
MRSA8	+
MRSA9	+
MRSA10	+
MSSA1	+
MSSA2	+
MSSA3	+
MSSA4	+
MSSA5	+
MSSA6	+
MSSA7	+
MSSA8	+
MSSA9	+
MSSA10	+



Şekil 6.7 Bazı MRSA suşlarının koagülaz test sonuçlarının görüntüleri



Şekil 6.8 Bazı MSSA suşlarının koagülaz test sonuçlarının görüntüleri

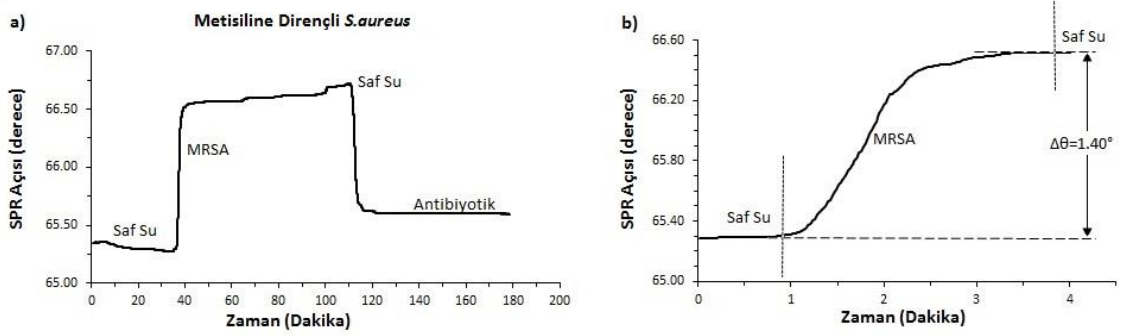
6.5 Bakteriler için Antimikrobiyal Duyarlılık Test Sonuçları

6.5.1 Tekli Mikroakışkan Kanal ile MRSA ve MSSA'nın Antimikrobiyal Duyarlılığının Belirlenmesi

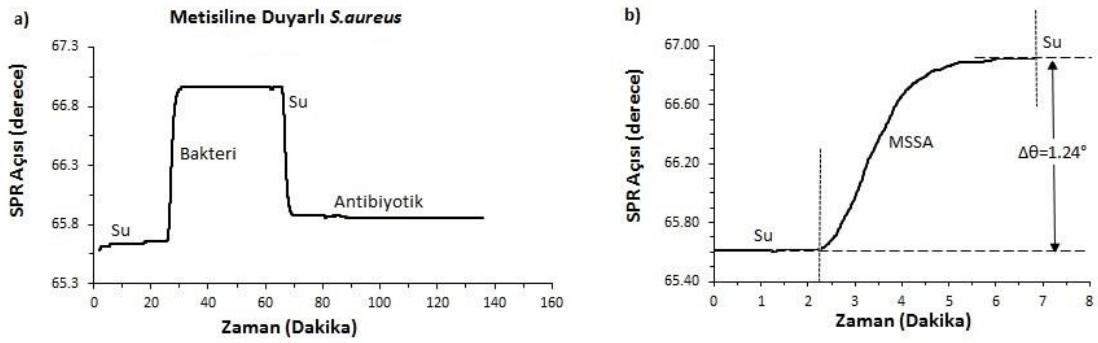
Tek kanallı sistemi optimize etmek için *Staphylococcus subsp. aureus* ATCC 43300 ve *Staphylococcus subsp. aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır. SPR sistemi ile toplam 10 MRSA ve 10 MSSA test edilmiştir. Antibiyotiğe dirençli ve duyarlı *S. aureus*'un SPR açısı kaymaları Şekil 6.9 ve Şekil 6.10'da gösterilmektedir. Sistemin akış hızı 100 $\mu\text{L}/\text{dk}$ olarak belirlenmiştir ve analiz süresi boyunca değiştirilmemiştir. İlk olarak sisteme 30 dk süre ile DI su enjekte edilmiştir ve suya ait bir baseline seviyesi oluşturulmuştur. Birleşme aşamasını gerçekleştirmek üzere sisteme BHI broth içinde inkübe edilmiş bakteri solüsyonu enjekte edilmiştir. Sensör yüzeyine bakterilerin enjeksiyonu peristaltik pompa aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Bakterilerin yüzeye bağlanması için 40-80 dk boyunca stabil bir faz görene kadar enjeksiyon işlemi yapılmıştır. MRSA ve MSSA yüzeye bağlandığında sırasıyla $1,40^{\circ} \pm 0,523853^{\circ}$ ve $1,24^{\circ} \pm 0,570678^{\circ}$ açı kaymaları meydana gelmiştir (Şekil 6.9 ve Şekil 6.10b).

Birleşme aşaması tamamlandıktan sonra, zayıf olarak bağlanmış ve bağlanmamış bakterileri sistemden uzaklaştırmak 25 dk boyunca DI su ile yıkama işlemi yapılarak sensör yüzeyi antibiyotik akışına hazırlanmıştır. Yıkama işleminde SPR açısının hızlı bir şekilde azalması Şekil 6.9 ve Şekil 6.10a'da açıkça görülmektedir. SPR açısı, DI su taban çizgisi seviyesine ulaşmamıştır, ki bu da bakterilerin başarılı bir şekilde yüzeye bağlandığını göstermektedir. Yüzeyde sabit bir bağlanma yanıtı elde edildikten sonra, sisteme antibiyotik çözeltisi (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) enjekte edilmiştir. SPR açısı

kaymaları tüm deneyler sırasında zamana karşı kaydedilmiştir. DeneySEL sonuçlar, 60 dk'lık sefoksitin işleminden sonra, SPR açI kaymalarının duyarlı suşlar için $-0,0280^{\circ} \pm 0,000735^{\circ}$ ve dirençli suşlar için $-0,00072^{\circ} \pm 0,001383^{\circ}$ olduğunu göstermiştir.



Şekil 6.9 Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA 2 suşu)'un zamana bağlı SPR açI kayması: **(a)** Metisiline dirençli *S. aureus*'un sefoksitin antibiyotiğine karşı 60 dk boyunca izlenen SPR açI kaymasının kinetik grafiği; **(b)** dirençli bakteri ilavesinin SPR yanıtı

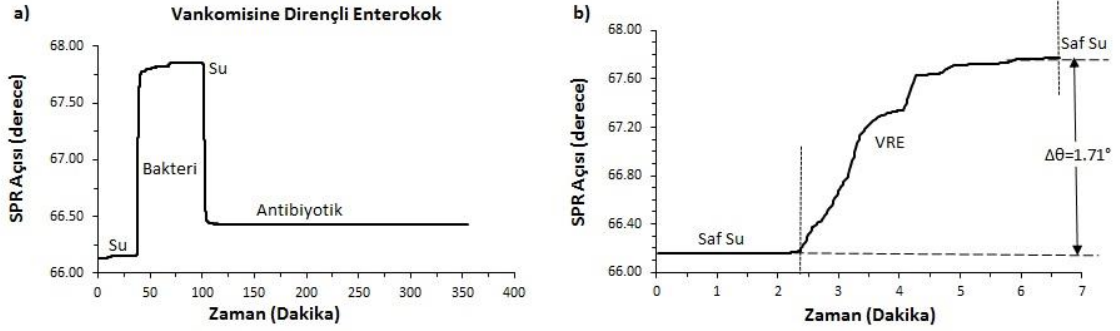


Şekil 6.10 Metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA 7 suşu)'un zamana bağlı SPR açI kayması: **(a)** 60 dk boyunca metisiline duyarlı *S. aureus*'un sefoksitin antibiyotiğine karşı SPR açI kaymasının kinetik grafiği; **(b)** duyarlı bakteri ilavesinin SPR yanıtı

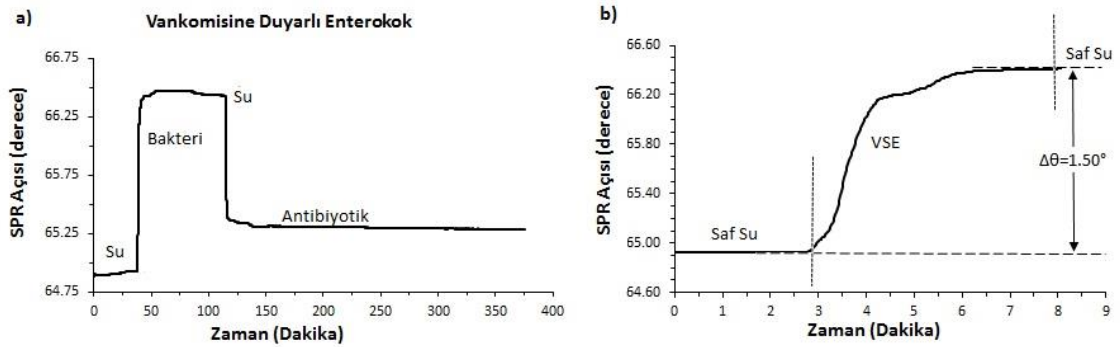
6.5.2 Tekli Mikroakışkan Kanal ile VRE ve VSE'nin Antimikrobiyal Duyarlılığının Belirlenmesi

Tek kanallı sistem için optimum koşulları belirlemek amacıyla, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve *Enterococcus faecium* B764A kullanılmıştır. Daha sonra tek kanallı

sistemde toplam 10 adet VRE ve 10 adet VSE suşları test edilmiştir. Sistemin akış hızı 100 µL/dk olarak belirlenmiştir ve analiz süresi boyunca değiştirilmemiştir. Bakterilerin yüzeye bağlanma deneyi için, SPR sistemine öncelikle 30 dk boyunca DI su bir peristaltik pompa aracılığıyla enjekte edilmiştir ve daha sonra VRE ve VSE izolatlarının 200 µg/mL oranında poly-L-lysine immobilize edilmiş yüzeye bağlanmasını test etmek için ölçümler yapılmıştır.



Şekil 6.11 Vankomisine dirençli *Enterococcus* (VRE 5 suşu) zamana bağlı SPR açısı kayması: **(a)** Vankomisine dirençli *Enterococcus*, vankomisin antibiyotiğine karşı 200 dk boyunca SPR açısı kaymasının kinetik grafiği; **(b)** dirençli bakteri ilavesinin SPR yanıtı



Şekil 6.12 Vankomisine duyarlı *Enterococcus* (VSE 8 suşu) zamana bağlı SPR açısı kayması: **(a)** Vankomisine duyarlı *Enterococcus* 200 dakika boyunca vankomisin antibiyotiğine SPR açısı kaymasının kinetik grafiği; **(b)** duyarlı bakteri ilavesinin SPR yanıtı

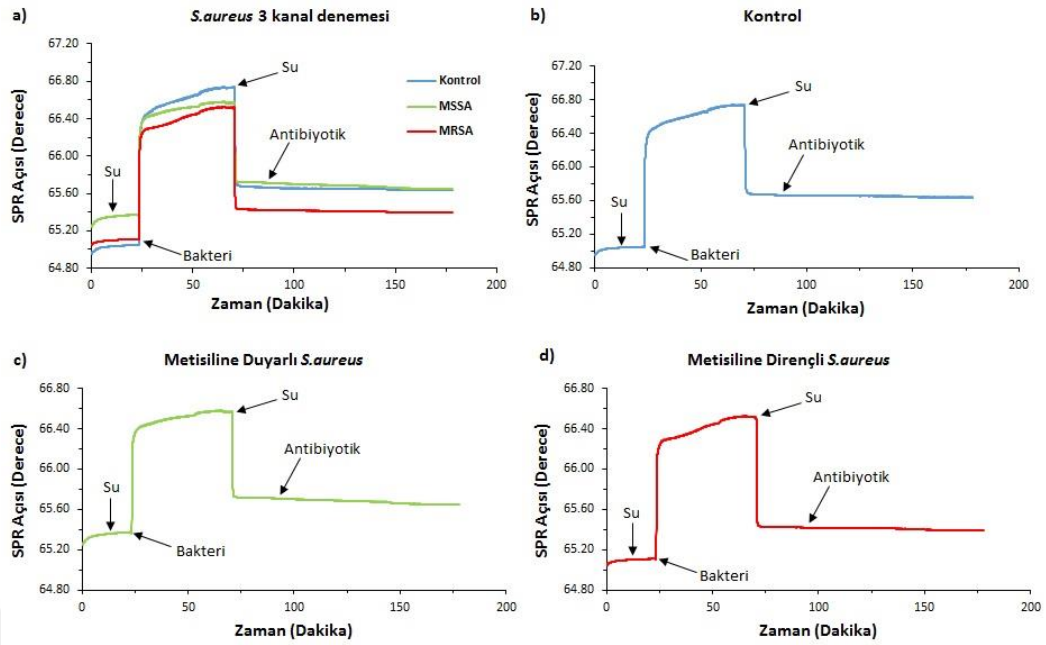
Bakterilerin yüzeye bağlanması ve stabil bir faz oluşumunu gözlemlemek için 60-75 dk boyunca enjeksiyon işlemi yapılmıştır. Bakterilerin sisteme enjekte edilmesi, dirençli suş için $1,71^\circ \pm 0,697409^\circ$, duyarlı suş için $1,50^\circ \pm 0,662909^\circ$ sinyal artışı ile

sonuçlanmıştır (Şekil 6.11 ve Şekil 6.12b). Bakterilerin çip üzerindeki poly-L-lysine bağlanmasından sonra, bağlanmamış bakterileri uzaklaştırmak için 25 dk DI su ile yıkama yapılmıştır. SPR açısı kaymalarının, 200 dk'lık vankomisin işleminden sonra, duyarlı suşlar için $-0,02489^{\circ} \pm 0,008638^{\circ}$ ve dirençli suşlar için $-0,00033^{\circ} \pm 0,000261^{\circ}$ olduğu bulunmuştur (Şekil 6.11 ve Şekil 6.12a). Duyarlı ve dirençli *Enterococcus* spp. arasında SPR açısı kayma sonuçlarında on kat fark bulunmuştur.

6.5.3 Üçlü Mikroakışkan Kanal ile MRSA, MSSA VRE ve VSE'nin Antimikrobiyal Duyarlılığının Belirlenmesi

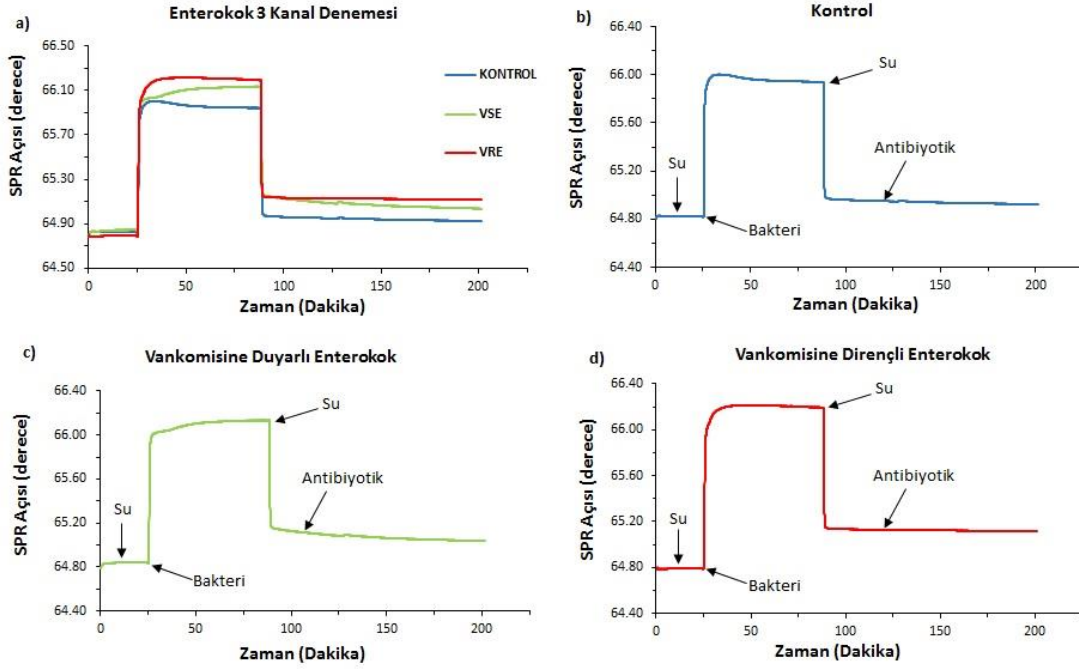
Üçlü mikroakışkan kanal, antibiyotiğe dirençli ve duyarlı *S. aureus*'un SPR açısı kaymalarını aynı anda gözlemlemek için kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 6.13a' da gösterilmiştir. Sistemden açısı derecesi olarak elde edilen veriler, grafiği daha anlaşılır hale getirmek için ayrı grafiklere dönüştürülmüştür (Şekil 6.13b-d). Tek kanalda yaptığımız gibi, aynı işlem adımları üçlü mikroakışkan kanal üzerinde gerçekleştirilmiştir. DI su ile bir taban çizgisi oluşturulduktan sonra, sefoksitin yüzeye ~100 dk boyunca uygulanmıştır. SPR açısı kaymalarının, duyarlı suşlar için $-0,260^{\circ} \pm 0,019326^{\circ}$ ve dirençli suşlar için $-0,030^{\circ} \pm 0,008769^{\circ}$ ve kontrol örneği olarak kullanılan *E. coli* için $-0,090^{\circ} \pm 0,007347^{\circ}$ olduğu bulunmuştur.

Üçlü mikroakışkan bir kanal ile *Enterococcus*'un vankomisine karşı antimikrobiyal duyarlılık testini yapmak için, poly-L-lysine kaplı çip analizden önce sisteme monte edilmiştir. Yukarıda tarif edilen prosedür tüm *Enterococcus* suşlarına uygulanmıştır. Vankomisin, 25 µL/dk'da 100 dk boyunca altın çip yüzeyine gönderilmiştir. Üçlü mikroakışkan kanal ile gerçekleştirilen *Enterococcus*'un ölçüm sonuçları Şekil 6.14'te gösterilmektedir. *Enterococcus*'un toplam yansıtma değişikliklerinin, duyarlı suşlar için $-0,090^{\circ} \pm 0,006611^{\circ}$, dirençli suşlar için $-0,010^{\circ} \pm 0,003734^{\circ}$ olduğu bulunmuştur. Kontrol numunesi olarak kullanılan *E. coli* için açısı değişimi $-0,050^{\circ} \pm 0,011958^{\circ}$ olarak tespit edilmiştir.



Şekil 6.13 (a) Çok kanallı sistemde sefoksitin enjeksiyonuna karşı antibiyotiğe dirençli ve duyarlı *S. aureus* için gerçek zamanlı SPR kinetik eğrisi. **(b)** Kontrol örneği, *E. coli*. **(c)** Metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA7 suşu). **(d)** Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA2 suşu)

Bu tez çalışmasında, geleneksel yöntemleri kullanmak yerine antibiyotiğe dirençli bakterilerin durumunu test etmek için çevrimiçi eş zamanlı bir yöntem geliştirilmiştir. Bu tez çalışmasının yenilikçi yönü, yerel olarak üretilen bir SPR sistemi ve bu sistem için çoklu mikroakışkan kanal tasarımı olmasıdır. Altın çipin yüzeyi, çoklu mikroakışkan kanal ile üç bölüme ayrılmıştır. Çipin yüzeyi gerçek zamanlı olarak aynı anda immobilize edilmiştir. Çoklu bir mikroakışkan kanalda başarılı olmak için deneyler ilk önce tek bir kanal üzerinde test edilmiştir. Tüm deneylerin açı kaymaları, dirençli ve duyarlı suşlar arasındaki farkın yaklaşık on kat veya daha fazla olduğunu göstermiştir. Benzer sonuçlar, Chiang, vd. [108] tarafından yapılan çalışmada, *E. coli* JM109'un ampisiline duyarlı ve dirençli suşları arasında on kat fark olduğunu göstermiştir. Antibiyotik uygulamasının duyarlı suşların bakteriyel hücre duvarının yapısında değişikliklere neden olduğu ve kırılma indisini azalttığı bulunmuştur. Dirençli suşlar, antibiyotik uygulaması sırasında duyarlı suşlara kıyasla neredeyse sabit bir açığa sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, duyarlı suşların açı kaymalarının hücre duvarı sentezinin antibiyotiklerle inhibe



Şekil 6.14 (a) Çok kanallı sistemde vankomisin enjeksiyonuna karşı antibiyotiğe dirençli ve duyarlı enterokoklar için gerçek zamanlı SPR kinetik eğrisi. **(b)** Kontrol örneği, *E. coli*. **(c)** Vankomisine duyarlı *Enterococcus* (VSE 8 suşu). **(d)** Vankomisine dirençli *Enterococcus* (VRE 2 suşu)

edilmesinden kaynaklandığını göstermiştir. Öte yandan, bakteriler büyük bir SPR açısı kaymasına sahip olduğu için antibiyotik ilavesinden sonra elde edilen SPR sinyalinin değişimi ince görünmektedir. Bu nedenle, bakterilerin antibiyotik akışından etkilenip etkilenmediği yapılan hesaplamalardan sonra elde edilen sonuçlarla belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında MRSA, MSSA, VRE ve VSE'yi saptamak için test süresinin 24 saatten az olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar, MRSA ve VRE suşlarını araştırmak için farklı yöntemler kullanmışlardır [231, 325]. Bu yöntemler arasında en yaygın yöntem broth mikrodilüsyon yöntemidir [326]. Ancak, bu yöntem bu tez çalışmasından daha uzun bir test süresi gerektirmektedir. Cansizoglu, vd. [327] antimikrobiyal duyarlılığın hızlı ve hassas bir şekilde saptanması için yeni bir platform geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, minimum inhibisyon bakteri konsantrasyonu, farklı bir kırılma açısına sahip iki ortam arasındaki kırılma indeksindeki değişiklikler kullanılarak hızlı bir ultra duyarlı detektör (RUSD) ile 2 ila 4 saat içinde ölçülmüştür. Lupetti, vd. [328] tarafından yapılan başka bir

çalışmada, Gram-pozitif kokların hızlı tanımlanmasına ve antimikrobiyal duyarlılık testine dayanan bir BD (Becton Dickinson) phoenix sistemi kullanılmıştır. Bu tez çalışmasının verileri, BD sistemi ile yapılan mevcut yöntemin verilerinden 12-24 saatten daha erken sürede elde edilmektedir. Sonuçlarımız bu iki çalışmanın bulgularıyla da tutarlıdır.

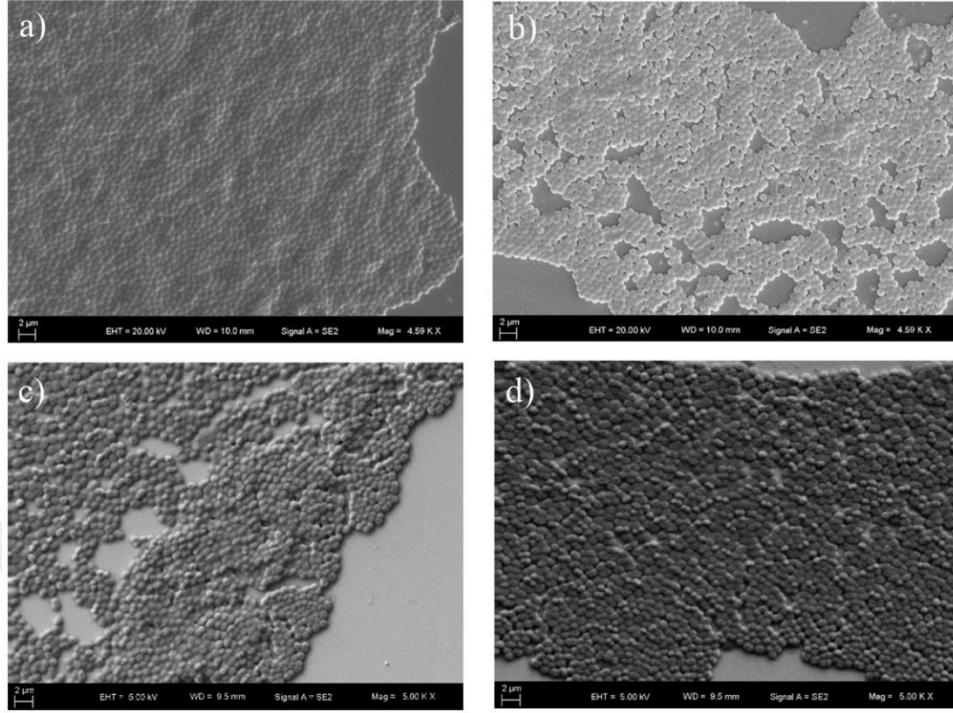
Entegre çok kanallı platformlar, tanımlama platformlarının maliyetini düşürme potansiyeli sunmaktadır [329]. Çok kanallı platformumuz bir çip yüzeyini üç veya daha fazla bölüme ayırdığından, çoklu algılama tek bir sensör üzerinde gerçekleştirilebilmektedir. Bu analitik yaklaşımla, bu platform sadece antimikrobiyal duyarlılık testlerinde değil, aynı zamanda farklı immobilizasyon yöntemleri kullanılarak diğer klinik tespit yöntemlerinde de kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Ayrıca, tek bir mikroorganizma 3 kanallı sistemle aynı anda birden fazla antibiyotik testine tabi tutulabilmektedir.

Geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında, tez çalışmasının sonuçları SPR platformunun literatürde kullanılan diğer yöntemlere göre daha hızlı ve daha az emek gerektirdiğini göstermektedir [330]. Öte yandan, substrata bakteri yapışması ve yapışma stabilitesindeki anormallikler SPR sisteminin dezavantajlarıdır. Bu tez çalışmasında, bakteri kültürü bir inkübatörde inkübe edilmiştir ve daha sonra sistemde antibiyotiğe karşı davranışı izlemek için kullanılmıştır. Gelecekteki çalışmada, bu iki adım gerçek zamanlı olarak birleştirilebilir ve incelenebilir. Bunu yapmak için, akan bir sistem yerine birden fazla delik tasarlanabilir. Ek olarak, azalan bakteri sayımları kantitatif analizle hesaplanabilir.

6.5.4 Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) ile Görüntüleme Sonuçları

Yüzeyde MRSA, MSSA, VRE ve VSE varlığını ve bağlanmasını gözlemlemek için antibiyotik enjeksiyonu olan ve olmayan sensör çiplerinin SEM mikromorfolojisi analiz edilmiştir. MRSA, MSSA, VRE ve VSE suşları için SEM görüntüleri Şekil 6.15 ve 6.16'da gösterilmektedir. Antibiyotik uygulamasında sonra elde edilen görüntüler ile antibiyotik uygulaması olmadan elde edilen görüntüler arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuç, SPR sisteminin SEM cihazından daha doğru

ölçümler aldığını göstermiştir. SEM sonuçları ayrıca bakterilerin poly-L-lysine kaplı yüzeye başarılı bir şekilde bağlandığını göstermiştir.



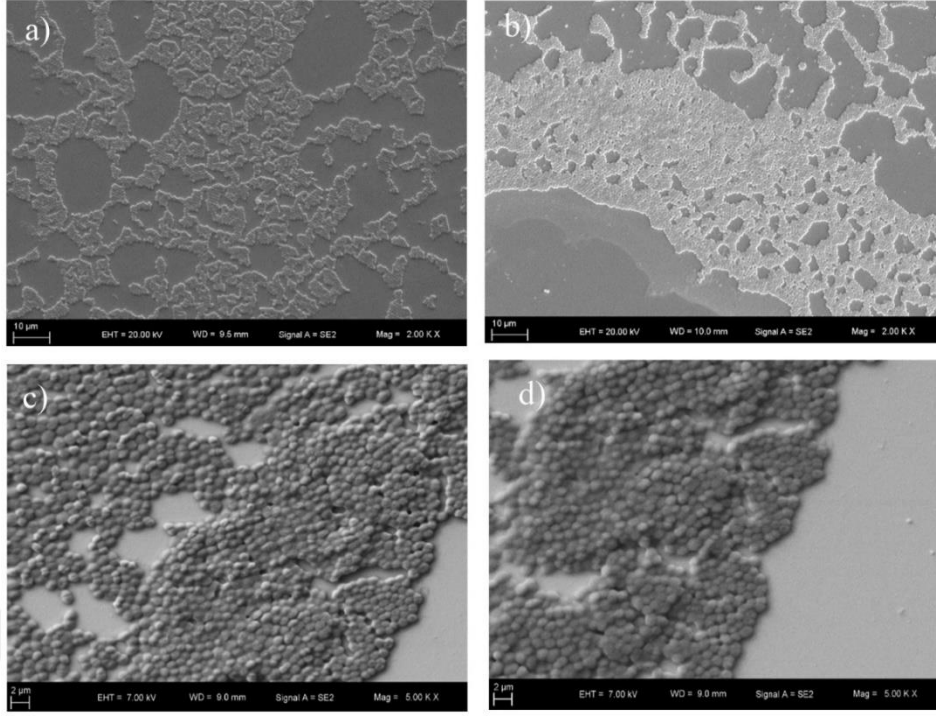
Şekil 6.15 Antibiyotik enjeksiyonu yapılmayan bakterilerin SEM mikrografları. **(a)** 4.59 KX büyütmede metisiline dirençli *S. aureus*; **(b)** 4.59 KX büyütmede metisiline duyarlı *S. aureus*; **(c)** 5 KX büyütmede vankomisine dirençli *Enterococcus*; **(d)** 5 KX büyütmede vankomisine duyarlı *Enterococcus*

6.6 MRSA için Kantitatif Analiz Sonuçları

Hastane veya gıda kaynaklı bakterilerin tespiti için protein G tabanlı immobilizasyon yapılan altın yüzey SPR sisteminde kullanılmıştır. Bu sistemde cihazın optimizasyonu sağlamak için *mecA* genini taşıyan ve metisiline direnci olduğu bilinen *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 43300 ile tek kanalda denemeler gerçekleştirilmiştir. Daha sonra aynı anda birden fazla bakterinin tespiti için tasarlanan kanal ile eş zamanlı ve gerçek zamanlı analizler gerçekleştirilmiştir.

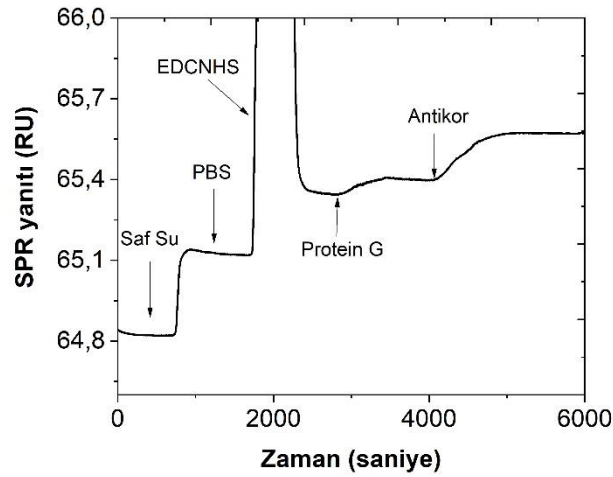
6.6.1 Antikorların İmmobilizasyonu

Yüzeyde 11-MUA ile SAM oluşturulduktan sonra EDC/NHS kimyası ve protein G kullanılarak antikorun yüzeye immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 6.17). mAb'lerin MRSA'ya karşı konjugasyonu RU'da meydana gelen değişimler ile anlaşılmıştır. Protein G'ye antikorlar bağlandıktan sonra RU'da artış meydana



Şekil 6.16 Antibiyotik uygulanan bakterilerin SEM mikrografları. **(a)** 2 KX büyütmede metisiline dirençli *S. aureus*; **(b)** 2 KX büyütmede metisiline duyarlı *S. aureus*; **(c)** 5 KX büyütmede vankomisine dirençli *Enterococcus*; **(d)** 5 KX büyütmede vankomisine duyarlı *Enterococcus*

gelmiştir. Yüzeye antikor gönderdikten sonra yapılan PBS ile yıkamada yüzeyden herhangi bir ayrılma meydana gelmediği için RU da azalma görülmemiştir.

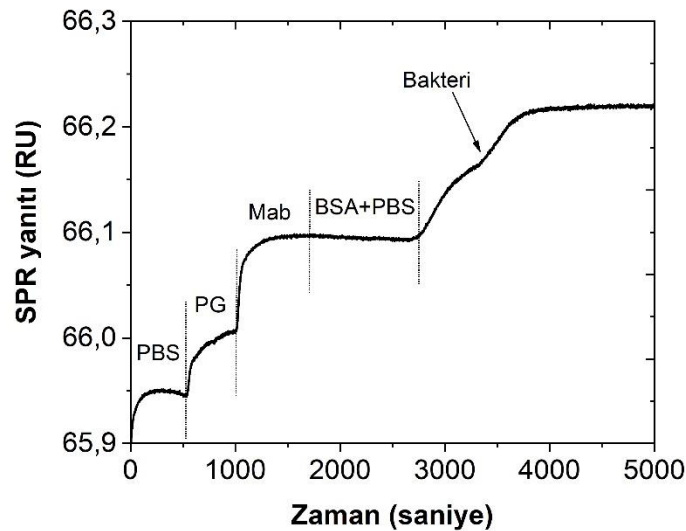


Şekil 6.17 Yüzeyin işlevselleşmesine bağlı sistemde meydana gelen SPR yanıtını gösteren sensogram

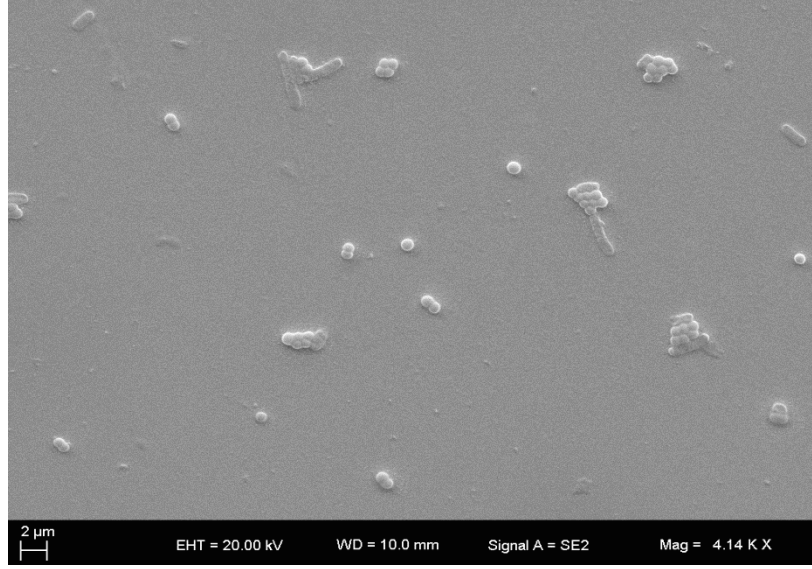
6.6.2 Tek Kanal ile Bakteri Tespiti

Protein G tabanlı sistem ile yüzeye bağlanan monoklonal anti-*S. aureus* antikoru aracılığıyla tek kanallı SPR sisteminde *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 43300, $\sim 10^6$ KOB/mL konsantrasyonunda PBS içinde 8 $\mu\text{L}/\text{dk}$ hızla peristaltik pompa aracılığıyla modifiye edilmiş altın çip yüzeyine gönderilmiştir (Şekil 6.18). Sisteme bakterinin gönderilmesi ile RU'da bağlanmaya bağlı olarak değişim meydana gelmiştir. Bakterinin yüzeye bağlanma açısı $0,120^\circ$ olarak hesaplanmıştır. Bağlanan bakterilerin görüntüsü taramalı elektron mikroskopu ile görüntülenmiştir (Şekil 6.19).

MRSA suşlarının kalibrasyon eğrisini çizebilmek için çip yüzeyi 11-MUA ile kaplandıktan sonra 0,4 M EDC ve 0,1 M NHS oranında hazırlanan kimyasal serbest karbonil grupları aktifleştirmek için yüzeye 8 $\mu\text{L}/\text{dk}$ olacak şekilde gönderilmiştir. Daha sonra yüzeye gönderilen protein G ile antikorların immobilizasyonu sağlanmıştır. Yüzeyde serbest kalan ve özgül olmayan bağlanmalara neden olabilecek bölgeler 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oranında BSA gönderilerek bloke edilmiştir. BSA'dan sonra yüzeye PBS gönderilerek sabit bir taban çizgisi oluşması sağlanmıştır. Bu şekilde yüzeyin işlevselleştirilmesi gerçekleştirilmiştir.

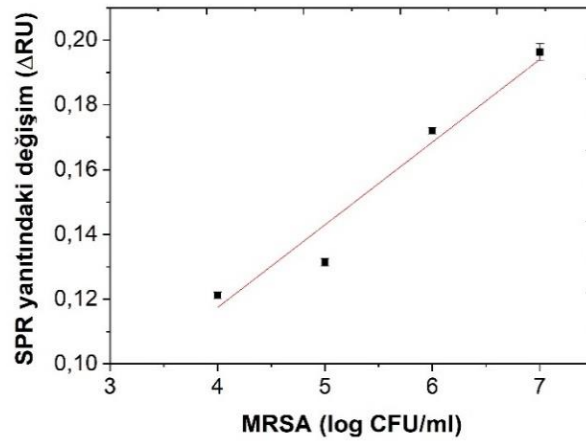


Şekil 6.18 İşlevselleştirilmiş yüzeyde bakterinin bağlanmasını gösteren sensogram



Şekil 6.19 Protein G tabanlı immobilizasyon ile altın yüzeyine bağlanan MRSA'ların SEM görüntüsü

Daha PBS içerisinde bakteriler gönderilmiştir. Yüzeye bakteriler en düşük konsantrasyondan ($\sim 10^1$ - 10^7 KOB/mL) başlanarak gönderilmiştir. Çalışma aralığı 4-7 log CFU/mL olarak bulunmuştur. MRSA'ya ait kalibrasyon eğrisi Şekil 6.20'de gösterilmiştir. MRSA konsantrasyonuna bağlı olarak SPR yanıtındaki değişimin regresyon denklemi $y=0,0266x + 0,0089$ ve determinasyon katsayısı (R^2) ise 0,9568 olarak bulunmuştur.



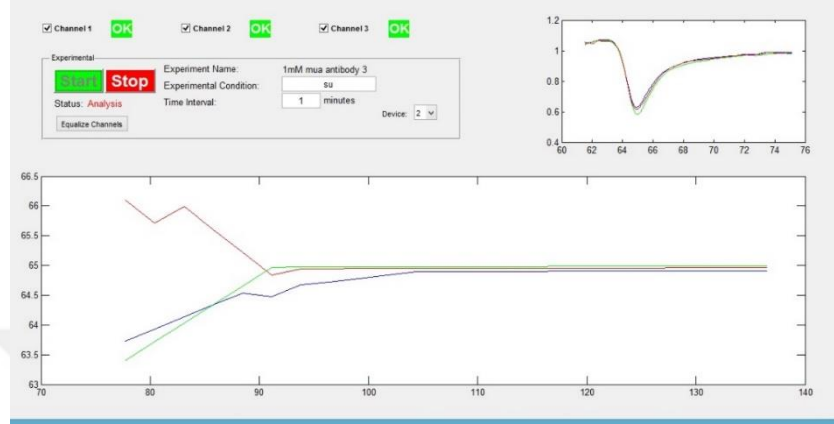
Şekil 6.20 Çeşitli konsantrasyonlarda MRSA'nın altın yüzeye bağlanması sonucunda RU'da meydana gelen değişimin eğrisi

SPR sistemlerinde çip yüzeyinin işlevselleştirilmesinde, pH, monolayer tipi, immünoassay ajanları ve deney formatı sistemin optimize edilmesinde kullanılacak çeşitli parametrelerdir. SAM oluşturmak için genel olarak 11-MUA kullanılmaktadır. Mevcut olan kaplama metaryaline alternatif olarak; tri ve hekza etilen glikol ile sonlanan alkan monotiyol yüzeyi bir çalışmada geliştirilmiştir [331]. Gerçekleştirilen bu çalışmada, *E. coli* O157:H7'ye karşı saflaştırılmış monoklonal (mAb) ya da poliklonal (pAb) antikorlar aktive edilmiş bir sensör çipi üzerinde immobilize edilmiş ve *E. coli* O157:H7'yi tespit etmek için doğrudan ve sandviç yöntemleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca protein G tabanlı algılamanın etkisi ve birincil ve ikincil antikor konsantrasyonlarının sandviç testine etkisi araştırılmıştır. Sandviç yöntemiyle yaklaşık olarak 10^3 KOB/mL oranında *E. coli* O157:H7 saptanmıştır. Direkt yöntem ve protein G tabanlı sistemde sırasıyla 10^6 KOB/mL ve 10^4 KOB/mL oranında *E. coli* O157:H7 saptanmıştır. Sonuçlar, alkanetiyol SAM tabanlı SPR biyosensörünün sandviç testi kullanılarak hızlı ve spesifik bir şekilde *E. coli* O157:H7'yi saptama potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmadan elde edilen veriler tez çalışması ile uyumludur.

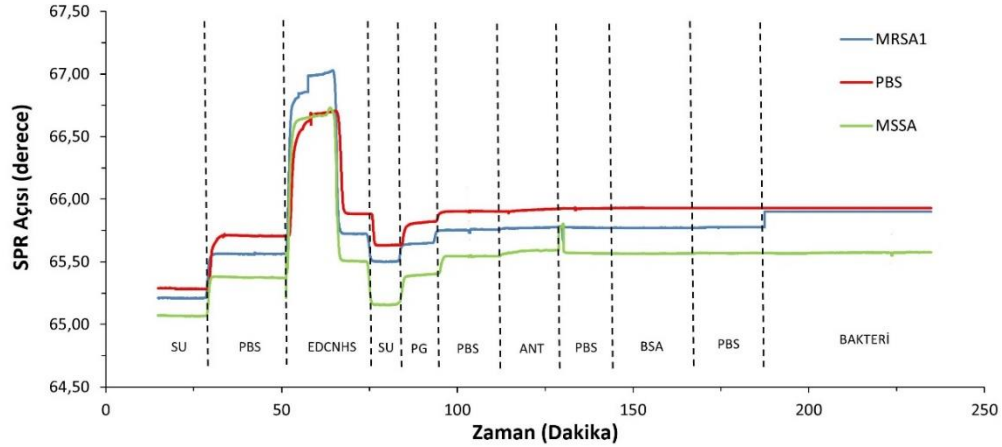
6.6.3 Çok Kanallı Sistem ile Bakterilerin Tespiti

Tek kanal ile sistemin optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra 3 kanallı sistemde denemelere geçilmiştir. Temin edilen 10 adet MRSA klinik izolatlarının eş zamanlı ve online olarak tespiti çoklu olarak gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilmiş sensör üzerine kaplanan antikorlar hedef mikroorganizmaları yakalamış ve mikroorganizmaların yüzeyde gelişimi anlık olarak saptanabilmiştir. Şekil 6.21'de üç kanallı sistemin yazılımının görüntüsü verilmiştir. Sisteme ilk olarak, steril saf su gönderilmiştir. Birinci, ikinci ve üçüncü kanalda sistemin saf suyu algılamasıyla beraber **OK** işareti yanmıştır. Yazılımda saf suyun SPR sisteminde meydana getirdiği açının rezonans değeri ile oluşan grafik sistemin çalışılır durumda olduğunu gösterdikten sonra sisteme sırasıyla PBS, EDC/NHS karışımı, PBS, su, protein G, antikor ve BSA akışı peristaltik pompa aracılığıyla sağlanmıştır. Daha sonra pozitif kontrol olarak MRSA ($\sim 10^6$ KOB/mL) ve negatif kontrol olarak *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213 ($\sim 10^6$ KOB/mL) sisteme gönderilmiştir. Referans kanalda PBS kullanılmıştır. Analiz sonucunda referans kanalda herhangi bir değişim

meydana gelmemiştir. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213 SPR açısında bir değişim meydana getirmezken, MRSA 0,150°'lik bir açı kayması oluşturmıştır (Şekil 6.22). Klinik örneklerin tamamına uygulanan denemeler sonucunda açı kaymasının 0,110°-0,150° arasında değiştiği belirlenmiştir.



Şekil 6.21 Üç kanallı SPR sisteminin yazılım görüntüsü; Kanal 1: Kırmızı; Kanal 2: Yeşil; Kanal 3: Mavi renkli sinyal



Şekil 6.22 Üç kanallı SPR sisteminde antikor yakalanması ve bakteri bağlanması deneyi; MRSA1: Pozitif Kontrol, PBS: Referans Kanal, MSSA: Negatif Kontrol

Protein G, immüoglobülin G'nin (IgG) Fc kısmı ile spesifik bir etkileşim sergilediğinden, geliştirdiğimiz biyosensör sistemi antikoru olan tüm mikroorganizmalara kolaylıkla uyarlanabilir bir model sistem olarak tasarlanmıştır. Biyosensör sisteminde hiçbir değişiklik yapmadan sadece uygun antikorlar kullanılarak, tüm antikoru olan mikroorganizmaların tespit edilmesine olanak

sağlamaktadır. Protein G tabanlı immobilizasyon tekniği MRSA örnekleri için SPR’de tanımlamada daha önce literatürde kullanılmamıştır. Ancak Tokel, vd. [332] yaptığı bir çalışmada, tez çalışmasında kullanılan protein G tabanlı yüzey kimyası kullanılarak anti-*E. coli* antikor aracılığıyla *E. coli* yakalanmıştır. Kullanılan sistem ile $\sim 10^5$ ve $3,2 \times 10^7$ KOB/mL konsantrasyon aralığında *E. coli* saptanabilmiştir. Bu sonuçlar gerçekleştirilmiş olan tez çalışmasının sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Oh, vd. [333] *Salmonella* Typhimurium’u 10^2 - 10^9 KOB/mL ve *Legionella pneumophila* 10^5 KOB/mL aralığında tespit etmek için protein G ile 11-MUA kullanmışlardır [334]. Ayrıca SAM üzerinde bir protein G katmanı bulunan SPR biyosensörünü kullanarak 10^2 - 10^7 KOB/mL seviyesine kadar *Salmonella* Paratyphi’yi saptamıştır [335]. Literatürde bildirilen bu çalışmalar ile tezde tasarlanmış olan protein G tabanlı sistem karşılaştırıldığında, tezde kullanılan sistemin başarılı bir şekilde çalıştığı görülmektedir.

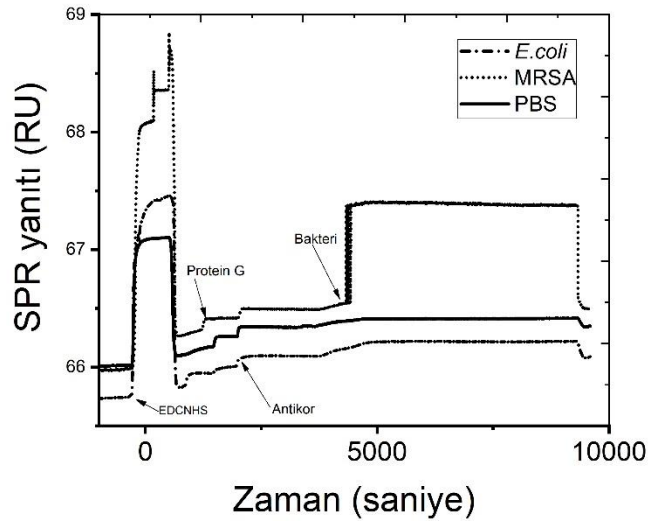
Geliştirilen kanal sistemi ile aynı anda bir çip üzerinde gerçek zamanlı olarak farklı üç analiz gerçekleştirilebilmektedir. Çoklu kanal SPR sistemleri daha önceden yapılan çalışmalarda da bildirilmiştir. *E. coli* O157:H7, *Salmonella choleraesuis* serotype Typhimurium, *L. monocytogenes* ve *Campylobacter jejuni* çok kanallı bir SPR sistemi ile kantitatif ve eş zamanlı olarak tespit edilmiştir [336]. Bu çalışmanın dinamik aralığı tez çalışması ile benzerlik göstermektedir.

MRSA penisilin vb. antibiyotiklere direnç göstermektedir. MRSA’nın tespitine bu antibiyotiklere karşı sergiledikleri davranışa göre dirençli olup olmadıkları konusunda karar verilmektedir [337]. Tawil, vd. [264] tarafından yapılan bir çalışmada, 250 adet *S. aureus* klinik izolatının β -laktam antibiyotiklere karşı duyarlılıkları incelenmiştir. Bunların 16’sı MSSA, 207’si MRSA ve 27 adedi sınırda oksasiline dirençli *S. aureus* olduğu belirlenmiştir. β -laktam antibiyotiklere karşı düşük afiniteye sahip penisilin bağlayıcı protein 2a (PBP2a) özelliğinden yararlanılarak MRSA, MSSA ve BORSA birbirinden ayırt edilebilmiştir.

Çapraz reaktivite biyolojik sistemlerde büyük bir sorundur. Bu amaçla kullandığımız antikorun MRSA’ya karşı özgüllüğünü kanıtlamak amacıyla aynı analiz koşullarında modifiye edilmiş altın çip yüzeyine MSSA yerine *E. coli* ATCC 25922, $\sim 10^6$ KOB/mL konsantrasyonunda çapraz reaksiyon olup olmadığını

saptayabilmek için sisteme gönderilmiştir. *E. coli* ATCC 25922 yüzeye gönderildikten sonra SPR açısında önemli bir değişiklik olmamıştır (Şekil 6.23).

Kullanılan antikorun bakteriye olan özgüllüğünü belirleyebilmek için kontrol bakterisi ile aynı analizler gerçekleştirilebilmektedir. Tez çalışmasında anti-MRSA antikorunun spesifitesini belirlemek için negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanılmıştır. Baccar, vd. [338] tarafından yapılan bir çalışmada SPR tabanlı bir biyosensör geliştirilmiştir. Bu çalışmada biyolojik tanımlama ajanı olarak anti-*E. coli* antikoru kullanılmıştır. Çapraz reaktiviteye bakmak için ise *Lactobacillus* kullanılmıştır. Tez çalışmasında olduğu gibi herhangi bir bağlanma meydana gelmemiştir.



Şekil 6.23 Anti-MRSA antikorunun MRSA bakterisine özgüllüğü

MRSA saptanmasında çok farklı sistemler kullanılabilmektedir. Louie, vd. [339] tarafından yapılan bir çalışmada MRSA'nın saptanması için üç farklı yöntem kullanılmıştır. Prob temelli Velogene Hızlı MRSA tanımlama testi, lateks aglütinasyon MRSA-Screen ve BBL Crystal MRSA ID Sistemi kullanılmıştır. Kullanılan yöntemler birbirleriyle kıyaslanmıştır. Başka bir çalışmada [92], *E. coli* O157:H7 ve MRSA, SPR aracılığıyla tanımlama elemanı olarak bakteriyofaj kullanılarak saptanmıştır. *E. coli*'yi saptamak için T4 bakteriyofajı, *S. aureus* için BP14 bakteriyofajı kullanılmıştır. İşlevselleştirilen bu sistem ile 10^3 KOB/mL konsantrasyonda bakteri 20 dk'dan daha az bir süre içerisinde saptanabilmiştir. Bu

şekilde geleneksel metotlarla karşılaştırıldığında biyosensör sistemlerinin daha hızlı sonuçlar verdiği kanıtlanmaktadır.

Bu tez çalışması protein G tabanlı immobilizasyon ve çok kanallı SPR sistemi ile bakterilerin tespitini kısa sürede ve eş zamanlı olarak gerçekleştirebileceğini göstermiştir. Ancak sistemden alınan SPR sinyalinin düşük olması yeni immobilizasyon yöntemlerinin geliştirilmesi gerekliliğini göstermektedir.

6.7 Kanser Biyomarker Tespit Sonuçları

Tezin bu aşamasında Amerika Bileşik Devletleri'nde bulunan Connecticut Üniversitesi'nin Kimya Bölümünde bulunan SPRi cihazı kullanılmıştır. Çalışmanın başında yapılan deneylerde 25 spot içeren çiplere PSA antijeni uygulanmıştır. Bu çalışmalarda PSA antijenin optimizasyonu yapılarak kalibrasyon grafiği ve belirlenme sınırı belirlenmiştir. Daha sonra yapılan deneylere piyasada 25 spot içeren çip üretiminin olmamasından dolayı 16 spot içeren çipler ile devam edilmiştir. Ancak 25 spot içeren çip için uygulanan prosedür, 16'lı için kullanıldığında sistemden sonuç alınamamıştır. Bunun nedeni, 25 spot içeren çipte kullanılan spotların daha küçük olması ve 16 spot içeren çipi üretmek için kullanılan camın kalınlığının 25'liden daha fazla olması ve bununda refraktif indeksteki değişimleri etkilemesinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Bu tespitten sonra çalışmanın geri kalanında 16 spot içeren çipler için rejenerasyon metodu ve optimizasyon koşulları belirlenmiştir. Daha sonra tek bir çip üzerinde çoklu tespitler gerçekleştirilmiştir.

Prostat kanseri veya diğer kanser türlerinin teşhisi ve evresi hakkında bilgi vermesi amacıyla mikroakışkan kanal temelli SPRi sistemi kullanılarak birden fazla biyomarkerın çoklu tespiti gerçekleştirilmiştir. SPRi kullanarak yüzeyde meydana gelen değişimler hem kalitatif hem de kantitatif olarak ölçülmüştür. PSA ölçümüne dayalı testler prostat kanseri taraması için büyük öneme sahiptir. Prostat kanserinin teşhisi ve evresinin belirlenmesinde proteinlerin saptanması için çoklu ve manyetik partikül esaslı bir immünoanaliz mikroakışkan sistemli SPRi sisteminde kullanılmıştır. SPRi sisteminde gerçekleştirilen çoklu analiz sayesinde sadece prostat değil diğer bazı kanser türlerinin teşhisi ve evresi hakkında da bilgi elde edilebilecektir. Bu çalışmada ilk başta prostat spesifik antijeni için çalışmalar

gerçekleştirilmiştir. Sistemin duyarlılığı ve seçiciliği üzerine genel bilgiler edinildikten sonra çoklu tespit için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

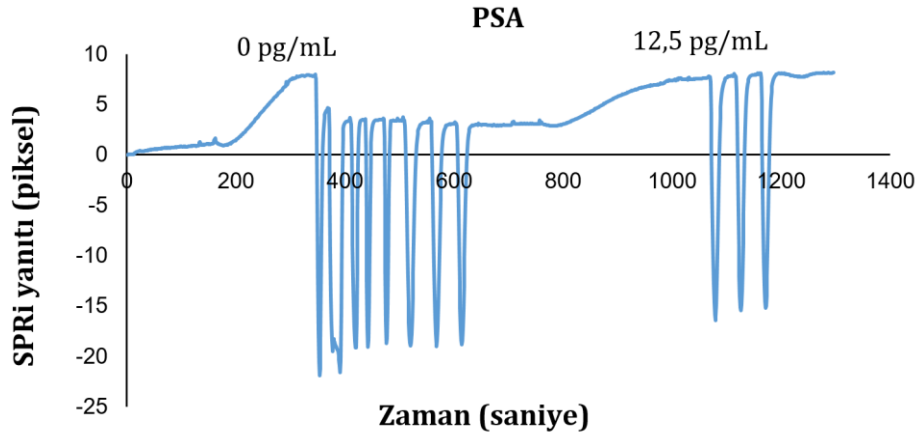
6.7.1 Rejenerasyon Metodunun Belirlenmesi

Sensör çip yüzeyi, deney sırasında yeniden kullanılmak üzere rejenere edilebilmektedir. Rejenerasyon, analitin çıkarılması gerektiği, ancak ligandın yüzey üzerinde sağlam kalması gerektiği anlamına gelmektedir. Bunu yapmak için, rejenerasyon koşullarının ligandda geri dönüşü olmayan hasara neden olmaması gerekmektedir. Rejenerasyon şartlarının belirlenmesi için PSA standart olarak kullanılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda süre ve rejenerasyon sıvısının kullanılma sayısı hakkında optimizasyonlar yapılmıştır. Ligand-analit kompleksinin kapalı oranı yüksekse, analit yüzeyden kısa sürede ayrışabilmektedir. Bununla birlikte, bu çalışmada ligand-analit kompleksinin kapalı oranı düşük olduğu için çoklu analit enjeksiyonlarının yürütülmesi için bir rejenerasyon adımı gerçekleştirilmiştir. Çipin yüzeyini yenilemek için 10, 20, 50 ve 100 mM NaOH ve 10, 20, 50 ve 100 mM HCl'nin değişen konsantrasyonu kullanılmıştır. Her NaOH ve HCl konsantrasyonu için ayrı ayrı deneyler yapılmıştır. Her bir antijen çalışması arasında, çalışma tamponu altında bir ayrışma süresinden sonra, yüzey NaOH veya HCl enjeksiyonu ile rejenere edilmiştir. Ligand aktivitesine zarar vermeyen, 10 mM NaOH'nın en iyi rejenerasyon çözeltisi olduğu bulunmuştur. Bu konsantrasyon diğer deneylerde de rejenerasyon çözeltisi olarak kullanılmıştır.

SPR sisteminin ELİSA gibi geleneksel metotlar üzerindeki en büyük avantajı yüzeyinin tekrar kullanılabilir olmasıdır. Bu amaçla kullanılacak olan rejenerasyon sıvısının seçimi son derece önemlidir. Rejenerasyon aşamasında primer antikorunun sensör yüzeyinde işlevselliğini ve tekrar kullanılabilirliğini koruyarak manyetik partikül ile konjuge edilmiş sekonder antikor ve antijen yüzeyden uzaklaştırılmıştır. Yüzey 8 kereden daha fazla rejenere edilebilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada yüzey rejenerasyonu için asetik asit+%0,1 SDS (pH 4,5) kullanılmıştır ve yüzey bu çözelti ile 10 defadan daha fazla rejenere edilebilmiştir [340].

6.7.2 SPRI Çipleri için Antikor Konsantrasyonunun Optimizasyonu

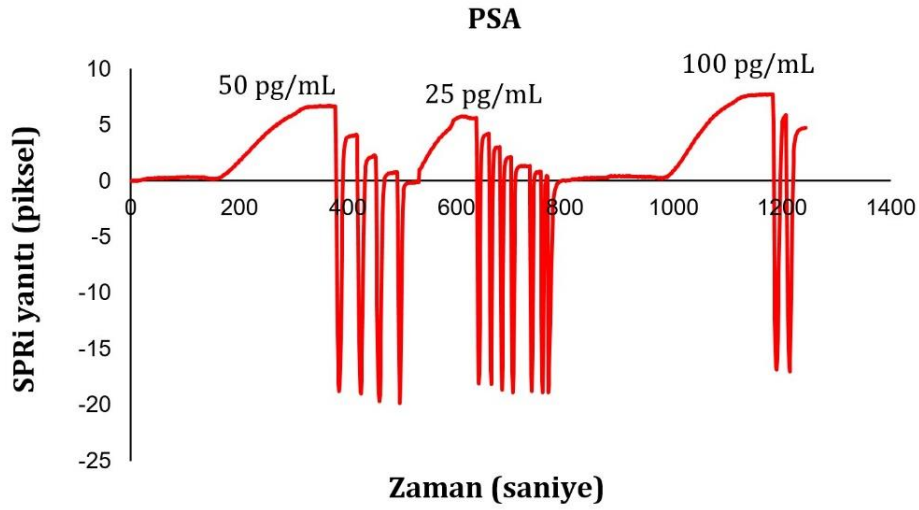
Spot sayısı 25 olan çipin optimum Ab₁ konsantrasyonu bilindiğinden [315], tekrar optimize edilmemiştir. Spot sayısı 16 olan çipi optimize etmek için kullanılan farklı Ab₁ konsantrasyonları 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µg/mL olarak belirlenmiştir. Ancak 25 ve 50 µg/mL için sonuçlar anlamlı olmadığı için grafikler verilmemiştir. Şekil 6.24'te görüldüğü gibi, ilk konsantrasyon olan 0 pg/mL, rejenerasyon aşamasından sonra PBS-T taban çizgisine düşmemiştir. Ek olarak, 12,5 pg/mL, rejenerasyondan sonra PBS-T taban çizgisini arttırmıştır. Bu durum, 100 µg/mL Ab₁'in spotun tüm yüzeyini kaplamaması ve daha sonra rejenerasyon çözeltisi sisteme enjekte edildiğinde, yüzeyde NaOH birikmesi ile açıklanabilmektedir. Ab₁ eklendikten sonra spotun yüzeyinde boş alan olmamalıdır. Bu nedenle, en iyi Ab₁ konsantrasyonunu diğer konsantrasyonlar üzerine çalışmalar yapılarak belirlenmeye çalışılmıştır.



Şekil 6.24 Farklı PSA konsantrasyonunun SPR sensör yüzeyi üzerinde kovalent olarak hareketsizleştirilmiş Ab₁'e (100 µg/mL) MP-Ab₂ ile bağlanması

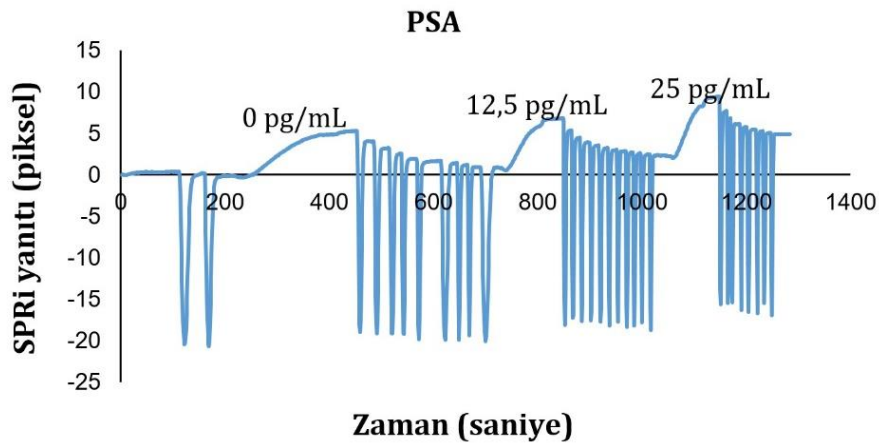
Ab₁ konsantrasyonu 250 µg/mL olduğunda, BSA ve Ab₁ spotları arasında renk açısından farklı kontrast tespit edilmiştir. Spot üzerinde BSA olanlar Ab₁'lerden daha koyu renkte görüntülenmiştir. İlk olarak, gelen ışığın açısı BSA üzerinden çizilen hat üzerinden ayarlanmıştır. Antijen konsantrasyonu 0 pg/mL'de sonuç alındıktan sonra, rejenerasyon çözeltisi sisteme enjekte edilmiştir. Ancak taban çizgisi, PBS-T'nin ilk taban çizgisi altında kalmıştır. Bu nedenle, karanlık/parlaklık

ayarlanması Ab_1 'e göre yapılmıştır. Her PSA konsantrasyonundan sonra iyi sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 6.25).



Şekil 6.25 SPR sensör yüzeyi üzerinde farklı PSA konsantrasyonunun MP- Ab_2 ile kovalent olarak hareketsizleştirilmiş Ab_1 'e (250 $\mu\text{g/mL}$) bağlanması

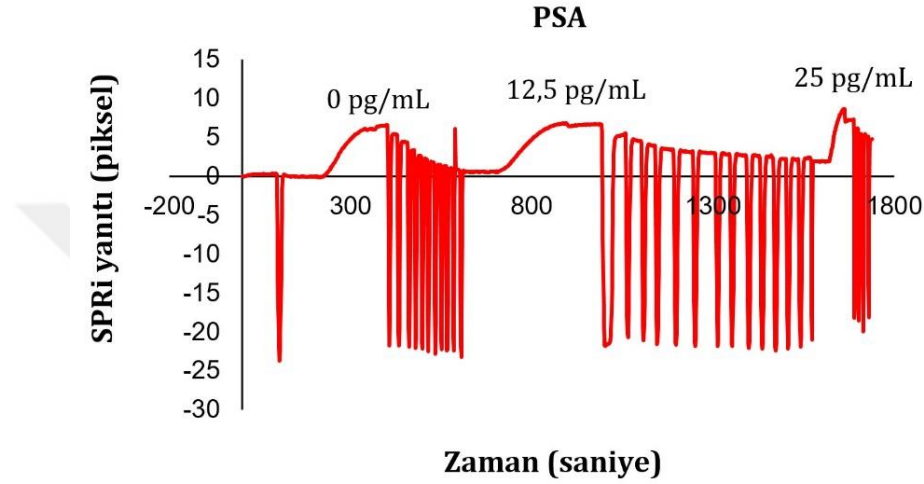
Ab_1 konsantrasyonu 250 $\mu\text{g/mL}$ 'den iyi sonuçlar elde edilmesine rağmen, çip yüzeyi 500 $\mu\text{g/mL}$ Ab_1 ile de test edilmiştir. Her konsantrasyondan sonra, taban çizgisini elde etmek için en az 11 kez rejenerasyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 6.26). Çok sayıda rejenerasyon işleminin gerçekleştirilmesi taban çizgisine ulaşmanın güçleştiğini göstermektedir.



Şekil 6.26 Farklı PSA konsantrasyonunun SPR sensör yüzeyi üzerinde kovalent olarak hareketsizleştirilmiş Ab_1 'e (500 $\mu\text{g/mL}$) MP- Ab_2 ile bağlanması

Taban çizgisine kolayca ulaşmak SPRI deneyinin önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Bu nedenle bu konsantrasyonun da primer antikör için uygun bir konsantrasyon olmadığı tespit edilmiştir.

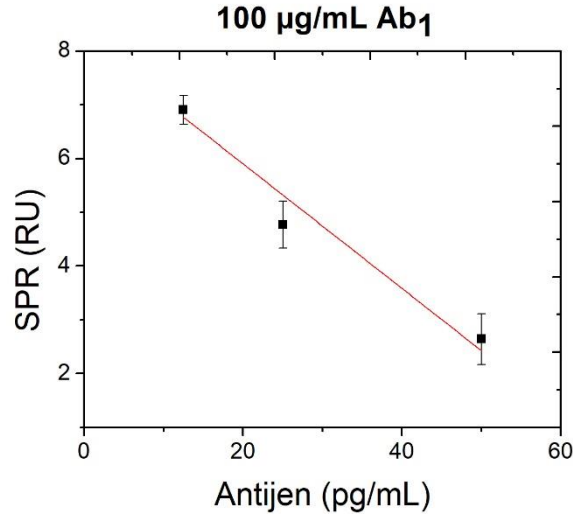
Ab₁ konsantrasyonu 500 µg/mL olarak kullanıldığında rejenerasyonda meydana gelen zorluklar 1000 µg/mL Ab₁ konsantrasyonu kullanıldığında da ortaya çıkmıştır (Şekil 6.27).



Şekil 6.27 SPR sensör yüzeyi üzerinde farklı PSA konsantrasyonunun MP-Ab₂ ile kovalent olarak hareketsizleştirilmiş Ab₁'e (1000 µg/mL) bağlanması

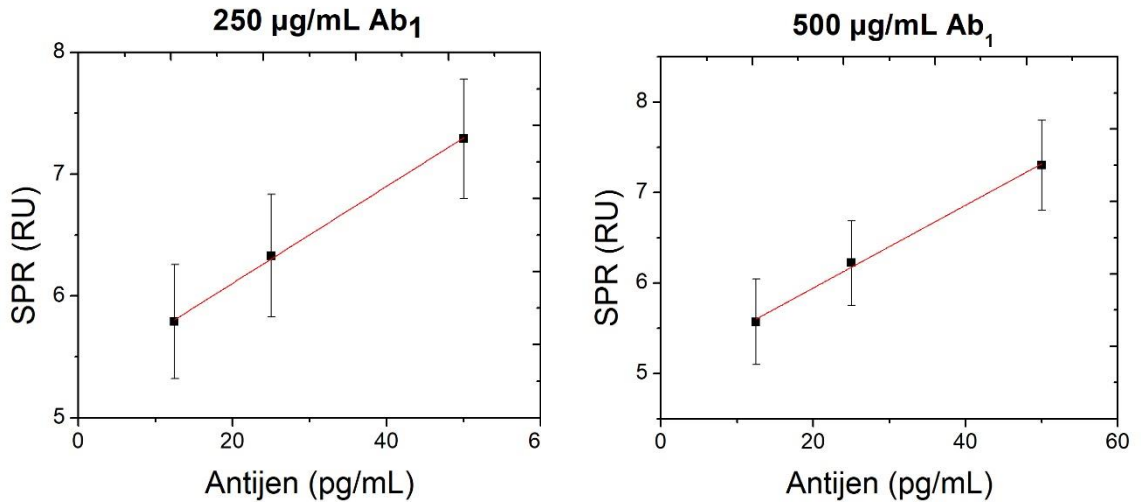
Birleşme fazı dengeye ulaştığında, antijenlerin tamamı antikora bağlandığından ayrılma fazı oluşmamıştır. Bununla birlikte, yüksek miktarda antikör kullanılması nedeniyle hala antijene bağlanmamış antikör bölgeleri bulunmaktadır. Rejenerasyon adımı sırasında, analitin liganddan çıkarılmasının zor olduğu tespit edilmiştir. Antijen konsantrasyonu 0 pg/mL olduğunda bile taban çizgisi zorlukla elde edilmiştir. Bu nedenle, rejenerasyon işlemi 11-14 kez gerçekleştirilmiştir. Ancak taban çizgisine ulaşılamamıştır.

Sonuç olarak, 16 spot çip için 4 farklı konsantrasyon (100, 250, 500, 1000 µg/mL) kullanılmıştır. Kullanılan konsantrasyonlar için sonuçları daha anlamlı hale getirmek için kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Kalibrasyon eğrilerini çizmek için kullanılan antijen konsantrasyonları 12,5, 25 ve 100 pg/mL olarak belirlenmiştir. Şekil 6.28'de görüldüğü gibi, 100 µg/mL Ab₁ için SPRi açısı kaymaları, antijen konsantrasyonu arttıkça azalmıştır.



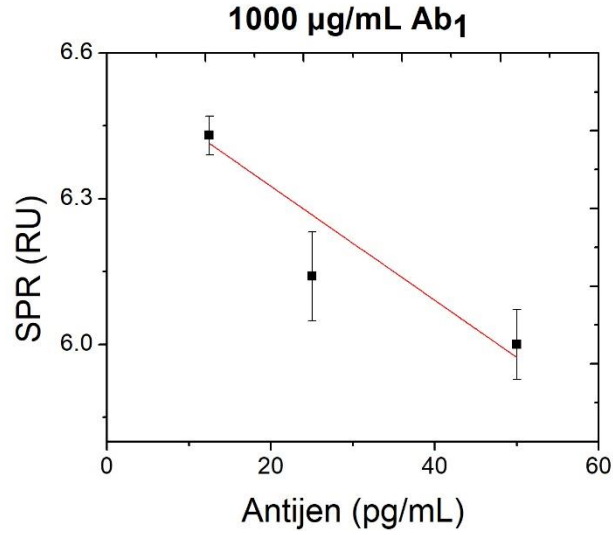
Şekil 6.28 Yakalama antikoru 100 µg/mL için kalibrasyon eğrisi

Ab₁ konsantrasyonu 250 ve 500 µg/mL olarak kullanıldığında, SPR yanıtı, artan antijen konsantrasyonuna bağlı olarak yükselen sinyal vermiştir (Şekil 6.29). Ab₁ konsantrasyonu 250 µg/mL, 500 µg/mL Ab₁'den biraz daha fazla artan sinyale neden olmuştur.



Şekil 6.29 Yakalama antikoru 250 ve 500 µg/mL için kalibrasyon eğrisi

Ab₁ konsantrasyonu 1000 µg/mL olduğunda, 100 µg/mL Ab₁'de olduğu gibi sinyal azalmasıyla sonuçlanmıştır (Şekil 6.30). Sonuç olarak, rejenerasyon işlemi de göz önüne alınarak 250 µg/mL Ab₁ konsantrasyonu, en iyi yakalama antikor konsantrasyonu olarak seçilmiştir.



Şekil 6.30 Yakalama antikor 1000 µg/mL için kalibrasyon eğrisi

SPRi sisteminden elde edilen verilere göre, en iyi rejenerasyon çözeltisi konsantrasyonu 10 mM NaOH'dır. Spot sayısı 16 olan çip için en iyi Ab₁ konsantrasyonu 250 µg/mL'dir. Bu nedenle, optimizasyon çalışmaları dikkate alınarak daha ileri çalışmalar yapılmıştır.

SPR'da yüzeye bağlanan reseptör için uygun konsantrasyonun bulunması çalışma için büyük önem arz etmektedir. Yakalama antikor olarak bilinen primer antikorlar için en uygun konsantrasyon 250 µg/mL olarak bulunmuştur. Bu sonuç SPRi kullanılarak CA125/MUC16 biyomarkerının tespitinde de primer antikor konsantrasyonunu 200 µg/mL olarak belirleyen çalışma ile uyumludur [341].

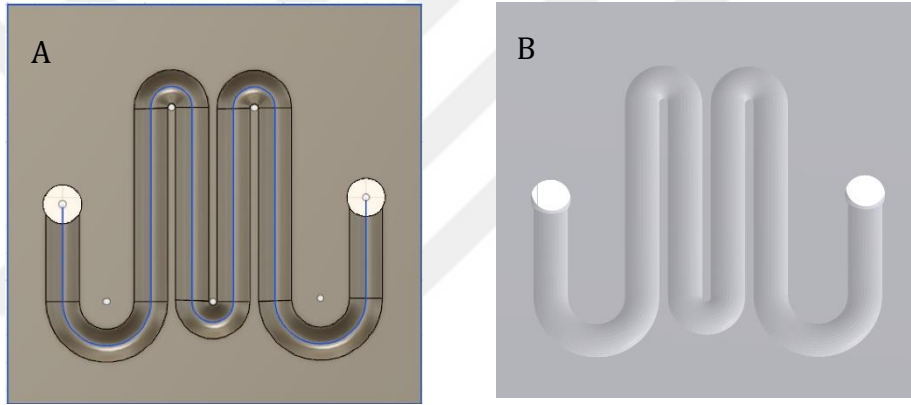
6.7.3 Çipler Yeniden Kullanım Yöntemlerinin Sonuçları

Deneyden sonra, kullanılmış altın çiplerinin yenilenmesi SPRi'nin tekrarlanabilir sonuçlar elde etmesi açısından çok önemlidir. Çip rejenere edilebilirse, birçok deneyde tekrar kullanılabilir. Piranha ve %5 SDS kullanma amacımız, kullanılan çipin yüzeyindeki tüm analiti uzaklaştırmaktır. Bununla birlikte, UV işlemi SAM'in yüzeyden uzaklaştırılması için kullanılmıştır. Ancak her iki prosedürde de bir spota bir damla su eklendikten sonra spot yüzeyinde suyun tutunmadığı anlaşılmıştır. Yani piranha veya SDS çözeltisi hidrofobik arka plan katmanına zarar vermiştir. Bu nedenle bu solüsyonların çipe uygulanma süreleri konusunda çalışma yapılarak çipin tipine en uygun süreler tespit edilmiştir.

Materyal ve metot kısmında belirtilen süreler çiplerin tekrar kullanılması için uygun metot olarak belirlenmiştir.

6.7.4 3D Baskılı Kanal Parçasının Tasarımı

O-ring kullanılarak yapılan analizlerde karşılaşılan sorunlardan dolayı mikroakışkan kanal analiz sonuçlarının daha tutarlı ve kısa sürede alınmasını sağlayacağından 16 spot içeren çiplerde kullanılmıştır. SPRi cihazı için mikroakışkan kanal parçası, Autodesk'in 123 tasarım yazılımı kullanılarak tasarlanmıştır. Bir serpantin kanal parçası, Formlabs Form 2 SLA 3D Yazıcı ile akrilat esaslı esnek reçine kullanılarak imal edilmiştir. Autodesk programı aracılığıyla 16 spot çipi için tasarlanan kanal Şekil 6.31A'da gösterilirken, Şekil 6.31B, 3D baskıdan önce Preform sürümüne dönüştürülmüş 16 spot çipi için kanalı göstermektedir.



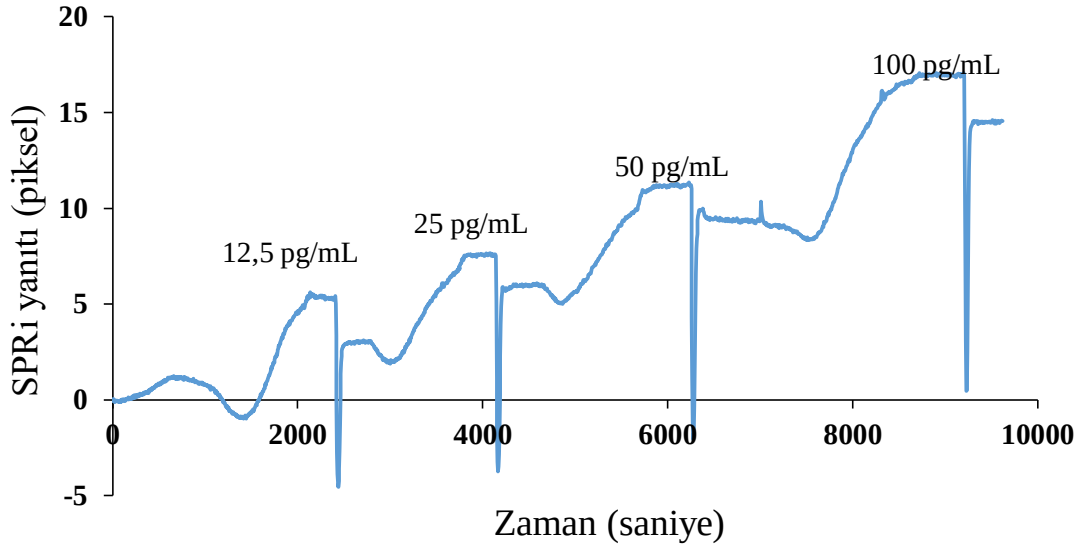
Şekil 6.31 (A) Autodesk'ten elde edilen 16 spot çipi için kullanılacak olan kanalın görünümü; (B) Preform'dan elde edilen 16 spot çipi için kullanılacak olan kanalın görünümü

6.7.5 PSA'nın Optimizasyonu ve Kalibrasyonu için Sonuçlar

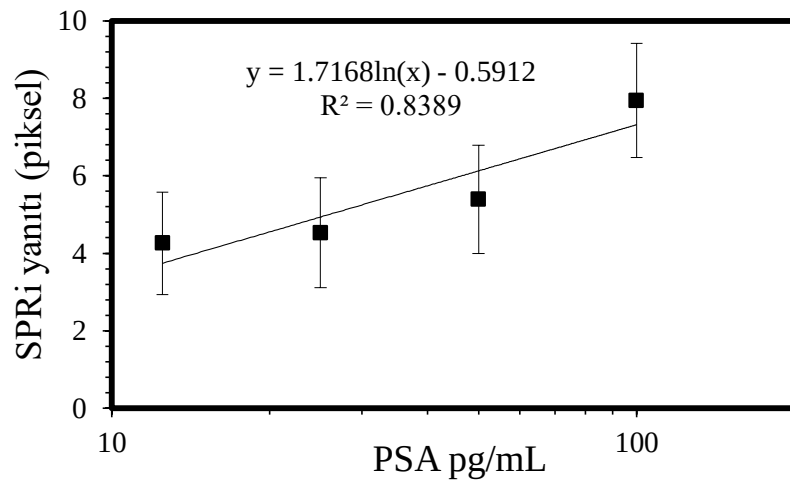
PSA, prostat kanseri için hastada tespit edilebilen FDA onaylı tek bir biyomarkerdir. SPRi sisteminin çalışma durumu PSA biyomarkerı kullanılarak optimize edilmiştir. Çoklu analizlerden önce PSA'nın kalibrasyon eğrisi ve saptama limiti elde edilmiştir. İlk başta farklı konsantrasyonlarda (12,5, 25, 50 ve 100 pg/mL) PSA ile çalışılmıştır. Sonuçlar Şekil 6. 32'de gösterildiği gibidir.

PSA için doz-yanıt eğrisi, bağlanma sonrası ile bağlanma öncesi farklardan elde edilen veriler dikkate alınarak hesaplanmıştır (Şekil 6.33). Bu çalışma için saptama

sınırı 12,5 pg/mL'dır. PSA'nın SPR ile tespiti ile ilgili önceki çalışmalar, çok daha düşük konsantrasyonun tespit edilebileceğini göstermiştir [314, 342]. Bu nedenle, bir sonraki çalışma çok daha düşük PSA konsantrasyonunun incelenmesi üzerine planlanmıştır.



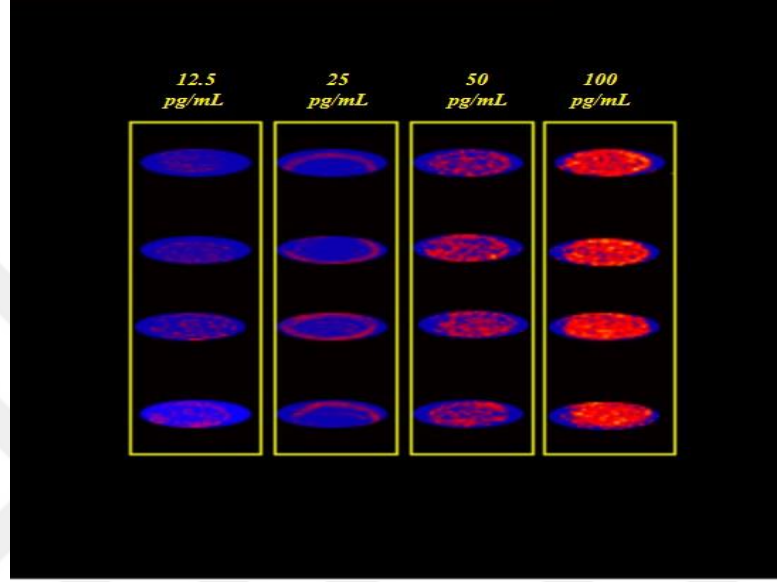
Şekil 6.32 SPRi sensör yüzeyi üzerinde kovalent olarak immobilize edilmiş Ab₁'e farklı PSA konsantrasyonunun MP-Ab₂ ile bağlanması



Şekil 6.33 Değişen PSA konsantrasyonlarının kalibrasyon grafiği

SPR görüntüleri tüm dizi için gerçek zamanlı olarak toplanmıştır. Deneyden önce, yüzey üzerinde sabitlenmiş Ab₁ ve BSA'nın "referans görüntüsü" alınmıştır. Yüzey MP-PSA-Ab₂PSA analitine maruz bırakıldıktan sonra, "bağlanma sonrası görüntü"

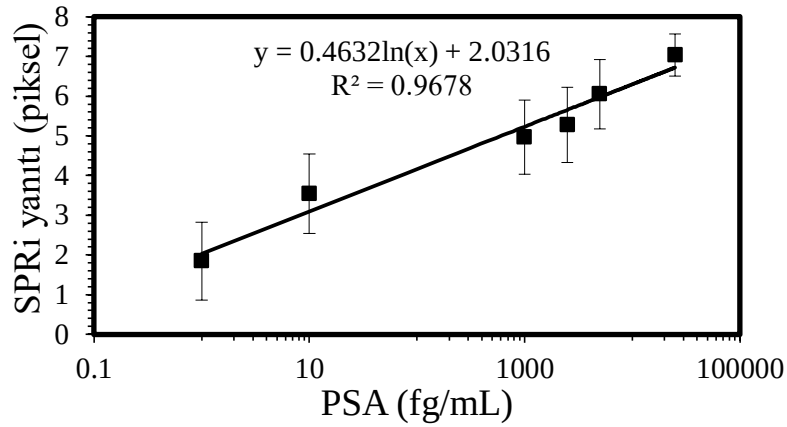
olarak adlandırılan başka bir görüntü alınmıştır. “Fark görüntüsü”, bağlanma sonrası görüntülerden referans görüntünün çıkarılmasıyla elde edilmiştir. Bu fark görüntüsü, analitin liganda bağlı olduğu her yerde artan bir şekilde yansıtma göstermektedir. Elde edilen fark görüntüsü yeniden renklendirilmiştir ve daha sonra düzenlenmiştir. Şekil 6.34’te görüldüğü gibi, 100 pg/mL, Ab₁’e en yüksek bağlanma miktarını göstermektedir.



Şekil 6.34 PBS-T’de seyreltilmiş farklı PSA konsantrasyonu için yeniden renklendirilmiş SPR farkı görüntüsü

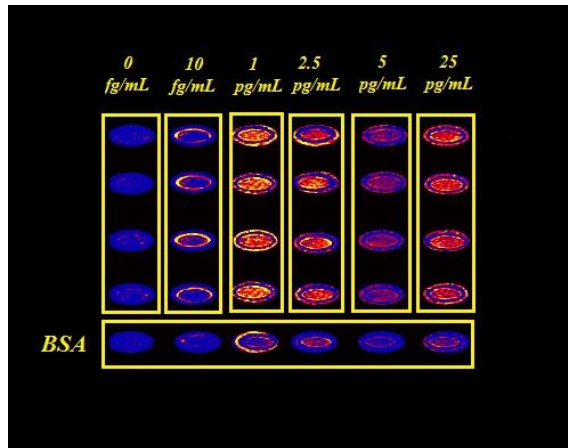
PSA örneklerinin daha düşük konsantrasyonları başka bir çalışmada hazırlanmıştır. Bu PSA konsantrasyonları 0, 10, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 25000 fg/mL’dir. Taze antijen yüzeyi elde etmek için bağlı MP-Ab₂PSA-PSA’nın ayrılması, 1 dk süreyle 210 µL/dk’da 10 mM NaOH ile gerçekleştirilmiştir. Bu adım, taban çizgisini elde etmek için üç kez gerçekleştirilmiştir. Yıkama ve rejenerasyon aşamalarından sonra, çip yüzeyi diğer PSA konsantrasyonu ile muamele edilmiştir. BSA negatif kontrol olarak kullanılmıştır. BSA spotları için önemsiz sinyal artışları gözlenmiştir. Spesifik olmayan bağlanmayı ortadan kaldırmak için BSA spotlarından elde edilen sinyalin ortalama sonuçları PSA spotlarından elde edilen sonuçlardan çıkarılmıştır. Bu çalışmanın kalibrasyon grafiği, SPR yanıtı ile PSA konsantrasyonu arasında 0 fg/mL-25 pg/mL aralığında iyi bir ilişki olduğunu göstermiştir ve korelasyon katsayısı

0,9678 olarak bulunmuştur. PSA için saptama sınırı 10 fg/mL'dır. Elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 6.35' te gösterilmiştir.



Şekil 6.35 Düşük PSA konsantrasyonları için kalibrasyon eğrisi

Daha önce de belirtildiği gibi SPR analizi sırasında, spotların gerçek zamanlı görüntüleri sistem tarafından toplanmıştır. Ab₁ ile kaplanmış olan spotlar üzerinde bağlanma meydana geldiğinden, spotlar parlaklaşmıştır. Yukarıda tarif edildiği gibi, bağlanma öncesi ve sonrası görüntüler çıkarılmıştır ve bir fark görüntüsü elde edilmiştir. Analizin fark görüntüsü Şekil 6.36'da gösterilmiştir. Görüldüğü gibi, MP-PSA-Ab₂PSA'nin spotlara bağlanma miktarı, artan konsantrasyona bağlı olarak artmıştır.



Şekil 6.36 PBS-T içinde antikor kaplı manyetik partiküller üzerine önceden yakalanmış 0, 10 fg/mL, 1, 2,5, 5 ve 25 pg/mL PSA için SPR farkı görüntüsü

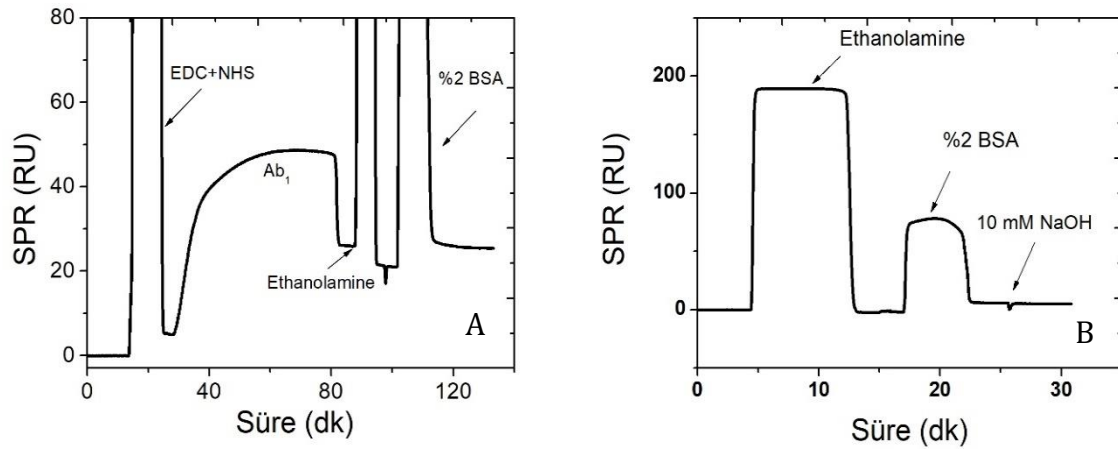
Sonuç olarak, MP-Ab₂PSA üzerine yakalanan PSA'nın değişen konsantrasyonu, SPR yüzeyi üzerinde hareketsiz kılınan Ab₁'e başarıyla bağlanmıştır. Ek olarak, fark görüntülerinin ve doz-yanıt kalibrasyon eğrisinin sonuçları başarı ile sonuçlanmıştır. PSA için analizlerin dinamik aralığının MP kullanılarak 10 fg/mL-100 pg/mL aralığında olduğu bulunmuştur.

Sandviç tipi immünosensörler ve immünoanalizlere dayanan yöntemler, eşleşen iki antikorun kullanılması nedeniyle birden fazla epitop ile çok değerlikli antijenlerin/analitlerin saptanması için geliştirilmiştir. Yüksek afiniteli antikorlar ve uygun etiketler genellikle saptanabilir sinyalin amplifikasyonu için kullanılmaktadır [343]. Bununla birlikte yüksek molekül ağırlığına sahip moleküllerin interaksiyonda kullanımları sinyal artışında avantaj sağlamaktadır. Tez çalışmasında, primer ve sekonder antikorlar kullanılarak sandviç yöntemi uygulanmıştır. Ek olarak, manyetik partiküller kullanılarak SPR sinyalinin artışı sağlanmıştır. Bununla beraber daha düşük limitlerde antijen tespiti (pg/mL) elde edilebilmiştir. Benzer sonuçlar, Teramura, vd. [344] tarafından yapılan çalışmada bulunmuştur. Bu çalışmada, beyin natriüretik peptidi (BNP) sandviç yöntemi ve biyotin-avidin interaksiyonu kullanılarak pikogram seviyelerinde tespit edilebilmiştir ve SPR sinyalinin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

Sinyal amplifikasyonunu sağlamak için manyetik partiküller biyotanımlama için etiket olarak geliştirilmiştir ve manyetik etiket tabanlı biyo-tahlillerdeki araştırmalar artan ilgi alanı haline gelmiştir. Taneciklerin manyetik özelliklerinin zaman içinde stabil kalması önemli bir özelliğidir. Manyetik mikropartiküller geniş bir yüzey alanına sahiptir ve birçok ligand mikropartikül yüzey üzerinde hareketsiz hale getirilebilmektedir. Ayrıca manyetik partiküllerin sıvı fazdan manyetik bir alanla ayrılması kolaydır [345, 346]. Manyetik partiküllerin bu avantajlarından yararlanılarak SPRi sisteminde sinyal amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Benzer çalışmalar manyetik partiküllerin sinyal amplifikasyonundaki önemini açıkça bildirmektedir. Soelberg, vd. [347] tarafından yapılan çalışmada düşük konsantrasyondaki analitlerin bile manyetik partiküller sayesinde örneklerden tespit edilebileceği belirtilmiştir.

6.7.6 Çevrimiçi Tespit Metodolojisi

Metodolojimiz EDC/NHSS birleştirme kimyasına dayanmaktadır. SPR analizi yapılmadan önce, 11-MUA kullanılarak SAM oluşturulmuştur. Sensör çipi üzerindeki 11-MUA aracılığıyla oluşturulan karboksil grupları, 10 dk boyunca EDC/NHSS karışımı ile aktive edilmiştir. Daha sonra yakalama antikoru yüzeyden geçirilmiş ve esterler, Ab₁'i çip yüzeyine kovalent olarak bağlamak için amino gruplarıyla kendiliğinden reaksiyona girmiştir. Yakalama antikorunun enjeksiyonundan sonra, kalan aktif esterleri deaktif etmek için etanolamin ve BSA yüzeyden geçirilmiştir. Ayrıca analize başlamadan önce yüzeyi şartlandırmak için 10 mM NaOH kullanılmıştır. Tüm sensogramlar Şekil 6.37'de gösterilmiştir.



Şekil 6.37 Yakalama antikoru immobilizasyon işleminin sensogramı: (A) Çevrimiçi tespit işlemin görüntülenmesi; (B) çevrimiçi bloklama adımlarının görüntülenmesi

Altın bir film üzerinde geleneksel antikor immobilizasyonu Au ile antikor arasında oluşturulan bir kovalent bağ ile meydana getirilmektedir. Bunu sağlamak için oluşturulan SAM ile EDC/NHS kimyası kullanılarak antikorun yüzeye kovalent olarak immobilizasyonu gerçekleştirilmektedir [315, 341, 342, 348]. Ancak tez çalışmasının aksine yapılan bir çalışmada antikor ile konjuge edilmiş manyetik partiküllerin yüzeyde tutunmasını sağlamak için prizmanın hemen altına manyetik sütun yerleştirilmiştir. Bu şekilde herhangi bir yüzey kimyası kullanılmadan antijenler, manyetik güçle yüzeyde tutunan manyetik partiküllere bağlanmıştır [345].

Genel olarak SPR sisteminde çip yüzeyini bloklamak için etanolamin kullanılmaktadır [349]. Sistemde spesifik olmayan interaksyonları önlemek için sürekli olarak akan tampon sıvının içine Tween-20 katılmıştır. Sadece etanolamin veya BSA kullanılan analizlerde negatif spot üzerinde göz ardı edilemeyecek kadar fazla sinyaller alınmıştır. Bu nedenle bu iki çözeltinin aynı anda kullanıldığı bir protokol geliştirilmiştir. Çip yüzeyinde meydana gelebilecek spesifik olmayan bağlanmaları minimize etmek için etanolamin ve BSA iki aşamalı bloklama için kullanılmıştır [314].

6.7.7 Antikorum Antijene Bağlanma Kinetiği

Çoklu tespit için analitik protokolü gerçekleştirmeden önce SPR çiplerinde bağlanma kabiliyetini anlamak ve dinamik antijen aralığını belirlemek için, her bir antijenin mikrodizi üzerinde yakalama antikoru bağlanma kinetiği araştırılmıştır. Antijenlerin birleşme ve ayrılma hızı, SPR sensör yüzeyine bağlı yakalama antikorumlarına bağlandıktan ve ayrıldıktan sonra hesaplanmıştır. Her antijen için bağlanma verileri bir denge modeli kullanılarak hesaplanmıştır. Bu denklemler üzerine eş zamanlı doğrusal olmayan regresyon analizi uygulanarak en iyi birleşme hızı sabiti “ k_a ”, ayrılma hızı sabiti “ k_d ” ve denge sabiti “ K_D ” değerleri elde edilmiştir. Birleşme oranı (6.1), ayrılma oranı (6.2) ve denge sabiti (6.3) aşağıdaki gibidir:

$$\frac{d[LA]}{dt} = k_a[L][A] - k_d[LA] \quad (6.1)$$

$$\frac{dR}{dt} = -k_d \times R \quad (6.2)$$

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} \quad (6.3)$$

Bu eşitliklerde, “L” ligand, “A” analit, “LA” ligand-analit kompleksi, “R” sistemin yanıtı ve “t” zamandır. CD14, VEGF-D ve IGF-I, farklı kanser tiplerinin saptanmasında çalışıldığından ve agresif prostat kanserine spesifik olduğu düşünüldüğünden bu çalışma için seçilmiştir. Analit ve ligand arasındaki etkileşimi belirlemek için, Au yüzeyi üzerinde hareketsiz kılınmış antikorumlar aracılığıyla

antijenleri yakalamak için CD14, VEGF-D ve IGF-I kinetikleri ölçülmüştür (Tablo 6.4). Kinetik eşitlikler GraphPad Prism8 programı kullanılarak elde edilmiştir.

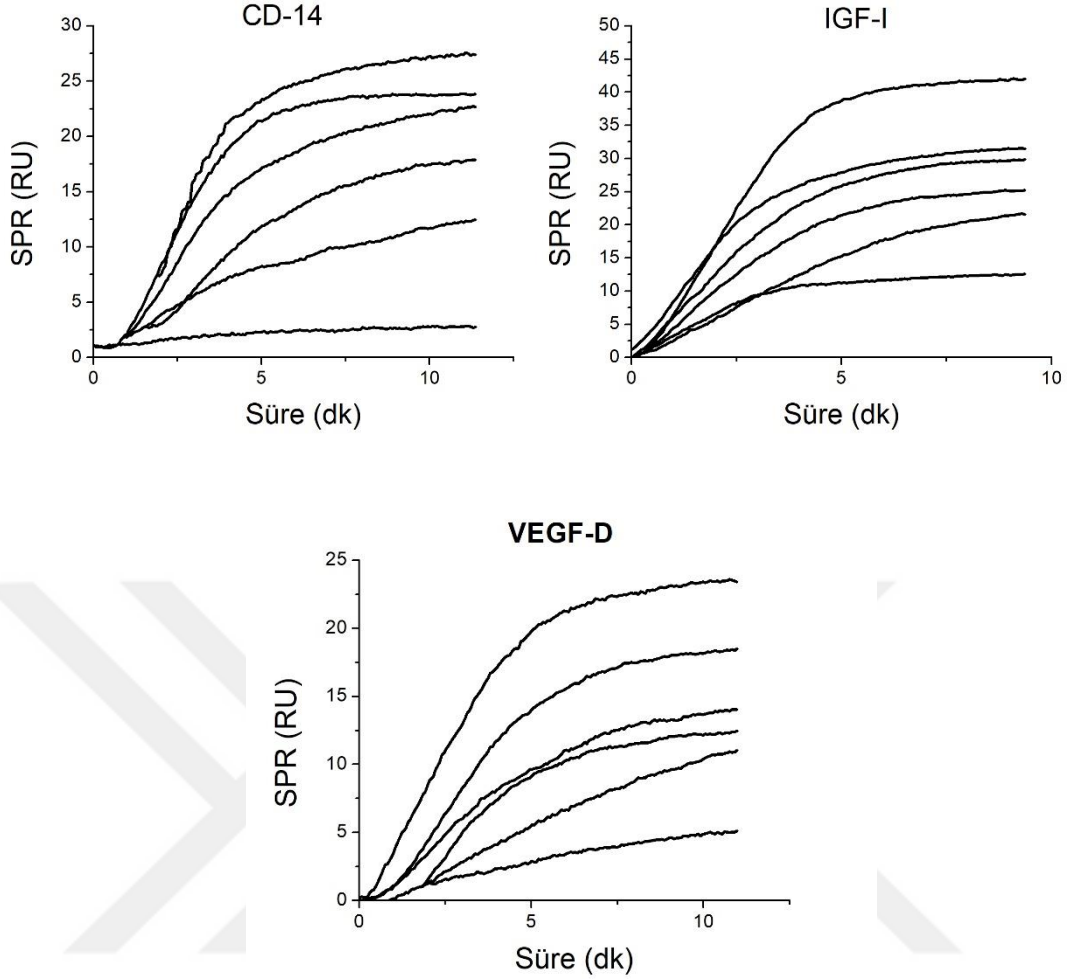
Tablo 6.4 Antikorları yakalamak için antijen bağlanma parametreleri

Analitin Ab ₁ 'e bağlanması	$k_a(M^{-1}min^{-1})/10^5$	$k_d(min^{-1})/10^{-3}$	$K_D(nM)$
CD14	15,5±0,4	5,9±0,3	3,82±0,3
IGF-I	41,5±0,8	1,2±0,6	0,28±0,06
VEGF-D	54,0±1,0	2,8±0,2	0,51±0,5

En yüksek birleşme hızı VEGF-D biyomarkerında meydana gelmiştir. En hızlı ayrışma hızı da CD14 biyomarkerı kullanıldığında elde edilmiştir. CD14 için dengeye ulaşmak daha uzun süre gerektirmiştir. Çünkü K_D değeri en yüksek olan biyomarker CD14'dir. IGF-I ise en iyi denge sabitine sahip biyomarkerdır.

Au çip üzerindeki antikorları yakalamak için MP-Ab₂-Ag kompleksinin bağlanması, 25-30 dk boyunca SPRI tarafından izlenmiştir, ardından sensörden sadece PBS-T tamponu geçirilirken 5 dk boyunca antijen-antikor kompleksinin ayrılması izlenmiştir. CD14, VEGF-D ve IGF-I için bu birleşme verileri, farklı antijen konsantrasyonları için Şekil 6.38'de gösterilmektedir. CD14, IGF-I ve VEGF-D'nin dinamik aralıkları sırasıyla 1-100 pg/mL, 1,1-110 pg/mL ve 0,5-100 pg/mL arasında tespit edilmiştir.

Her biyomarkerın kendine has bir birleşme ve ayrışma fazına sahip olduğu tez çalışması tarafından doğrulanmıştır. Mani, vd. [342] tarafından yapılan çalışmada da PSA ve IL-6 antijenlerinin farklı birleşme ve ayrılma oranlarına sahip olduğu bildirilmiştir. Bu sonuç tez çalışmasından elde edilen sonuçları desteklemektedir.

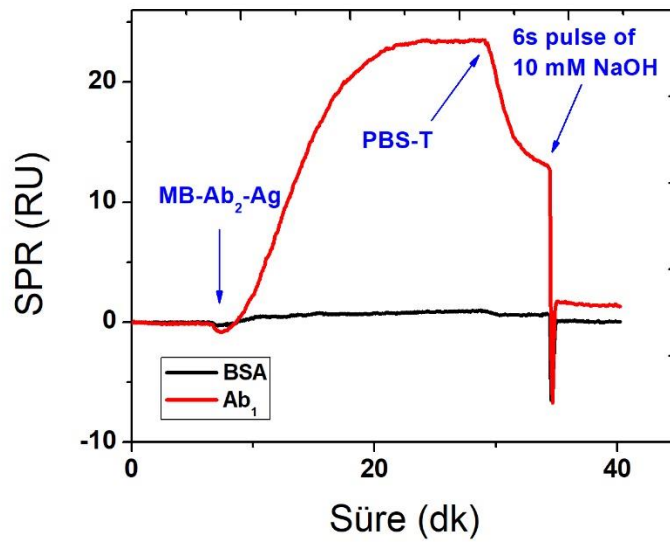


Şekil 6.38 CD14, IGF-I ve VEGF-D konsantrasyon serileri için SPRi birleşme veri yanıtı (CD14 için 0,1, 2, 5, 10, 100 pg/mL, IGF-I için 0, 1,1, 2,2, 5,5, 11, 110 pg/mL ve VEGF-D için 0, 0,5, 1, 2, 5, 100 pg/mL)

6.7.8 MP-Ab₂ Konjugatı Kullanılarak CD14, IGF-I ve VEGF-D'nin Çoklu Tespiti

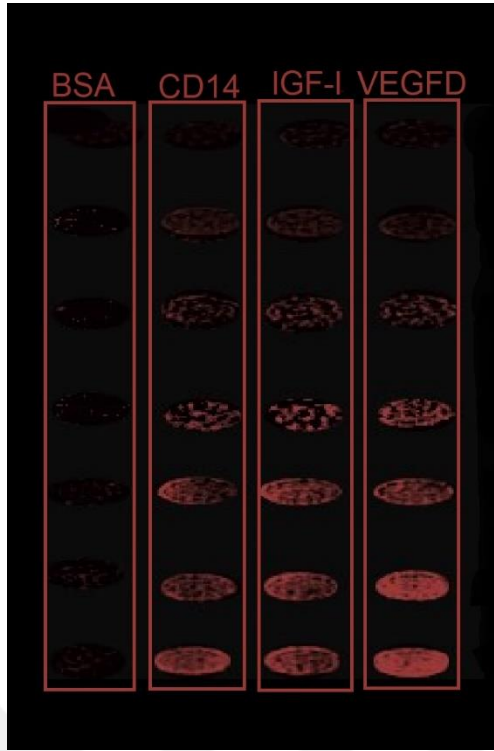
Ab₂ konsantrasyonunu çoklu tespit için optimize etmek için üç farklı yöntem denenmiştir. En iyi çözelti, her Ab₂'nin (10 µL) manyetik partiküllere ayrı ayrı eklendiği ve daha sonra 30 dk boyunca 37 °C'de inkübe edildiği çözeltidir. İnkübasyondan sonra, her MP-Ab₂ kompleksinin stok çözeltisi bir vial içinde birlikte karıştırılmıştır. Her biyomarker aynı vialde bir araya getirilmiş ve istenen konsantrasyona seyreltilmiştir. MP-Ab₂-Ag oluşturmak için, miks edilmiş MP-Ab₂ kompleksi ve miks biyomarker çözeltileri ile birleştirilmiş ve inkübe edilmiştir. CD14, IGF-I ve VEGF-D için yakalama antikoru ve negatif kontrol olarak %2 BSA her biri için dört spot olacak şekilde ekilmiştir ve inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra bu çip sisteme takılmıştır ve MP-Ab₂-Ag göndermeden önce etanolamin ve

BSA ile bloklama işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra seri bir şekilde her bir antijen konsantrasyonu sisteme enjekte edilmiştir. Ayrılma aşamasından sonra, bağlı MP-Ab₂-Ag'nin ayrılması için rejenerasyon, 10 mM NaOH'nin kısa darbeleri ile gerçekleştirilmiştir. Yeni bir antijen yüzeyi elde etmek için, rejenerasyon adımı bir sonraki çalışma için kritiktir. Bu nedenle, her iki çalışma arasında rejenerasyon çözeltisi kullanılarak %80-100 taze yüzey oluşturulmuştur. Her konsantrasyondan sonra negatif kontrol olan BSA spotlarında düşük sinyaller görüldüğü gözlenmiştir (Şekil 6.39).



Şekil 6.39 Antijeni (100 pg/mL) algılama sırasında yakalama antikoru (kırmızı) ve bir BSA spotu (siyah) üzerine kaydedilen gerçek zamanlı SPRi yanıt eğrisi

Spesifik olmayan bağlanmayı ortadan kaldırmak için kontrol BSA spotlarının sinyal sonuçları, tespit işlemi yapılan spotların sonuçlarından çıkarılmıştır. Sistem doyuma ulaştıktan sonra, tampon çözelti sistemden geçirilmiştir ve sinyal azalmıştır. Bu sonuç analit ve ligand arasında kuvvetli bir bağın olmadığını, çözünme hızının yüksek olduğunu yani k_D değerinin yüksek olduğunu göstermektedir. SPR görüntüleri, deney sırasında bir kamera aracılığıyla gerçek zamanlı olarak yakalanmıştır. Yakalama antikoru ile kaplanan yüzeye spesifik bağlanmayı takiben, spotların yüzeyinde parlaklık meydana gelmiştir. BSA spotları üzerinde önemsiz yanıtlar izlenmiştir. Antijenlerin artan konsantrasyonuna bağlı olarak, spotların parlaklığı da artmıştır (Şekil 6.40).

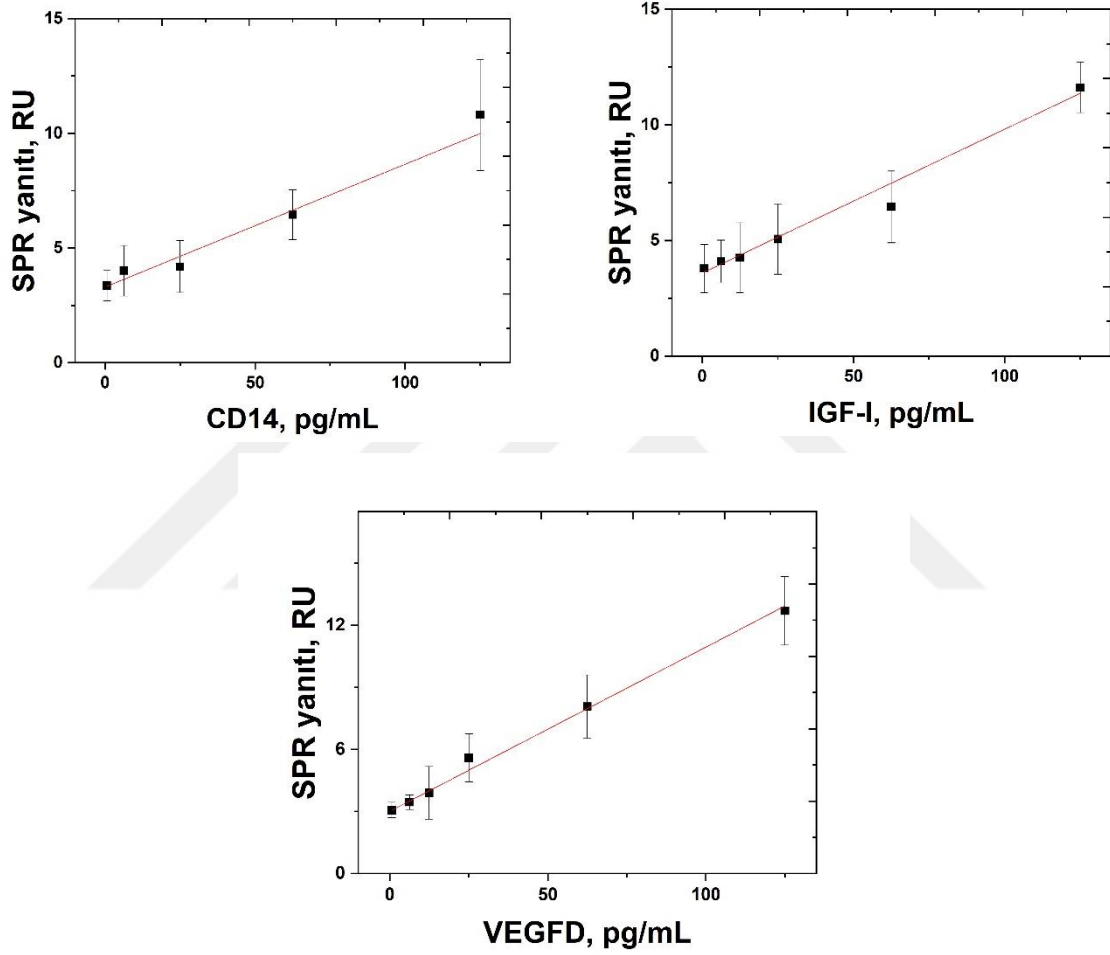


Şekil 6.40 Antijenin artan konsantrasyonuna bağlı olarak çoklu algılama için fark görüntüleri (yukarıdan aşağıya)

Çok düşük konsantrasyonda antijenin çoklu tespiti için manyetik partiküller ile sandviç yöntemi kullanılmıştır. Buzağı serumu içinde seyreltilmiş IGF-I, CD14 ve VEGF-D biyomarkerlarını içeren farklı antijen konsantrasyonlarının, doz-tepki eğrilerini elde etmek için analizler gerçekleştirilmiştir. Kullanılan konsantrasyonlar 0, 0,625, 6,25, 12,5, 25, 62,5, 125 pg/mL'dir. Çoklu tespit için LOD değeri 0,625 pg/mL olarak tespit edilmiştir. Çoklu algılama için sistemin dinamik aralığı 0,625 ve 125 pg/mL arasında bulunmuştur. Şekil 6.41'de görüldüğü gibi, MP-Ab₂ kullanılarak seyreltilmiş buzağı serumundaki her biyomarker için kalibrasyon eğrisi, SPR yanıtının pg/mL aralığında artan konsantrasyonla arttığını göstermiştir.

Tez çalışmasına benzer bir çalışma elektrokimyasal biyosensör kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada çift taraflı kullanılan elektrotlar ile paralelli olarak 8 biyomarker için eş zamanlı olarak HRP ile etiketlenmiş sekonder antikor kullanılarak ölçümler gerçekleştirilmiştir [350]. Tez çalışması bu araştırmadan elde edilen veriler ile uyumludur.

SPR yüzeyindeki spotların yüzey alanının azaltılması ölçümlerin daha hassas bir şekilde yapılabileceğini göstermiştir. Bu fark 25 spot ve 16 spot içeren çiplerde yapılan deneyler ile farkedilmiştir. Ayrıca dizayn edilen kanal ile analitin sensör yüzeyine daha hızlı ve birikim olmadan enjekte edilmesi sağlanmıştır. Analizlerde kanal kullanılması pahalı ve az bulunan analitlerin hacimlerinin azaltılarak kullanılmasına olanak sağlamıştır [315].



Şekil 6.41 Yakalama antikor spotları üzerindeki CD14, IGF-I ve VEGF-D biyomarkerları için kalibrasyon eğrisi

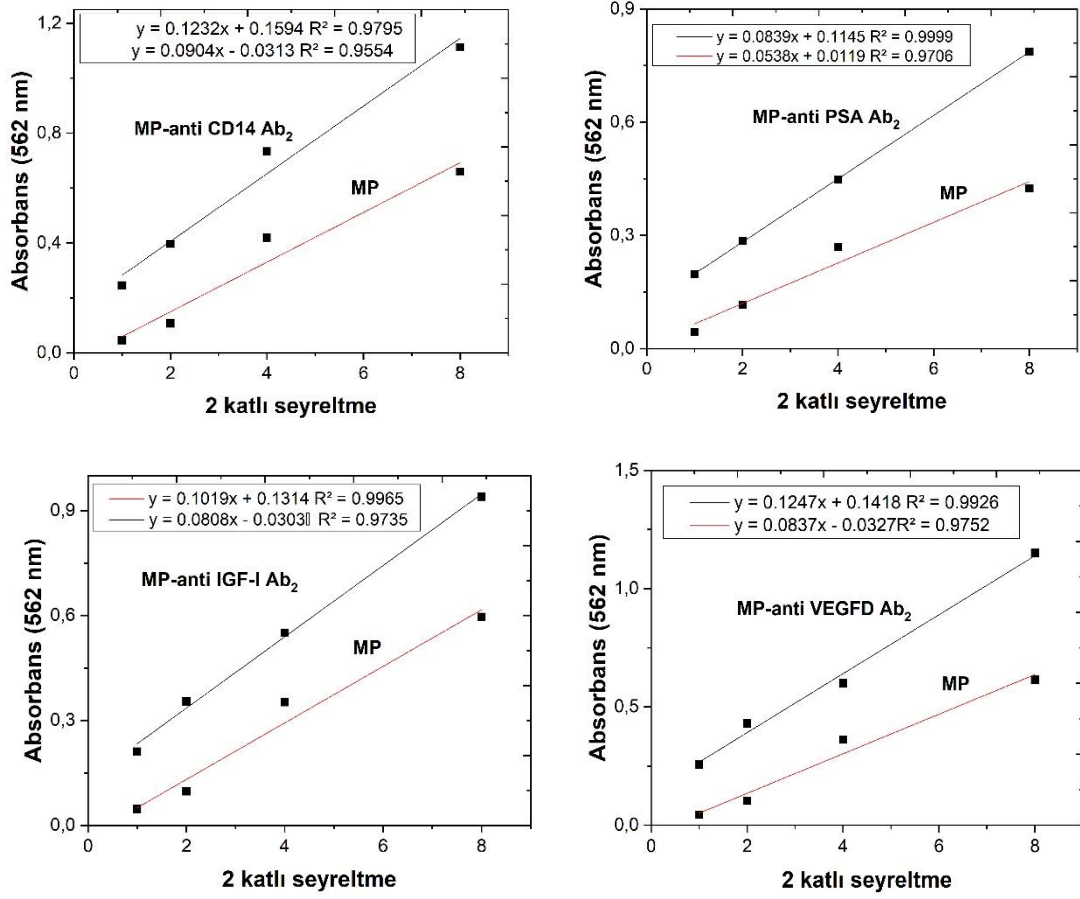
Gelecekteki çalışmalarda biyomarkerlar arasında meydana gelebilecek çapraz reaksiyon çip yüzeyi eşit sayıda spot içerecek şekilde ikiye bölünerek elimine edilebilir. Ayrıca sıcaklık kontrol paneli entegre sistemler kullanılarak sistemde sıcaklığa bağlı meydana gelebilecek dalgalanmalar da önlenabilir. Bu tez çalışmasında hasta örnekleri üzerine denemeler yapılamamıştır. İlerleyen

çalışmalarda geliştirilen bu yöntem ile hasta örnekleri üzerinde çalışmalar yapılabilir ve SPRi sisteminin klinik çalışmalar için uygunluğu kanıtlanabilir.

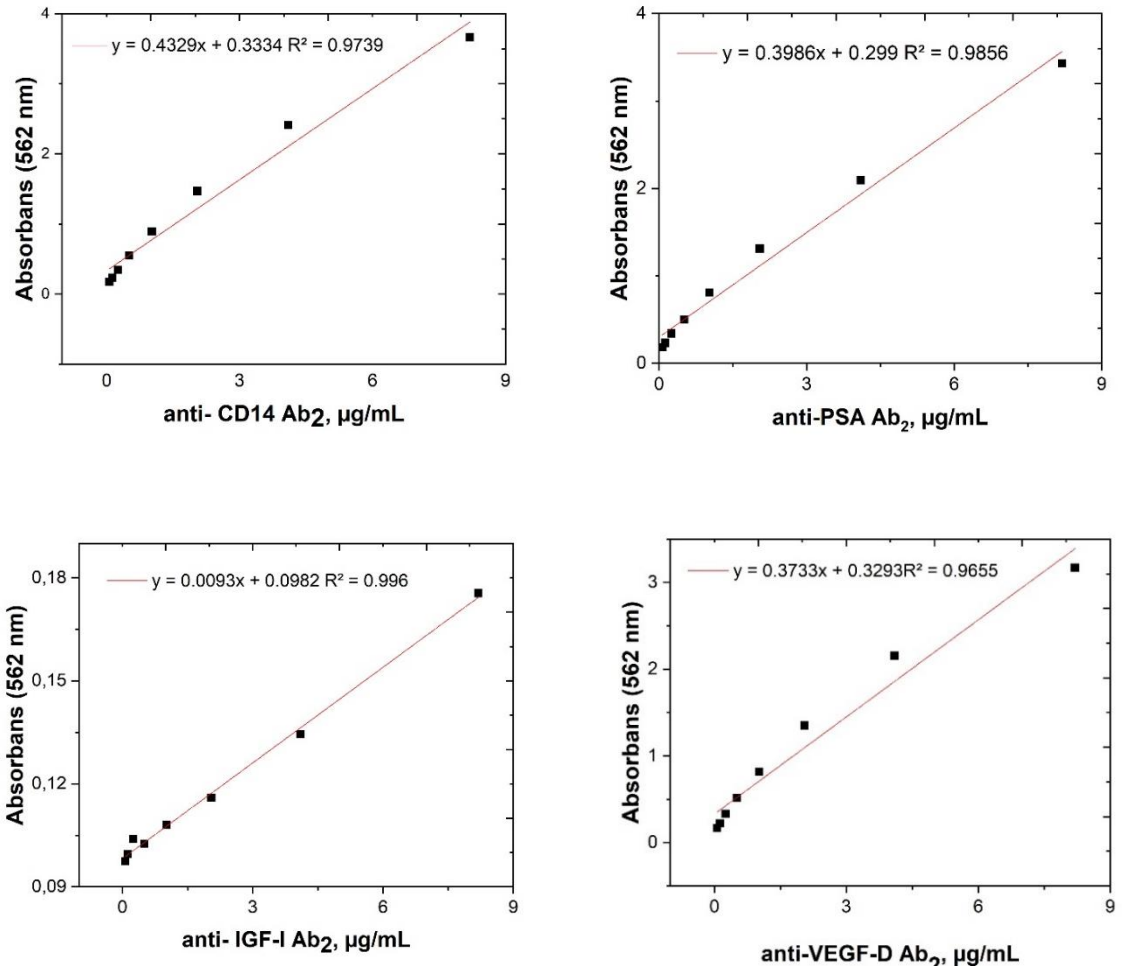
6.7.9 Micro Bicinchoninic Asit (μ BCA)² Protein Deneyi Sonuçları

BCA reaktifi uygulanan MP-Ab₂ ve MP'nin absorbandsı 562 nm'de ölçülmüştür. MP-Ab₂ ve MP için elde edilen kalibrasyon eğrisi şekil 6.42'de verilmiştir. MP-Ab₂ çözeltisinde bulunan ortalama Ab₂ konsantrasyonunu hesaplamak için, llen MP absorbandsı MP-Ab₂'den çıkarılmıştır. Ab₂'nin doğrusal kalibrasyon eğrisi için, iki katlı seyreltme serisi, 0,0625 μ g/mL'ye kadar 8,2 μ g/mL başlangıç konsantrasyonu ile hazırlanmıştır. Her bir Ab₂'nin kalibrasyon eğrisi şekil 6.43'te verilmiştir.

Manyetik partiküller üzerinde kaplanan Ab₂ konsantrasyonu, her ikincil antikör için bu yöntemle doğru bir şekilde hesaplanmıştır. Manyetik partikül çözeltisine ilave edilen Ab₂'lerin hepsi manyetik partiküllerle kompleks oluşturmamıştır. İnkübasyon ve yıkama aşamasından sonra, anti-CD14, anti-PSA, anti-VEGF-D ve anti-IGF-I için Ab₂ konsantrasyonunun 4,51, 8,24 6,38 ve 4,00 μ g/mL olduğu bulunmuştur. Bu tahmin biyokonjugatın hazırlık aşamasında 50 μ g/mL Ab₂ kullanıldığında geçerlidir.



Şekil 6.42 μ BCA protein deneyi için farklı MP-Ab₂ ve MP konsantrasyonlarının absorbans yanıtı



Şekil 6.43 µBCA protein testi için saf anti-CD14, anti-PSA, anti-VEGF-D ve anti-IGF-I Ab₂'nin kalibrasyon eğrisi

Gıda kaynaklı ve hastane kaynaklı enfeksiyonlar, morbidite ve mortaliteden sorumlu oldukları için halk sağlığı için önemli bir risk oluşturmaktadır. Enfeksiyonların erken teşhisi yapılırsa, bilinçli ve doğru seçim ile uygulanan antibiyotik tedavisi hastaneye yatırılan hastaların tedavisinde başarılı olacaktır. Bu nedenlerden dolayı, hastane enfeksiyonlarına neden olan bakterilerin hızlı tanımlanması uygun tedavi için önemlidir. Bu tez çalışmasında, dirençli veya duyarlı suşları hızlı bir şekilde tespit etmek için antimikrobiyal duyarlılık testinin kullanımını gösterilmiştir. MRSA ve VRE suşları antibiyotik akışı sırasında neredeyse sabit bir SPR açısına sahip olduğu belirlenmiştir. Sefoksitin ve vankomisin bakteri hücre duvarı sentezini engellediğinden, MSSA ve VSE suşları düzenli bir SPR açısı düşüşü sergilemiştir. Dirençli ve duyarlı suşlar, SPR kullanılarak 12 saatten daha az bir sürede (MRSA ve MSSA için 3 saat, VRE ve VSE için 6 saat) tespit edilebilmiştir ve test için seyreltme gerektirmedikleri için doğrudan sistemde kullanılabilmiştir. Tez çalışmasının en önemli yanı antimikrobiyal duyarlılık testinin gelişmiş çok kanallı bir sistemle yapılmasıdır. Bu sistemle, bir kontrol numunesi ile aynı anda çoklu analizler yapılmıştır. Tez çalışması, mevcut sistemin antimikrobiyal duyarlılık testi için geleneksel tespit tekniklerine bir alternatif sunduğunu göstermektedir.

Geleneksel yöntemlerle enfeksiyon etkeni olan bakterilerin tanımlanmasında kullanılan yöntemler ile sonuçların elde edilmesi en az 3-4 gün sürmektedir. Sensör sistemleri ile bu süre bir günden daha az bir süreye indirilebilmektedir. Tez çalışmasında, gıda kaynaklı veya hastane kaynaklı enfeksiyonlara sebep olan MRSA bakterisi SPR biyosensörü ile hızlı bir şekilde saptanabilmiştir. Bu amaçla, protein G tabanlı bir yüzey geliştirilerek anti-MRSA aracılığıyla MRSA saptanmıştır. Ayrıca *E. coli* ATCC 25922 kullanılarak anti-MRSA monoklonal antikörünün özgül olduğu kanıtlanmıştır. MRSA'nın LOD değeri $\sim 10^4$ KOB/mL olarak saptanmıştır. Ancak akış

koşulları ve yüzey özellikleri değiştirilerek LOD değeri daha düşük konsantrasyonlarda mikroorganizma tespitine imkan tanıyabileceği belirlenmiştir.

Tezin son kısmında kanser biyomarker tespiti için Au yüzeyine bağlanan farklı yakalama antikorları içeren SPRI immünoarrayi gösterilmiştir. Sekonder antikorlarla kaplanmış manyetik partiküller, buzağı serumundan CD14, IGF-I ve VEGF-D biyomarkerlarını yakalamak için kullanılmıştır. Bunlar da doğrudan buzağı serumunda bulunan antijenlerin pikogram seviyelerini tespit etmek için SPRI çipindeki spesifik yakalama antikorları spotlarına doğrudan bağlanmıştır. Manyetik partiküller kullanılarak buzağı serumunda SPRI tarafından kanser biyomarkerlarının ultra düşük saptama sınırlarına ulaşılmıştır.

Her biyomarkerların dinamik aralığı, çoklu tespitten önce belirlenmiştir. Bunu yaparak, her bir biyomarker arasındaki birleşme ve ayrılma oranının farklı olduğu da belirlenmiştir. IGF-I ve VEGF-D hemen hemen aynı birleşme ve ayrılma oranına sahip olduğu, ancak CD14 diğerlerinden daha düşük birleşme ve ayrılma oranlarına sahip olduğu belirlenmiştir. BSA spotlarında çok az spesifik olmayan bağlanma meydana geldiği görülmüştür. Ancak bu artış, MP-Abz'nin spotlar üzerinde birikmesi ile yorumlanmıştır. Öte yandan, her biyomarker spesifik olarak kendi yakalama antikoruna bağlanmıştır. Çoklu tespitten sonra kalibrasyon eğrisini çizerken, CD14 spotlarının 12,5 pg/mL konsantrasyonunda anlamlı bir tepki vermediği gözlenmiştir. Tüm antijen konsantrasyonları, kendi yakalama antikorlarını içeren spotlarda iyi yanıtlar vermiştir. Bu üç biyomarkerların çoklu tespiti, iki bloklama aşaması (etanolamin ve BSA) kullanılarak spesifik olmayan bağlanmayı ortadan kaldırarak gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak, yapılan tez çalışması ile patojen bakteriler ve kanser biyomarkerları SPR ile eş zamanlı ve çoklu olarak tespit edilebilmiştir. Gelecekte, geliştirilen metotlar gıdalarda bulunması istenmeyen ve enfeksiyonlara neden olan çeşitli gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde kullanılabilecektir.

- [1] V. Perumal and U. Hashim, "Advances in biosensors: Principle, architecture and applications," *Journal of Applied Biomedicine*, vol. 12, pp. 1-15, 2014.
- [2] D. W. Morrison, M. R. Dokmeci, U. Demirci, and A. Khademhosseini, "Clinical applications of micro-and nanoscale biosensors," *Biomedical nanostructures*, vol. 1, pp. 433-458, 2008.
- [3] J. Leva-Bueno, S. A. Peyman, and P. Millner, "A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection," *Medical Microbiology and Immunology*, 2020.
- [4] E. M. Hassan and M. C. DeRosa, "Recent advances in cancer early detection and diagnosis: role of nucleic acid based aptasensors," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, p. 115806, 2020.
- [5] P. Mehrotra, "Biosensors and their applications–A review," *Journal of oral biology and craniofacial research*, vol. 6, pp. 153-159, 2016.
- [6] E. Galindo, "Biosensors," *Biotechnology*, vol. 2, 2009.
- [7] B. A. Cornell, V. L. B. Braach-Maksvytis, L. G. King, P. D. J. Osman, B. Raguse, L. Wiczorek, *et al.*, "A biosensor that uses ion-channel switches," *Nature*, vol. 387, p. 580, 1997.
- [8] K. Cammann, "Bio-sensors based on ion-selective electrodes," *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie*, vol. 287, pp. 1-9, 1977.
- [9] A. Sobiepanek and T. Kobiela, "Application of biosensors in cancer research," *Review and Research on Cancer Treatment*, vol. 4, pp. 4-12, 2018.
- [10] L. C. Clark Jr and C. Lyons, "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery," *Annals of the New York Academy of sciences*, vol. 102, pp. 29-45, 1962.
- [11] G. G. Guilbault and J. G. Montalvo Jr, "Urea-specific enzyme electrode," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 91, pp. 2164-2165, 1969.
- [12] D. Lübbers and N. Opitz, "The pCO₂-/pO₂-optode: a new probe for measurement of pCO₂ or pO in fluids and gases (authors transl)," *Zeitschrift für Naturforschung. Section C, Biosciences*, vol. 30, pp. 532-533, 1975.
- [13] A. Clemens, P. Chang, and R. Myers, "De Diabetologie de L'Hotel-Dieu," *Proc Journees Ann, Paris*, 1976.
- [14] M. Shichiri, Y. Yamasaki, R. Kawamori, N. Hakui, and H. Abe, "Wearable artificial endocrine pancreas with needle-type glucose sensor," *The Lancet*, vol. 320, pp. 1129-1131, 1982.
- [15] B. Meshram, A. Agrawal, S. Adil, S. Ranvir, and K. Sande, "Biosensor and its application in food and dairy industry: a review," *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, vol. 7, pp. 3305-3324, 2018.

- [16] N. M. Ravindra, C. Prodan, S. Fnu, I. Padronl, and S. K. Sikha, "Advances in the manufacturing, types, and applications of biosensors," *Jom*, vol. 59, pp. 37-43, 2007.
- [17] S. Malhotra, A. Verma, N. Tyagi, and V. Kumar, "Biosensors: principle, types and applications," *Int. J. Adv. Res. Innov. Ideas Educ*, vol. 3, pp. 3639-3644, 2017.
- [18] M. Rubab, H. M. Shahbaz, A. N. Olaimat, and D.-H. Oh, "Biosensors for rapid and sensitive detection of Staphylococcus aureus in food," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 105, pp. 49-57, 2018.
- [19] S. Pandit, D. Dasgupta, N. Dewan, and A. Prince, "Nanotechnology based biosensors and its application," *The Pharma Innovation*, vol. 5, p. 18, 2016.
- [20] S. K. Metkar and K. Girigoswami, "Diagnostic biosensors in medicine–a review," *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, vol. 17, pp. 271-283, 2019.
- [21] T. Vo-Dinh and B. Cullum, "Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics," *Fresenius' journal of analytical chemistry*, vol. 366, pp. 540-551, 2000.
- [22] D. R. Thevenot, K. Toth, R. A. Durst, and G. S. Wilson, "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification," *Pure and applied chemistry*, vol. 71, pp. 2333-2348, 1999.
- [23] M. Mehrvar and M. Abdi, "Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors," *Analytical sciences*, vol. 20, pp. 1113-1126, 2004.
- [24] T. Bhardwaj, "A review on immobilization techniques of biosensors," *International Journal of Engineering Research*, vol. 3, 2014.
- [25] R. Monošík, M. Stred'anský, and E. Šturdík, "Biosensors-classification, characterization and new trends," *Acta Chimica Slovaca*, vol. 5, pp. 109-120, 2012.
- [26] A. Collings and F. Caruso, "Biosensors: recent advances," *Reports on Progress in Physics*, vol. 60, p. 1397, 1997.
- [27] C. Kasavi, "Kovalent Bağlanma ve Fiziksel Adsorpsiyon Metotları ile Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu," Doktora Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, 2006.
- [28] Y. Li, "Li, Yanbin. 2006. Section 2.3 Biosensors, pp. 52-93, of Chapter 2 Hardware, in CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI Information Technology. Edited by CIGR-The International Commission of Agricultural Engineering; Volume Editor, Axel Munack. St. Joseph, Michigan, USA: ASABE. Copyright American Society of Agricultural Engineers. Çevirmenler: Pınar DEMİRCİOĞLU ve İsmail BÖĞREKÇİ."
- [29] J. Li, S. N. Tan, and H. Ge, "Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for hydrogen peroxide," *Analytica Chimica Acta*, vol. 335, pp. 137-145, 1996.
- [30] T. Bhardwaj, "Review on biosensor technologies," *International Journal of Advanced Research in Engineering and Technology*, vol. 6, pp. 36-62, 2015.

- [31] D. Ivnitski, I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, E. Wilkins, and S. Stricker, "Application of electrochemical biosensors for detection of food pathogenic bacteria," *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, vol. 12, pp. 317-325, 2000.
- [32] B. Sağbaş and N. Durakbaşı, "Tibbi Ölçüm Ve Analizlerde Kullanılan Biyosensörler," *Engineer & the Machinery Magazine*, 2010.
- [33] A. Touhami, "Biosensors and nanobiosensors: design and applications," *Nanomedicine*, vol. 15, pp. 374-403, 2014.
- [34] S. Robertson. (2018, 20.09.2018). *Biosensor Principles*. Available: <https://www.news-medical.net/health/Biosensor-Principles.aspx>
- [35] S. P. Mohanty and E. Kougiannos, "Biosensors: a tutorial review," *Ieee Potentials*, vol. 25, pp. 35-40, 2006.
- [36] R. K. Darsanaki, A. Azizzadeh, M. Nourbakhsh, G. Raeisi, and M. A. Aliabadi, "Biosensors: functions and applications," *Journal of Biology and Today's World*, vol. 2, pp. 53-61, 2013.
- [37] N. S. Fracchiolla, S. Artuso, and A. Cortelezzi, "Biosensors in clinical practice: focus on oncohematology," *Sensors*, vol. 13, pp. 6423-6447, 2013.
- [38] P. Arora, A. Sindhu, N. Dilbaghi, and A. Chaudhury, "Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 28, pp. 1-12, 2011.
- [39] Y. Chen, Z. Wang, Y. Liu, X. Wang, Y. Li, P. Ma, *et al.*, "Recent advances in rapid pathogen detection method based on biosensors," *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 37, pp. 1021-1037, 2018.
- [40] A. Koyun, E. Ahlatcolu, Y. Koca, and S. Kara, "Biosensors and their principles," *A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones*, pp. 117-142, 2012.
- [41] X. Xu, P. Clement, J. Eklöf-Österberg, N. Kelley-Loughnane, K. Moth-Poulsen, J. L. Chávez, *et al.*, "Reconfigurable Carbon Nanotube Multiplexed Sensing Devices," *Nano Letters*, 2018.
- [42] D. Rojas, F. Della Pelle, M. Del Carlo, M. d'Angelo, R. Dominguez-Benot, A. Cimini, *et al.*, "Electrodeposited Prussian Blue on carbon black modified disposable electrodes for direct enzyme-free H₂O₂ sensing in a Parkinson's disease in vitro model," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 275, pp. 402-408, 2018.
- [43] S.-E. Kim, Y. J. Kim, S. Song, K.-N. Lee, and W. K. Seong, "A simple electrochemical immunosensor platform for detection of Apolipoprotein A1 (Apo-A1) as a bladder cancer biomarker in urine," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 278, pp. 103-109, 2019.
- [44] R. S. Bejjed, T. Z. G. de la Torre, M. Donolato, M. F. Hansen, P. Svedlindh, and M. Strömberg, "Turn-on optomagnetic bacterial DNA sequence detection using volume-amplified magnetic nanobeads," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 66, pp. 405-411, 2015.

- [45] B. Bucur, F.-D. Munteanu, J.-L. Marty, and A. Vasilescu, "Advances in Enzyme-Based Biosensors for Pesticide Detection," *Biosensors*, vol. 8, p. 27, 2018.
- [46] C. Slouka, G. C. Brunauer, J. Kopp, M. Strahammer, J. Fricke, J. Fleig, *et al.*, "Low-Frequency Electrochemical Impedance Spectroscopy as a Monitoring Tool for Yeast Growth in Industrial Brewing Processes," *Chemosensors*, vol. 5, p. 24, 2017.
- [47] D. M. Mohsen, M. M. Elsayed, and G. A. AlBazedi, "Bacteria as Biosensor and Mercury Indicator for Control of Environmental Contaminants," *Research Journal Of Pharmaceutical Biological And Chemical Sciences*, vol. 8, pp. 1453-1458, 2017.
- [48] U. Aykut and H. Temiz, "Biyosensörler ve gıdalarda kullanımı," *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, vol. 3, pp. 51-52, 2006.
- [49] J. Kafashan and F. Azadshahraki, "Biosensors in Applications. *J Biosens Bioelectron* vol.7,pp. 2, 2016.
- [50] A. J. Sposito, A. Kurdekar, J. Zhao, and I. Hewlett, "Application of nanotechnology in biosensors for enhancing pathogen detection," *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 10, p. e1512, 2018.
- [51] L. Yang and R. Bashir, "Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria," *Biotechnology advances*, vol. 26, pp. 135-150, 2008.
- [52] V. Velusamy, K. Arshak, O. Korostynska, K. Oliwa, and C. Adley, "An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors," *Biotechnology advances*, vol. 28, pp. 232-254, 2010.
- [53] A. Singh, S. Poshtiban, and S. Evoy, "Recent advances in bacteriophage based biosensors for food-borne pathogen detection," *Sensors*, vol. 13, pp. 1763-1786, 2013.
- [54] M. Khater, A. de la Escosura-Muniz, and A. Merkoci, "Biosensors for plant pathogen detection," *Biosens Bioelectron*, vol. 93, pp. 72-86, Jul 15 2017.
- [55] D. Juronen, A. Kuusk, K. Kivirand, A. Rinken, and T. Rinken, "Immunosensing system for rapid multiplex detection of mastitis-causing pathogens in milk," *Talanta*, vol. 178, pp. 949-954, 2018/02/01/ 2018.
- [56] D. Ivnitski, I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, and E. Wilkins, "Biosensors for detection of pathogenic bacteria," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 14, pp. 599-624, 1999.
- [57] M. Mascini and S. Tombelli, "Biosensors for biomarkers in medical diagnostics," *Biomarkers*, vol. 13, pp. 637-657, 2008.
- [58] L. Bueno, W. de Araujo, and T. Paixão, "Point of care (POC) medical biosensors for cancer detection," in *Medical Biosensors for Point of Care (POC) Applications*, ed: Elsevier, 2017, pp. 183-201.

- [59] V. S. A. Jayanthi, A. B. Das, and U. Saxena, "Recent advances in biosensor development for the detection of cancer biomarkers," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 91, pp. 15-23, 2017.
- [60] R. Shandilya, A. Bhargava, N. Bunkar, R. Tiwari, I. Y. Goryacheva, and P. K. Mishra, "Nanobiosensors: point-of-care approaches for cancer diagnostics," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 130, pp. 147-165, 2019.
- [61] S. Griffin, "Biosensors for cancer detection applications," *Missouri S&T's Peer to Peer*, vol. 1, p. 6, 2017.
- [62] P. Jainish and P. Prittesh, "Biosensors and biomarkers: promising tools for cancer diagnosis," *Int J Biosen Bioelectron*, vol. 3, p. 00072, 2017.
- [63] F. J. Gruhl, B. E. Rapp, and K. Lange, "Biosensors for diagnostic applications," in *Molecular Diagnostics*, ed: Springer, 2011, pp. 115-148.
- [64] B. Bohunicky and S. A. Mousa, "Biosensors: the new wave in cancer diagnosis," *Nanotechnology, science and applications*, vol. 4, p. 1, 2011.
- [65] R. Arora and R. Saini, "Biosensors: Way of diagnosis," *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 4, pp. 2517-2527, 2013.
- [66] S. C. C. Wong, C. M. L. Chan, B. B. Y. Ma, M. Y. Y. Lam, G. C. G. Choi, T. C. C. Au, *et al.*, "Advanced proteomic technologies for cancer biomarker discovery," *Expert review of proteomics*, vol. 6, pp. 123-134, 2009.
- [67] L. Villarreal-Gomez, I. Soria-Mercado, M. Hernandez-Gomez, and R. Giraldi, "Detection of molecular markers of cancer through the use of biosensors," *Biol Med (Aligarh) S*, vol. 2, p. 3, 2015.
- [68] C. D. Medley, J. E. Smith, Z. Tang, Y. Wu, S. Bamrungsap, and W. Tan, "Gold nanoparticle-based colorimetric assay for the direct detection of cancerous cells," *Analytical chemistry*, vol. 80, pp. 1067-1072, 2008.
- [69] S. A. Soper, K. Brown, A. Ellington, B. Frazier, G. Garcia-Manero, V. Gau, *et al.*, "Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, pp. 1932-1942, 2006.
- [70] I. E. Tothill, "Biosensors for cancer markers diagnosis," in *Seminars in cell & developmental biology*, 2009, pp. 55-62.
- [71] A. Rasooly and J. Jacobson, "Development of biosensors for cancer clinical testing," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, pp. 1851-1858, 2006.
- [72] R. Ranjan, E. N. Esimbekova, and V. A. Kratasyuk, "Rapid biosensing tools for cancer biomarkers," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 87, pp. 918-930, 2017.
- [73] Y. Zeng, R. Hu, L. Wang, D. Gu, J. He, S.-Y. Wu, *et al.*, "Recent advances in surface plasmon resonance imaging: detection speed, sensitivity, and portability," *Nanophotonics*, vol. 6, pp. 1017-1030, 2017.
- [74] S. D. Mazumdar, M. Hartmann, P. Kampfer, and M. Keusgen, "Rapid method for detection of Salmonella in milk by surface plasmon resonance (SPR)," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, pp. 2040-2046, 2007.

- [75] R. H. Ritchie, "Plasma losses by fast electrons in thin films," *Physical review*, vol. 106, p. 874, 1957.
- [76] C. Powell and J. Swan, "Origin of the characteristic electron energy losses in aluminum," *Physical Review*, vol. 115, p. 869, 1959.
- [77] A. Otto, "Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection," *Zeitschrift für Physik A Hadrons and nuclei*, vol. 216, pp. 398-410, 1968.
- [78] Y. Tang, X. Zeng, and J. Liang, "Surface plasmon resonance: an introduction to a surface spectroscopy technique," *Journal of chemical education*, vol. 87, pp. 742-746, 2010.
- [79] N. A. Masdor, Z. Altintas, and I. E. Tothill, "Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of *Campylobacter jejuni*," *Chemosensors*, vol. 5, p. 16, 2017.
- [80] M. Boulade, A. Morlay, F. Piat, Y. Roupioz, T. Livache, P. G. Charette, *et al.*, "Early detection of bacteria using SPR imaging and event counting: experiments with *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*," *RSC advances*, vol. 9, pp. 15554-15560, 2019.
- [81] L. Liu, N. Xia, and J. Wang, "Potential applications of SPR in early diagnosis and progression of Alzheimer's disease," *Rsc Advances*, vol. 2, pp. 2200-2204, 2012.
- [82] J. Waswa, J. Irudayaraj, and C. DebRoy, "Direct detection of *E. Coli* O157: H7 in selected food systems by a surface plasmon resonance biosensor," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 40, pp. 187-192, 2007.
- [83] F. Fernández, K. Hegnerová, M. Piliarik, F. Sanchez-Baeza, J. Homola, and M.-P. Marco, "A label-free and portable multichannel surface plasmon resonance immunosensor for on site analysis of antibiotics in milk samples," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, pp. 1231-1238, 2010.
- [84] H. Vaisocherová-Lísalová, I. Víšová, M. L. Ermini, T. Špringer, X. C. Song, J. Mrázek, *et al.*, "Low-fouling surface plasmon resonance biosensor for multi-step detection of foodborne bacterial pathogens in complex food samples," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 80, pp. 84-90, 2016.
- [85] B. Barlen, S. D. Mazumdar, O. Lezrich, P. Kämpfer, and M. Keusgen, "Detection of *Salmonella* by surface plasmon resonance," *Sensors*, vol. 7, pp. 1427-1446, 2007.
- [86] E. Thomas, A. Bouma, E. van Eerden, W. J. Landman, F. van Knapen, A. Stegeman, *et al.*, "Detection of egg yolk antibodies reflecting *Salmonella enteritidis* infections using a surface plasmon resonance biosensor," *Journal of immunological methods*, vol. 315, pp. 68-74, 2006.
- [87] J. Waswa, C. Debroy, and J. Irudayaraj, "Rapid detection of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* using surface plasmon resonance biosensor," *Journal of Food Process Engineering*, vol. 29, pp. 373-385, 2006.

- [88] J. Homola, J. Dostalek, S. Chen, A. Rasooly, S. Jiang, and S. S. Yee, "Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk," *International journal of food microbiology*, vol. 75, pp. 61-69, 2002.
- [89] S. Wang, F. Inci, T. L. Chaunzwa, A. Ramanujam, A. Vasudevan, S. Subramanian, *et al.*, "Portable microfluidic chip for detection of Escherichia coli in produce and blood," *International journal of nanomedicine*, vol. 7, p. 2591, 2012.
- [90] J. S. Kee, S. Y. Lim, A. P. Perera, Y. Zhang, and M. K. Park, "Plasmonic nanohole arrays for monitoring growth of bacteria and antibiotic susceptibility test," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 182, pp. 576-583, 2013.
- [91] S. Yodmongkol, S. Thaweboon, B. Thaweboon, C. Puttharugsa, B. Sutapun, R. Amarit, *et al.*, "Application of surface plasmon resonance biosensor for the detection of Candida albicans," *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 55, p. 02BE03, 2015.
- [92] N. Tawil, E. Sacher, R. Mandeville, and M. Meunier, "Surface plasmon resonance detection of E. coli and methicillin-resistant S. aureus using bacteriophages," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 37, pp. 24-29, 2012.
- [93] A. S. Breathnach, "Nosocomial infections and infection control," *Medicine*, vol. 41, pp. 649-653, 2013.
- [94] WHO, "Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. 2011," 2020.
- [95] H. A. Khan, F. K. Baig, and R. Mehboob, "Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance," *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 7, pp. 478-482, 2017.
- [96] M. C. Enright, "The evolution of a resistant pathogen—the case of MRSA," *Current opinion in pharmacology*, vol. 3, pp. 474-479, 2003.
- [97] B. Ballhausen, A. Kriegeskorte, N. Schleimer, G. Peters, and K. Becker, "The mecA homolog mecC confers resistance against β -lactams in Staphylococcus aureus irrespective of the genetic strain background," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 58, pp. 3791-3798, 2014.
- [98] B. L. Hollenbeck and L. B. Rice, "Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus," *Virulence*, vol. 3, pp. 421-569, 2012.
- [99] Y. Cetinkaya, P. Falk, and C. G. Mayhall, "Vancomycin-resistant enterococci," *Clinical microbiology reviews*, vol. 13, pp. 686-707, 2000.
- [100] C. Lemieux, M. Gardam, G. Evans, M. John, K. N. Suh, E. Vicencio, *et al.*, "Longitudinal multicenter analysis of outcomes after cessation of control measures for vancomycin-resistant enterococci," *infection control & hospital epidemiology*, vol. 38, pp. 24-30, 2017.
- [101] F. C. Tenover, "Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria," *The American journal of medicine*, vol. 119, pp. S3-S10, 2006.

- [102] C. Watanakunakorn, "The antibacterial action of vancomycin," *Reviews of infectious diseases*, vol. 3, pp. S210-S215, 1981.
- [103] P. Lagacé-Wiens, H. Adam, N. Laing, M. Baxter, I. Martin, M. Mulvey, *et al.*, "Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* to alternative antimicrobials with therapeutic potential," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 72, pp. 2273-2277, 2017.
- [104] H. S. Heine, L. Miller, S. Halasohoris, and B. K. Purcell, "In vitro antibiotic susceptibilities of *Francisella tularensis* determined by broth microdilution following CLSI methods," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 61, pp. e00612-17, 2017.
- [105] X. Zhang, J. Tian, W. Shan, J. Xue, Y. Tao, Q. Geng, *et al.*, "Characteristics of pediatric invasive pneumococcal diseases and the pneumococcal isolates in Suzhou, China before introduction of PCV13," *Vaccine*, vol. 35, pp. 4119-4125, 2017.
- [106] W. Ji, L. Zhang, Z. Guo, S. Xie, W. Yang, J. Chen, *et al.*, "Colonization prevalence and antibiotic susceptibility of Group B *Streptococcus* in pregnant women over a 6-year period in Dongguan, China," *PloS one*, vol. 12, p. e0183083, 2017.
- [107] S. Kang, J. Lee, and M. Kim, "The association between *Staphylococcus aureus* nasal colonization and symptomatic infection in children in Korea where ST72 is the major genotype: A prospective observational study," *Medicine*, vol. 96, 2017.
- [108] Y.-L. Chiang, C.-H. Lin, M.-Y. Yen, Y.-D. Su, S.-J. Chen, and H.-f. Chen, "Innovative antimicrobial susceptibility testing method using surface plasmon resonance," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, pp. 1905-1910, 2009.
- [109] K. Syal, R. Iriya, Y. Yang, H. Yu, S. Wang, S. E. Haydel, *et al.*, "Antimicrobial susceptibility test with plasmonic imaging and tracking of single bacterial motions on nanometer scale," *ACS nano*, vol. 10, pp. 845-852, 2016.
- [110] W. E. Kloos and T. L. Bannerman, "Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci," *Clinical microbiology reviews*, vol. 7, pp. 117-140, 1994.
- [111] L. G. Harris, S. Foster, and R. G. Richards, "An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review," *Eur Cell Mater*, vol. 4, pp. 39-60, 2002.
- [112] J. Begun, C. D. Sifri, S. Goldman, S. B. Calderwood, and F. M. Ausubel, "Staphylococcus aureus virulence factors identified by using a high-throughput *Caenorhabditis elegans*-killing model," *Infection and immunity*, vol. 73, pp. 872-877, 2005.
- [113] R. H. Deurenberg and E. E. Stobberingh, "The evolution of *Staphylococcus aureus*," *Infection, genetics and evolution*, vol. 8, pp. 747-763, 2008.

- [114] P. Nastaly, M. Grinholc, and K. P. Bielawski, "Molecular characteristics of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains for clinical medicine," *Archives of microbiology*, vol. 192, pp. 603-617, 2010.
- [115] F. D. Lowy, "Staphylococcus aureus infections," *New England journal of medicine*, vol. 339, pp. 520-532, 1998.
- [116] J. Kim, "Understanding the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *Clinical Microbiology Newsletter*, vol. 31, pp. 17-23, 2009.
- [117] M. Monaco, F. P. de Araujo, M. Cruciani, E. M. Coccia, and A. Pantosti, "Worldwide epidemiology and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*," in *Staphylococcus aureus*, ed: Springer, 2016, pp. 21-56.
- [118] H. F. Wertheim, D. C. Melles, M. C. Vos, W. van Leeuwen, A. van Belkum, H. A. Verbrugh, *et al.*, "The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections," *The Lancet infectious diseases*, vol. 5, pp. 751-762, 2005.
- [119] J. A. Lindsay and M. T. Holden, "Staphylococcus aureus: superbug, super genome?," *Trends in microbiology*, vol. 12, pp. 378-385, 2004.
- [120] S. Stefani, D. R. Chung, J. A. Lindsay, A. W. Friedrich, A. M. Kearns, H. Westh, *et al.*, "Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods," *International journal of antimicrobial agents*, vol. 39, pp. 273-282, 2012.
- [121] S. Y. Tong, L. F. Chen, and V. G. Fowler, "Colonization, pathogenicity, host susceptibility, and therapeutics for *Staphylococcus aureus*: what is the clinical relevance?," in *Seminars in immunopathology*, 2012, pp. 185-200.
- [122] S. McNicholas, A. F. Talento, J. O'Gorman, M. M. Hannan, M. Lynch, C. M. Greene, *et al.*, "Cytokine responses to *Staphylococcus aureus* bloodstream infection differ between patient cohorts that have different clinical courses of infection," *BMC infectious diseases*, vol. 14, p. 580, 2014.
- [123] A. Morad Asaad, M. Ansar Qureshi, and S. Mujeeb Hasan, "Clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolates from nosocomial bloodstream infections," *Infectious Diseases*, vol. 48, pp. 356-360, 2016.
- [124] N. Yildiz Deniz, "Yoğun Bakimdan İzole Edilen Mrsa Suşlarında Meca Geni Varlığının Konvansiyonel, Otomatize Ve Pcr Yöntemi İle Tespiti," Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, *Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi*, 2019.
- [125] E. Hortaç İstar, "Çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle araştırılması," Uzmanlık Tezi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, *Başkent Üniversitesi*, 2018.
- [126] S. Y. Tong, J. S. Davis, E. Eichenberger, T. L. Holland, and V. G. Fowler, "Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management," *Clinical microbiology reviews*, vol. 28, pp. 603-661, 2015.

- [127] R. Köck, K. Becker, B. Cookson, J. van Gemert-Pijnen, S. Harbarth, J. Kluytmans, *et al.*, "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe," 2010.
- [128] A. P. Kourtis, K. Hatfield, J. Baggs, Y. Mu, I. See, E. Epton, *et al.*, "Vital signs: epidemiology and recent trends in methicillin-resistant and in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections—United States," *Morbidity and Mortality Weekly Report*, vol. 68, p. 214, 2019.
- [129] L. Mocan, I. Ilie, C. Matea, F. Tabaran, E. Kalman, C. Iancu, *et al.*, "Surface plasmon resonance-induced photoactivation of gold nanoparticles as bactericidal agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *International journal of nanomedicine*, vol. 9, p. 1453, 2014.
- [130] E. F. Kong, J. K. Johnson, and M. A. Jabra-Rizk, "Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an enemy amidst us," *PLoS pathogens*, vol. 12, 2016.
- [131] H. F. Chambers and M. Sachdeva, "Binding of β -lactam antibiotics to penicillin-binding proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 161, pp. 1170-1176, 1990.
- [132] Y. Utsui and T. Yokota, "Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin-and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 28, pp. 397-403, 1985.
- [133] C. Kim, C. Milheiriço, S. Gardete, M. A. Holmes, M. T. Holden, H. de Lencastre, *et al.*, "Properties of a novel PBP2A protein homolog from *Staphylococcus aureus* strain LGA251 and its contribution to the β -lactam-resistant phenotype," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, pp. 36854-36863, 2012.
- [134] L. García-Álvarez, M. T. Holden, H. Lindsay, C. R. Webb, D. F. Brown, M. D. Curran, *et al.*, "Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study," *The Lancet infectious diseases*, vol. 11, pp. 595-603, 2011.
- [135] A. C. Shore, E. C. Deasy, P. Slickers, G. Brennan, B. O'Connell, S. Monecke, *et al.*, "Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 55, pp. 3765-3773, 2011.
- [136] T. Ito, K. Hiramatsu, A. Tomasz, H. De Lencastre, V. Perreten, M. T. Holden, *et al.*, "Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 56, pp. 4997-4999, 2012.
- [137] A. Hassoun, P. K. Linden, and B. Friedman, "Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations—a review of recent developments in MRSA management and treatment," *Critical care*, vol. 21, p. 211, 2017.
- [138] W.-S. Chan, T.-M. Chan, T.-W. Lai, J. F.-W. Chan, R. W.-M. Lai, C. K.-C. Lai, *et al.*, "Complementary use of MALDI-TOF MS and real-time PCR-melt curve

- analysis for rapid identification of methicillin-resistant staphylococci and VRE," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 70, pp. 441-447, 2015.
- [139] Y. Dicle, "Klinik örneklerden izole edilen metisilin dirençli staphylococcus aureus (MRSA) suşlarında siprofloksasin'in yeşil çay ile sinerjik etkisinin dama tahtası yöntemiyle araştırılması," Doktora Tezi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, *Atatürk Üniversitesi*, 2018.
- [140] E. M. Sarıcaoğlu, "Metisiline Dirençli Staphylococcus Aureus (Mrsa) Suşlarının Farklı Antistafilokokal Ajanlara Duyarlılıklarının Belirlenmesi Ve Duyarlılıkların Klinik Sonuçlar Üzerine Etkisinin Araştırılması," Tıpta Uzmanlık Tezi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, *Ankara Üniversitesi*, 2018.
- [141] W. A. McGuinness, N. Malachowa, and F. R. DeLeo, "Vancomycin Resistance in Staphylococcus aureus" *The Yale journal of biology and medicine*, vol. 90, pp. 269-281, 2017.
- [142] G. Kapoor, S. Saigal, and A. Elongavan, "Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians," *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*, vol. 33, p. 300, 2017.
- [143] D. F. Brown, "Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 48, pp. 65-70, 2001.
- [144] A. Medhus, J. S. Slettemeås, L. Marstein, K. W. Larssen, and M. Sunde, "Methicillin-resistant Staphylococcus aureus with the novel mecC gene variant isolated from a cat suffering from chronic conjunctivitis," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 68, pp. 968-969, 2013.
- [145] J. H. Lee, J.-M. Jeong, Y.-H. Park, S.-S. Choi, Y.-H. Kim, J.-S. Chae, *et al.*, "Evaluation of the methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)-screen latex agglutination test for detection of MRSA of animal origin," *Journal of clinical microbiology*, vol. 42, pp. 2780-2782, 2004.
- [146] E. L. Palavecino, "Rapid methods for detection of MRSA in clinical specimens," in *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) protocols*, ed: Springer, 2014, pp. 71-83.
- [147] D. F. Brown and E. Walpole, "Evaluation of the Mastalex latex agglutination test for methicillin resistance in Staphylococcus aureus grown on different screening media," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 47, pp. 187-189, 2001.
- [148] H. C. Koydemir, H. Kūlah, C. Ŗzgen, A. Alp, and G. Hasçelik, "MEMS biosensors for detection of methicillin resistant Staphylococcus aureus," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 29, pp. 1-12, 2011.
- [149] D. Jonas, M. Speck, F. Daschner, and H. Grundmann, "Rapid PCR-based identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from screening swabs," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40, pp. 1821-1823, 2002.

- [150] J. Zurita, C. Mejía, and M. Guzmán-Blanco, "Diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America," *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, vol. 14, pp. 97-106, 2010.
- [151] P. C. Appelbaum, "Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 45, pp. S165-S170, 2007.
- [152] P. Datta, N. Gulati, N. Singla, H. R. Vasdeva, K. Bala, J. Chander, *et al.*, "Evaluation of various methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and susceptibility patterns," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 60, pp. 1613-1616, 2011.
- [153] R. K. Panda, A. Mahapatra, B. Mallick, and N. Chayani, "Evaluation of genotypic and phenotypic methods for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary care hospital of Eastern Odisha," *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, vol. 10, p. DC19, 2016.
- [154] N. M. Ermenlieva, T. T. Todorova, G. S. Tsankova, T. K. Popova, and E. P. Georgieva, "Effectiveness of MRSA detection methods in the laboratory practice—a brief review," *Journal of IMAB—Annual Proceeding Scientific Papers*, vol. 22, pp. 1157-1159, 2016.
- [155] C. Cuny, F. Layer, B. Strommenger, and W. Witte, "Rare occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel *mecA* homologue in humans in Germany," *PloS one*, vol. 6, 2011.
- [156] H. Peng, D. Liu, Y. Ma, and W. Gao, "Comparison of community-and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a Chinese tertiary hospital, 2012–2017," *Scientific reports*, vol. 8, pp. 1-8, 2018.
- [157] E. J. Choo, "Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nosocomial infections," *Infection & chemotherapy*, vol. 49, pp. 158-159, 2017.
- [158] P. Vysakh and M. Jeya, "A comparative analysis of community acquired and hospital acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*," *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, vol. 7, p. 1339, 2013.
- [159] J. R. Fitzgerald, "Human origin for livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *MBio*, vol. 3, pp. e00082-12, 2012.
- [160] M. Murra, K. Mortensen, and M. Wang, "Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (clonal complex 398) causing bacteremia and epidural abscess," *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 81, pp. 107-109, 2019.
- [161] A. Dorado-García, M. E. Bos, H. Graveland, B. A. Van Cleef, K. M. Verstappen, J. A. Kluytmans, *et al.*, "Risk factors for persistence of livestock-associated MRSA and environmental exposure in veal calf farmers and their family members: an observational longitudinal study," *BMJ open*, vol. 3, p. e003272, 2013.

- [162] J. Bernier-Lachance, J. Arsenault, V. Usongo, É. Parent, J. Labrie, M. Jacques, *et al.*, "Prevalence and characteristics of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) isolated from chicken meat in the province of Quebec, Canada," *Plos one*, vol. 15, p. e0227183, 2020.
- [163] Y. Fan, M. Cui, Y. Liu, M. Jin, and H. Zhao, "Selection and characterization of DNA aptamers for constructing colorimetric biosensor for detection of PBP2a," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 228, p. 117735, 2020.
- [164] J. Maldonado, M.-C. Estévez, A. Fernández-Gavela, J. J. González-López, A. B. González-Guerrero, and L. M. Lechuga, "Label-free detection of nosocomial bacteria using a nanophotonic interferometric biosensor," *Analyst*, 2020.
- [165] H. Lee, J. O. Keem, H. Cho, J. M. Choi, W. S. Chung, D.-Y. Jeon, *et al.*, "High-performance nanogap electrode-based impedimetric sensor for direct DNA assays," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 118, pp. 153-159, 2018.
- [166] Y. Wang, W. Yan, S. Fu, S. Hu, Y. Wang, J. Xu, *et al.*, "Multiple cross displacement amplification coupled with nanoparticles-based lateral flow biosensor for detection of *Staphylococcus aureus* and identification of methicillin-resistant *S. aureus*," *Frontiers in microbiology*, vol. 9, p. 907, 2018.
- [167] L. Xu, W. Liang, Y. Wen, L. Wang, X. Yang, S. Ren, *et al.*, "An ultrasensitive electrochemical biosensor for the detection of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 99, pp. 424-430, 2018.
- [168] K. Watanabe, N. Kuwata, H. Sakamoto, Y. Amano, T. Satomura, and S.-i. Suye, "A smart DNA sensing system for detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using modified nanoparticle probes," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 67, pp. 419-423, 2015.
- [169] K. Nawattanapaiboon, W. Kiatpathomchai, P. Santanirand, A. Vongsakulyanon, R. Amarit, A. Somboonkaew, *et al.*, "SPR-DNA array for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in combination with loop-mediated isothermal amplification," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 74, pp. 335-340, 2015.
- [170] N. Hiremath, R. Guntupalli, V. Vodyanoy, B. A. Chin, and M.-K. Park, "Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using novel lytic phage-based magnetoelastic biosensors," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 210, pp. 129-136, 2015.
- [171] W. C. Lindsey, E. S. Woodruff, D. Weed, D. C. Ward, and R. D. Jenison, "Development of a rapid diagnostic assay for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus*," *Diagnostic microbiology and infectious disease*, vol. 61, pp. 273-279, 2008.
- [172] D. A. Hamza, R. M. Abd-Elsalam, S. M. Nader, M. Elhariri, R. Elhelw, and H. S. El-Mahallawy, "Pathways of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in

- Animal Model: New Insights Regarding Public Health," *Infection and Drug Resistance*, vol. 13, pp. 1593-1600, 2020.
- [173] M. Á. Argudín, M. C. Mendoza, and M. R. Rodicio, "Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins," *Toxins*, vol. 2, pp. 1751-1773, 2010.
 - [174] S. Sasidharan, B. Prema, and L. Y. Latha, "Antimicrobial drug resistance of Staphylococcus aureus in dairy products," *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, vol. 1, pp. 130-132, 2011.
 - [175] D. Sergelidis and A. Angelidis, "Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a controversial food-borne pathogen," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 64, pp. 409-418, 2017.
 - [176] M. Kluytmans-VandenBergh and J. Kluytmans, "Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: current perspectives," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 12, pp. 9-15, 2006.
 - [177] A. Friese, J. Schulz, K. Zimmermann, B.-A. Tenhagen, A. Fetsch, J. Hartung, *et al.*, "Occurrence of livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Turkey and broiler barns and contamination of air and soil surfaces in their vicinity," *Applied and environmental microbiology*, vol. 79, pp. 2759-2766, 2013.
 - [178] A. Voss, F. Loeffen, J. Bakker, C. Klaassen, and M. Wulf, "Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pig farming," *Emerging infectious diseases*, vol. 11, p. 1965, 2005.
 - [179] A. Parisi, M. Caruso, G. Normanno, L. Latorre, A. Miccolupo, R. Fracalvieri, *et al.*, "MRSA in swine, farmers and abattoir workers in Southern Italy," *Food microbiology*, vol. 82, pp. 287-293, 2019.
 - [180] V. Santos, A. Gomes, L. Ruiz-Ripa, O. M. Mama, C. Sabeça, M. Sousa, *et al.*, "Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus CC398 in Purulent Lesions of Piglets and Fattening Pigs in Portugal," *Microbial Drug Resistance*, 2020.
 - [181] P. Papadopoulos, A. S. Angelidis, T. Papadopoulos, C. Kotzamanidis, A. Zdragas, A. Papa, *et al.*, "Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S. aureus (MRSA) in bulk tank milk, livestock and dairy-farm personnel in north-central and north-eastern Greece: Prevalence, characterization and genetic relatedness," *Food microbiology*, vol. 84, p. 103249, 2019.
 - [182] C. Cuny, A. Friedrich, S. Kozytska, F. Layer, U. Nübel, K. Ohlsen, *et al.*, "Emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in different animal species," *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 300, pp. 109-117, 2010.
 - [183] O. M. Mama, L. Morales, L. Ruiz-Ripa, M. Zarazaga, and C. Torres, "High prevalence of multidrug resistant S. aureus-CC398 and frequent detection of enterotoxin genes among non-CC398 S. aureus from pig-derived food in Spain," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 320, p. 108510, 2020.

- [184] E. Petinaki and I. Spiliopoulou, "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among companion and food-chain animals: impact of human contacts," *Clinical microbiology and infection*, vol. 18, pp. 626-634, 2012.
- [185] A. S. Lee, H. de Lencastre, J. Garau, J. Kluytmans, S. Malhotra-Kumar, A. Peschel, *et al.*, "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *Nature reviews Disease primers*, vol. 4, pp. 1-23, 2018.
- [186] E.-A. Oniciuc, A. I. Nicolau, M. Hernández, and D. Rodríguez-Lázaro, "Presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the food chain," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 61, pp. 49-59, 2017.
- [187] W. Vanderhaeghen, K. Hermans, F. Haesebrouck, and P. Butaye, "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals," *Epidemiology & Infection*, vol. 138, pp. 606-625, 2010.
- [188] M. Chai, T. Faiq, S. Ariffin, Z. Suhaili, M. Sukiman, and M. Ghazali, "Prevalence of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in Raw Goat Milks from Selected Farms in Terengganu, Malaysia," *Tropical Animal Science Journal*, vol. 43, pp. 64-69, 2020.
- [189] B. Ballhausen, A. Kriegeskorte, S. van Alen, P. Jung, R. Köck, G. Peters, *et al.*, "The pathogenicity and host adaptation of livestock-associated MRSA CC398," *Veterinary microbiology*, vol. 200, pp. 39-45, 2017.
- [190] L. B. Price, M. Stegger, H. Hasman, M. Aziz, J. Larsen, P. S. Andersen, *et al.*, "Staphylococcus aureus CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock," *MBio*, vol. 3, 2012.
- [191] M. F. Anjum, F. Marco-Jimenez, D. Duncan, C. Marín, R. P. Smith, and S. Evans, "Livestock-associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from animals and animal products in the UK," *Frontiers in Microbiology*, vol. 10, p. 2136, 2019.
- [192] P. D. Bangerter, X. Sidler, V. Perreten, and G. Overesch, "Longitudinal study on the colonisation and transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farms," *Veterinary microbiology*, vol. 183, pp. 125-134, 2016.
- [193] L. Devriese, L. Van Damme, and L. Fameree, "Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases," *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, vol. 19, pp. 598-605, 1972.
- [194] L. Devriese and J. Hommez, "Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds," *Research in veterinary science*, vol. 19, pp. 23-27, 1975.
- [195] H. Graveland, J. A. Wagenaar, H. Heesterbeek, D. Mevius, E. Van Duinkerken, and D. Heederik, "Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in veal calf farming: human MRSA carriage related with animal antimicrobial usage and farm hygiene," *PloS one*, vol. 5, p. e10990, 2010.
- [196] E. De Boer, J. Zwartkruis-Nahuis, B. Wit, X. Huijsdens, A. De Neeling, T. Bosch, *et al.*, "Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat," *International journal of food microbiology*, vol. 134, pp. 52-56, 2009.

- [197] C. Lozano, M. López, E. Gómez-Sanz, F. Ruiz-Larrea, C. Torres, and M. Zarazaga, "Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in food samples of animal origin in Spain," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 64, pp. 1325-1326, 2009.
- [198] P. Papadopoulos, T. Papadopoulos, A. S. Angelidis, C. Kotzamanidis, A. Zdragas, A. Papa, *et al.*, "Prevalence, antimicrobial susceptibility and characterization of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dairy industries in north-central and north-eastern Greece," *International journal of food microbiology*, vol. 291, pp. 35-41, 2019.
- [199] M. Nemati, K. Hermans, U. Lipinska, O. Denis, A. Deplano, M. Struelens, *et al.*, "Antimicrobial resistance of old and recent *Staphylococcus aureus* isolates from poultry: first detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 52, pp. 3817-3819, 2008.
- [200] I. Van Loo, X. Huijsdens, E. Tiemersma, A. De Neeling, N. van de Sande-Bruinsma, D. Beaujean, *et al.*, "Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans," *Emerging infectious diseases*, vol. 13, p. 1834, 2007.
- [201] S. Correia, V. Silva, J. García-Díez, P. Teixeira, K. Pimenta, S. Oliveira, *et al.*, "One Health approach reveals absence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in autochthonous cattle and their environments," *Frontiers in Microbiology*, vol. 10, p. 2735, 2019.
- [202] W. Witte, B. Strommenger, C. Stanek, and C. Cuny, "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe," *Emerging infectious diseases*, vol. 13, p. 255, 2007.
- [203] S. Gopal and K. C. Divya, "Can methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prevalence from dairy cows in India act as potential risk for community-associated infections?: a review," *Veterinary world*, vol. 10, p. 311, 2017.
- [204] H. A. Tegegne, I. Koláčková, and R. Karpíšková, "Diversity of livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *Asian Pacific journal of tropical medicine*, vol. 10, pp. 929-931, 2017.
- [205] P. Papadopoulos, T. Papadopoulos, A. S. Angelidis, E. Boukouvala, A. Zdragas, A. Papa, *et al.*, "Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) along the production chain of dairy products in north-western Greece," *Food microbiology*, vol. 69, pp. 43-50, 2018.
- [206] E. Aklilu and C. Hui Ying, "First *mecC* and *mecA* Positive Livestock-Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (*mecC* MRSA/LA-MRSA) from Dairy Cattle in Malaysia," *Microorganisms*, vol. 8, p. 147, 2020.
- [207] V. Carfora, A. Caprioli, N. Marri, D. Sagrafoli, C. Boselli, G. Giacinti, *et al.*, "Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy," *International Dairy Journal*, vol. 42, pp. 12-15, 2015.

- [208] K. Haran, S. Godden, D. Boxrud, S. Jawahir, J. Bender, and S. Sreevatsan, "Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 50, pp. 688-695, 2012.
- [209] N. Ektik, M. Gökmen, and R. Çibik, "The prevalence and antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in milk and dairy products in Balıkesir, Turkey," *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, vol. 68, pp. 613-620, 2017.
- [210] R. M. Kamal, M. A. Bayoumi, and S. F. Abd El Aal, "MRSA detection in raw milk, some dairy products and hands of dairy workers in Egypt, a mini-survey," *Food Control*, vol. 33, pp. 49-53, 2013.
- [211] H. Y. Can and T. H. Celik, "Detection of enterotoxigenic and antimicrobial resistant *S. aureus* in Turkish cheeses," *Food Control*, vol. 24, pp. 100-103, 2012.
- [212] A. Richter, R. Sting, C. Popp, J. Rau, B.-A. Tenhagen, B. Guerra, *et al.*, "Prevalence of types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in turkey flocks and personnel attending the animals," *Epidemiology & Infection*, vol. 140, pp. 2223-2232, 2012.
- [213] A. Fox, B. Pichon, H. Wilkinson, M. Doumith, R. Hill, J. McLauchlin, *et al.*, "Detection and molecular characterization of Livestock-Associated MRSA in raw meat on retail sale in North West England," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 64, pp. 239-245, 2017.
- [214] B. Ge, S. Mukherjee, C.-H. Hsu, J. A. Davis, T. T. T. Tran, Q. Yang, *et al.*, "MRSA and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in US retail meats, 2010–2011," *Food microbiology*, vol. 62, pp. 289-297, 2017.
- [215] S. Kittler, D. Seinige, D. Meemken, A. Müller, S. Wendlandt, R. Ehricht, *et al.*, "Characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from broiler farms in Germany are rather lineage-than source-specific," *Poultry Science*, vol. 98, pp. 6903-6913, 2019.
- [216] O. J. Okorie-Kanu, M. U. Anyanwu, E. V. Ezenduka, A. C. Mgbeahuruike, D. Thapaliya, G. Gerbig, *et al.*, "Molecular epidemiology, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from chicken and pig carcasses, and carcass handlers," *Plos one*, vol. 15, p. e0232913, 2020.
- [217] H. Li, P. S. Andersen, M. Stegger, R. N. Sieber, H. Ingmer, N. Staubrand, *et al.*, "Antimicrobial resistance and virulence gene profiles of methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* from food products in Denmark," *Frontiers in Microbiology*, vol. 10, 2019.
- [218] M. Basanisi, G. La Bella, G. Nobili, S. Tola, M. Cafiero, and G. La Salandra, "Prevalence And Characterization Of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) Isolates From Retail Meat in South Italy," *Italian Journal of Food Science*, vol. 32, 2020.

- [219] WHO, "Antimicrobial resistance. Global report of surveillance". Available:http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf, 2014.
- [220] CDC, (2013). "Antibiotic resistance threats in the United States". Available: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
- [221] F. J. Angulo and K. Mølbak, "Human health consequences of antimicrobial drug—resistant *Salmonella* and other foodborne pathogens," *Clinical infectious diseases*, vol. 41, pp. 1613-1620, 2005.
- [222] M. K. Glynn, V. Reddy, L. Hutwagner, T. Rabatsky-Ehr, B. Shiferaw, D. J. Vugia, *et al.*, "Prior antimicrobial agent use increases the risk of sporadic infections with multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium: a FoodNet case-control study, 1996–1997," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 38, pp. S227-S236, 2004.
- [223] S. Ranotkar, P. Kumar, S. Zutshi, K. S. Prashanth, B. Bezbaruah, J. Anand, *et al.*, "Vancomycin-resistant enterococci: Troublemaker of the 21st century," *Journal of global antimicrobial resistance*, vol. 2, pp. 205-212, 2014.
- [224] L. Chavers, S. Moser, W. Benjamin, S. Banks, J. Steinhauer, A. Smith, *et al.*, "Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting," *Journal of Hospital Infection*, vol. 53, pp. 159-171, 2003.
- [225] S. Jakovac, E. F. Bojić, M. A. Ibrišimović, B. Tutiš, M. Ostojić, and M. Hukić, "Characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus* strains in the West Balkans: a first report," *Microbial Drug Resistance*, vol. 23, pp. 122-126, 2017.
- [226] M. Schouten, J. Hoogkamp-Korstanje, J. Meis, A. Voss, and E. V. S. Group, "Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe," *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 19, pp. 816-822, 2000.
- [227] N. Clark, R. Cooksey, B. Hill, J. Swenson, and F. Tenover, "Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from US hospitals," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 37, pp. 2311-2317, 1993.
- [228] B. R. Singh, "Prevalence of vancomycin resistance and multiple drug resistance in enterococci in equids in North India," *The Journal of Infection in Developing Countries*, vol. 3, pp. 498-503, 2009.
- [229] A. Büyükcama, E. K. Öncela, Y. Özsürekcıa, A. B. Cengiza, B. Kuşkonmazb, and B. Sancakc, "Vancomycin-resistant *Enterococcus* bacteremia in a child with acute myeloid leukemia: Successful treatment with daptomycin," *Archivos argentinos de pediatria*, vol. 114, pp. e432-e435, 2016.
- [230] E.-M. Klupp, A. Both, C. B. Campos, H. Büttner, C. König, M. Christopeit, *et al.*, "Tedizolid susceptibility in linezolid- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates," *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 35, pp. 1957-1961, 2016.
- [231] H. Hourı, H. Kazemian, H. S. Ebrahim-Saraie, A. Taji, Z. Tayebi, and H. Heidari, "Linezolid activity against clinical Gram-positive cocci with advanced

- antimicrobial drug resistance in Iran," *Journal of global antimicrobial resistance*, vol. 10, pp. 200-203, 2017.
- [232] G. Uçak, "İstanbul'da tüketime sunulan hazır sebze salatalarının mikrobiyal güvenliğin belirlenmesi," *Namık Kemal Üniversitesi*, 2014.
- [233] M. Basanisi, G. La Bella, G. Nobili, I. Franconieri, and G. La Salandra, "Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk and dairy products in South Italy," *Food microbiology*, vol. 62, pp. 141-146, 2017.
- [234] E. L. Laurin, J. Sanchez, M. Chaffer, S. L. McKenna, and G. P. Keefe, "Assessment of the relative sensitivity of milk ELISA for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infectious dairy cows," *Journal of dairy science*, vol. 100, pp. 598-607, 2017.
- [235] A. M. A. Melo, D. L. Alexandre, R. F. Furtado, M. F. Borges, E. A. T. Figueiredo, A. Biswas, *et al.*, "Electrochemical immunosensors for *Salmonella* detection in food," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 100, pp. 5301-5312, 2016.
- [236] M. Zakaria, M. F. Omar, A. Azman, U. Hashim, and M. M. Arshad, "Fabrication and characterization of SAW IDT biosensor for biomolecule detection," *IEEE Regional Symposium on Micro and Nanoelectronics (RSM)*, pp. 1-4, 2015.
- [237] J. Sarowska, M. Frej-Mądrzak, A. Jama-Kmiecik, A. Kilian, D. Teryks-Wołyniec, and I. Choroszy-Krol, "Detection of *Salmonella* in foods using a reference PN-ISO method and an alternative method based on loop-mediated isothermal amplification coupled with bioluminescence," *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, vol. 25, pp. 945-950, 2016.
- [238] H.-f. Chen, C.-H. Lin, C.-Y. Su, H.-P. Chen, and Y.-L. Chiang, "Surface Plasmon Resonance Biotechnology for Antimicrobial Susceptibility Test," *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity*, p. 453, 2011.
- [239] S. Dutka-Malen, S. Evers, and P. Courvalin, "Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR," *Journal of clinical microbiology*, vol. 33, pp. 24-27, 1995.
- [240] I. Das and A. Fraise, "Are glycopeptide-resistant enterococci in animals a threat to human beings?," *The Lancet*, vol. 349, pp. 997-998, 1997.
- [241] B. Robredo, K. V. Singh, F. Baquero, B. E. Murray, and C. Torres, "Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food," *International journal of food microbiology*, vol. 54, pp. 197-204, 2000.
- [242] P. W. Bodnaruk, P. J. Krakar, and R. B. Tompkin, "Absence of high-level vancomycin resistance in enterococci isolated from meat-processing facilities," *Emerging infectious diseases*, vol. 7, p. 1030, 2001.
- [243] P. Tomich, F. An, S. Damle, and D. Clewell, "Plasmid-related transmissibility and multiple drug resistance in *Streptococcus faecalis* subsp. *zymogenes*

- strain DS16," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 15, pp. 828-830, 1979.
- [244] J. J. Schentag, "Antimicrobial management strategies for Gram-positive bacterial resistance in the intensive care unit," *Critical care medicine*, vol. 29, pp. N100-N107, 2001.
 - [245] F. J. Angulo, O. E. Heuer, A. M. Hammerum, P. Collignon, and H. C. Wegener, "Human health hazard from antimicrobial-resistant enterococci in animals and food," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 43, pp. 911-916, 2006.
 - [246] F. M. Aarestrup, "Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms," *Microbial Drug Resistance*, vol. 1, pp. 255-257, 1995.
 - [247] E. Stobberingh, A. van den Bogaard, N. London, C. Driessen, J. Top, and R. Willems, "Enterococci with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmers, turkey slaughterers, and (sub) urban residents in the south of The Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans?," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 43, pp. 2215-2221, 1999.
 - [248] V. Bortolaia, C. Espinosa-Gongora, and L. Guardabassi, "Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* on poultry meat," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 22, pp. 130-140, 2016.
 - [249] O. Baccouri, A. M. Boukerb, L. B. Farhat, A. Zébré, K. Zimmermann, E. Domann, *et al.*, "Probiotic potential and safety evaluation of *Enterococcus faecalis* OB14 and OB15, isolated from traditional tunisian testouri cheese and rigouta, using physiological and genomic analysis," *Frontiers in microbiology*, vol. 10, p. 881, 2019.
 - [250] M. Zommiti, M. Cambrone, O. Maillot, M. Barreau, K. Sebei, M. Feuilleux, *et al.*, "Evaluation of probiotic properties and safety of *Enterococcus faecium* isolated from artisanal Tunisian meat "Dried Ossban"," *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, p. 1685, 2018.
 - [251] E. W. Rice, L. A. Boczek, C. H. Johnson, and J. W. Messer, "Detection of intrinsic vancomycin resistant enterococci in animal and human feces," *Diagnostic microbiology and infectious disease*, vol. 46, pp. 155-158, 2003.
 - [252] F. Cetinkaya, T. E. Muş, G. E. Soyutemiz, and R. Cibik, "Prevalence and antibiotic resistance of vancomycin-resistant enterococci in animal originated foods," *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, vol. 37, pp. 588-593, 2013.
 - [253] N. Fifadara, S. Radu, Z. Hassan, L. R. Beuchat, and G. Rusul, "Hemolytic and nonhemolytic vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolated from beef imported to Malaysia," *Journal of food protection*, vol. 66, pp. 1845-1850, 2003.
 - [254] L. Busani, M. Del Grosso, C. Paladini, C. Graziani, A. Pantosti, F. Biavasco, *et al.*, "Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and-resistant

- enterococci isolated in Italy from raw meat products, farm animals, and human infections," *International journal of food microbiology*, vol. 97, pp. 17-22, 2004.
- [255] J. I. Cho, I. S. Joo, J. H. Choi, K. H. Jung, E. J. Choi, M. K. Han, *et al.*, "Prevalence and antimicrobial resistance of Enterococcus spp. isolated from meat and fishery production in Korea," *Food Science and Biotechnology*, vol. 22, pp. 161-165, 2013.
- [256] S. A. Khan, M. S. Nawaz, A. A. Khan, S. L. Hopper, R. A. Jones, and C. E. Cerniglia, "Molecular characterization of multidrug-resistant Enterococcus spp. from poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR," *Molecular and cellular probes*, vol. 19, pp. 27-34, 2005.
- [257] J. Zhang, Y.-Q. Wang, J. Li, Y.-F. Ma, J. Lin, Z.-R. Xiao, *et al.*, "Phenotypic and genotypic analysis of vancomycin-resistant Enterococci strains isolated from different water sources," *African Journal of Bacteriology Research*, vol. 8, pp. 8-13, 2016.
- [258] H. H. Yılmaz, N. Yazıhan, D. Tunca, A. Sevinç, E. Ö. Olcayto, N. Özgül, *et al.*, "Cancer trends and incidence and mortality patterns in Turkey," *Japanese journal of clinical oncology*, vol. 41, pp. 10-16, 2011.
- [259] N. L. Henry and D. F. Hayes, "Cancer biomarkers," *Molecular oncology*, vol. 6, pp. 140-146, 2012.
- [260] H. B. Burke, "Predicting clinical outcomes using molecular biomarkers," *Biomarkers in cancer*, vol. 8, p. BIC. S33380, 2016.
- [261] C. K. Dixit, K. Kadimisetty, B. A. Otieno, C. Tang, S. Malla, C. E. Krause, *et al.*, "Electrochemistry-based approaches to low cost, high sensitivity, automated, multiplexed protein immunoassays for cancer diagnostics," *Analyst*, vol. 141, pp. 536-547, 2016.
- [262] L. Wu and X. Qu, "Cancer biomarker detection: recent achievements and challenges," *Chemical Society Reviews*, vol. 44, pp. 2963-2997, 2015.
- [263] J. B. Fasoli and R. M. Corn, "Surface enzyme chemistries for ultrasensitive microarray biosensing with SPR imaging," *Langmuir*, vol. 31, pp. 9527-9536, 2015.
- [264] N. Tawil, F. Mouawad, S. Lévesque, E. Sacher, R. Mandeville, and M. Meunier, "The differential detection of methicillin-resistant, methicillin-susceptible and borderline oxacillin-resistant Staphylococcus aureus by surface plasmon resonance," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 49, pp. 334-340, 2013.
- [265] B. S. Munge, T. Stracensky, K. Gamez, D. DiBiase, and J. F. Rusling, "Multiplex immunosensor arrays for electrochemical detection of cancer biomarker proteins," *Electroanalysis*, vol. 28, pp. 2644-2658, 2016.
- [266] N. P. Sardesai, J. C. Barron, and J. F. Rusling, "Carbon nanotube microwell array for sensitive electrochemiluminescent detection of cancer biomarker proteins," *Analytical chemistry*, vol. 83, pp. 6698-6703, 2011.

- [267] A. Quershi, Y. Gurbuz, W. P. Kang, and J. L. Davidson, "A novel interdigitated capacitor based biosensor for detection of cardiovascular risk marker," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 25, pp. 877-882, 2009.
- [268] L. He, Q. Pagneux, I. Larroulet, A. Y. Serrano, A. Pesquera, A. Zurutuza, *et al.*, "Label-free femtomolar cancer biomarker detection in human serum using graphene-coated surface plasmon resonance chips," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 89, pp. 606-611, 2017.
- [269] H. R. Sim, A. W. Wark, and H. J. Lee, "Attomolar detection of protein biomarkers using biofunctionalized gold nanorods with surface plasmon resonance," *Analyst*, vol. 135, pp. 2528-2532, 2010.
- [270] S. A. Vance and M. G. Sandros, "Zeptomole detection of C-reactive protein in serum by a nanoparticle amplified surface plasmon resonance imaging aptasensor," *Scientific reports*, vol. 4, p. 5129, 2014.
- [271] Y. Uludag and I. E. Tothill, "Cancer biomarker detection in serum samples using surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance sensors with nanoparticle signal amplification," *Analytical chemistry*, vol. 84, pp. 5898-5904, 2012.
- [272] A. J. Vickers, C. Savage, M. F. O'Brien, and H. Lilja, "Systematic review of pretreatment prostate-specific antigen velocity and doubling time as predictors for prostate cancer," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, p. 398, 2009.
- [273] K. Eisermann and G. Fraizer, "The androgen receptor and VEGF: mechanisms of androgen-regulated angiogenesis in prostate cancer," *Cancers*, vol. 9, p. 32, 2017.
- [274] A. W. Roddam, N. E. Allen, P. Appleby, T. J. Key, L. Ferrucci, H. B. Carter, *et al.*, "Insulin-like growth factors, their binding proteins, and prostate cancer risk: analysis of individual patient data from 12 prospective studies," *Annals of internal medicine*, vol. 149, pp. 461-471, 2008.
- [275] S. Vuk-Pavlović, P. A. Bulur, Y. Lin, R. Qin, C. L. Szumlanski, X. Zhao, *et al.*, "Immunosuppressive CD14+ HLA-DRlow/- monocytes in prostate cancer," *The Prostate*, vol. 70, pp. 443-455, 2010.
- [276] WHO, "The Global Cancer Observatory", Available: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-factsheets.pdf>, 2018.
- [277] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA: a cancer journal for clinicians*, vol. 68, pp. 394-424, 2018.
- [278] Z. V. Fong and J. M. Winter, "Biomarkers in pancreatic cancer: diagnostic, prognostic, and predictive," *The Cancer Journal*, vol. 18, pp. 530-538, 2012.

- [279] S. Kumar, A. Mohan, and R. Guleria, "Biomarkers in cancer screening, research and detection: present and future: a review," *Biomarkers*, vol. 11, pp. 385-405, 2006.
- [280] FDA, "List of Qualified Biomarkers" Available: <https://www.fda.gov/drugs/cder-biomarker-qualification-program/list-qualified-biomarkers>, 2018.
- [281] D. S. Meinbach and B. L. Lokeshwar, "Insulin-like growth factors and their binding proteins in prostate cancer: Cause or consequence?," in *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, pp. 294-306, 2006.
- [282] S. A. Stacker, C. Caesar, M. E. Baldwin, G. E. Thornton, R. A. Williams, R. Prevo, *et al.*, "VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics," *Nature medicine*, vol. 7, pp. 186-191, 2001.
- [283] M. G. Achen, M. Jeltsch, E. Kukk, T. Mäkinen, A. Vitali, A. F. Wilks, *et al.*, "Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4)," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95, pp. 548-553, 1998.
- [284] M. L. George, M. G. Tutton, F. Janssen, A. Arnaoutz, A. M. Abulafi, S. A. Eccles, *et al.*, "Vegf-a, vegf-c, and vegf-d in colorectal cancer progression," *Neoplasia (New York, NY)*, vol. 3, p. 420, 2001.
- [285] J. Kurebayashi, T. Otsuki, H. Kunisue, Y. Mikami, K. Tanaka, S. Yamamoto, *et al.*, "Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) family members in breast cancer," *Japanese journal of cancer research*, vol. 90, pp. 977-981, 1999.
- [286] M. Skobe, T. Hawighorst, D. G. Jackson, R. Prevo, L. Janes, P. Velasco, *et al.*, "Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis," *Nature medicine*, vol. 7, pp. 192-198, 2001.
- [287] Y. Yonemura, Y. Endo, K. Tabata, T. Kawamura, H.-Y. Yun, E. Bandou, *et al.*, "Role of VEGF-C and VEGF-D in lymphangiogenesis in gastric cancer," *International journal of clinical oncology*, vol. 10, pp. 318-327, 2005.
- [288] W. Nockher, R. Wigand, W. Schoeppe, and J. Scherberich, "Elevated levels of soluble CD 14 in serum of patients with systemic lupus erythematosus," *Clinical & Experimental Immunology*, vol. 96, pp. 15-19, 1994.
- [289] B. Butkus de Aguiar, I. Girardi, D. D'Avila Paskulin, E. de França, C. Dornelles, F. Suparregui Dias, *et al.*, "CD14 Expression in the First 24h of Sepsis: Effect of- 260C> T CD14 SNP," *Immunological investigations*, vol. 37, pp. 752-769, 2008.
- [290] Y. Song, Q. Zhou, H. Zhu, Y. Jing, X. Zhang, Y. Yang, *et al.*, "Frequency of circulating CD14++ CD16+ intermediate monocytes as potential biomarker for the diagnosis of oral squamous cell carcinoma," *Journal of Oral Pathology & Medicine*, vol. 47, pp. 923-929, 2018.
- [291] R. Landmann, M. Wesp, C. Ludwig, R. Obrist, C. Knüsli, and J. Obrecht, "Recombinant interferon γ up-regulates in vivo and down-regulates in vitro

- monocyte CD14 antigen expression in cancer patients," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 31, pp. 292-296, 1990.
- [292] K. Li, Z. Dan, X. Hu, L. Gesang, Y. Ze, and Z. Bianba, "CD14 regulates gastric cancer cell epithelial-mesenchymal transition and invasion in vitro," *Oncology reports*, vol. 30, pp. 2725-2732, 2013.
 - [293] J. Candido and T. Hagemann, "Cancer-related inflammation," *Journal of clinical immunology*, vol. 33, pp. 79-84, 2013.
 - [294] G. Ertürk, H. Özen, M. A. Tümer, B. Mattiasson, and A. Denizli, "Microcontact imprinting based surface plasmon resonance (SPR) biosensor for real-time and ultrasensitive detection of prostate specific antigen (PSA) from clinical samples," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 224, pp. 823-832, 2016.
 - [295] H. Lilja, D. Ulmert, and A. J. Vickers, "Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring," *Nature Reviews Cancer*, vol. 8, pp. 268-278, 2008.
 - [296] L. Nogueira, R. Corradi, and J. A. Eastham, "Prostatic specific antigen for prostate cancer detection," *International braz j urol*, vol. 35, pp. 521-531, 2009.
 - [297] R. Li, F. Feng, Z.-Z. Chen, Y.-F. Bai, F.-F. Guo, F.-Y. Wu, *et al.*, "Sensitive detection of carcinoembryonic antigen using surface plasmon resonance biosensor with gold nanoparticles signal amplification," *Talanta*, vol. 140, pp. 143-149, 2015.
 - [298] J. Ladd, A. D. Taylor, M. Piliarik, J. Homola, and S. Jiang, "Label-free detection of cancer biomarker candidates using surface plasmon resonance imaging," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 393, pp. 1157-1163, 2009.
 - [299] S. Scarano, M. Mascini, A. P. Turner, and M. Minunni, "Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors," *Biosensors and bioelectronics*, vol. 25, pp. 957-966, 2010.
 - [300] J.-I. Kim, C. J. Lee, M. S. Jin, C.-H. Lee, S.-G. Paik, H. Lee, *et al.*, "Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, pp. 11347-11351, 2005.
 - [301] A. Wolk, C. S. Mantzoros, S.-O. Andersson, R. Bergström, L. B. Signorello, P. Lagiou, *et al.*, "Insulin-like growth factor 1 and prostate cancer risk: a population-based, case-control study," *Journal of National Cancer Institute*, vol. 90, pp. 911-915, 1998.
 - [302] J. D. J. Woollard, K. Opekin, S. Coso, D. Wu, M. E. Baldwin, and E. D. Williams, "Differential expression of VEGF ligands and receptors in prostate cancer," *The Prostate*, vol. 73, pp. 563-572, 2013.
 - [303] Y. Zeng, K. Opekin, M. E. Baldwin, L. G. Horvath, M. G. Achen, S. A. Stacker, *et al.*, "Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 by lymphatic endothelial cells is associated with lymph node metastasis in prostate cancer," *Clinical cancer research*, vol. 10, pp. 5137-5144, 2004.

- [304] K. Bacha, Y. Tariku, F. Gebreyesus, S. Zerihun, A. Mohammed, N. Weiland-Bräuer, *et al.*, "Antimicrobial and anti-Quorum Sensing activities of selected medicinal plants of Ethiopia: Implication for development of potent antimicrobial agents," *BMC microbiology*, vol. 16, p. 139, 2016.
- [305] L. Buwa and J. Van Staden, "Antibacterial and antifungal activity of traditional medicinal plants used against venereal diseases in South Africa," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 103, pp. 139-142, 2006.
- [306] J. N. Eloff, "A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria," *Planta medica*, vol. 64, pp. 711-713, 1998.
- [307] R. D. Langfield, F. J. Scarano, M. E. Heitzman, M. Kondo, G. B. Hammond, and C. C. Neto, "Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 94, pp. 279-281, 2004.
- [308] CLSI, "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing," *Clinical Lab Standards Institute*, 2016.
- [309] J. Reynolds, "Counting Bacteria", Available: <http://delrio.dcccd.edu/jreynolds/microbiology/2420/BIOL%202420%20lab%20manual%20TOC.html>, 2011.
- [310] Anonim, "Bacterial Counts - Quantitative Analysis of Microbes," Available: [file:///C:/Users/G%C3%BCls%C3%BCm/Downloads/BacterialCounts%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/G%C3%BCls%C3%BCm/Downloads/BacterialCounts%20(2).pdf), 2017.
- [311] á. Stegger, P. Andersen, A. Kearns, B. Pichon, M. Holmes, G. Edwards, *et al.*, "Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecALGA251*," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 18, pp. 395-400, 2012.
- [312] A. Fisk, "The technique of the coagulase test for staphylococci," *British journal of experimental pathology*, vol. 21, p. 311, 1940.
- [313] W. z. Sperber and S. Tatini, "Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*," *Applied microbiology*, vol. 29, pp. 502-505, 1975.
- [314] S. Krishnan, V. Mani, D. Wasalathanthri, C. V. Kumar, and J. F. Rusling, "Attomolar detection of a cancer biomarker protein in serum by surface plasmon resonance using superparamagnetic particle labels," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 50, pp. 1175-1178, 2011.
- [315] M. Shen, A. A. Joshi, R. Vannam, C. K. Dixit, R. G. Hamilton, C. V. Kumar, *et al.*, "Epitope-Resolved Detection of Peanut-Specific IgE Antibodies by Surface Plasmon Resonance Imaging," *ChemBioChem*, vol. 19, pp. 199-202, 2018.
- [316] U. von Ah, D. Wirz, and A. Daniels, "Rapid differentiation of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from methicillin-resistant *S. aureus* and MIC determinations by isothermal microcalorimetry," *Journal of clinical microbiology*, vol. 46, pp. 2083-2087, 2008.

- [317] A. Turano and F. Pirali, "Quantification methods in microbiology," in *Laboratory diagnosis of infectious diseases*, ed: Springer, 1988, pp. 8-13.
- [318] Anonim, "Quantifying Bacteria," Available: <http://wendysmicrobiology.blogspot.com/2009/08/quantifying-bacteria.html>, 2018.
- [319] Anonim, "Bacterial Growth Curves Using A Spectrophotometer (Turbidimetric Determination)," Available: <https://info.gbiosciences.com/blog/bacterial-growth-curves-turbidimetric-determination>, 2018.
- [320] A. Ganesan, K. Crawford, K. Mende, C. K. Murray, B. Lloyd, M. Ellis, *et al.*, "Evaluation for a novel methicillin resistance (mecC) homologue in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained from injured military personnel," *Journal of clinical microbiology*, vol. 51, pp. 3073-3075, 2013.
- [321] Anonim, "Coagulase Test," www.hccfl.edu/media/706981/coagulase%20test.pdf, pp. 118-120, 2018.
- [322] Z. B. Çavuşoğlu, "Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus Aureus* Suşlarından Elde Edilen Bakteriyofajlarda Bulunan Scin, Chips, Sei, Sek Toksin Genlerinin Varlığının Pzr Ve Southern Blot Yöntemi İle Kiyaslanması," Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi*, 2011.
- [323] UMS, "Koagülaz Testi," *Sağlık Bakanlığı*, pp. B-TP-12, 2015.
- [324] R. P. Sridhar, "Coagulase Test," www.microrao.com/micronotes/coagulase.pdf, 2006.
- [325] S. Havaei, M. Halaji, S. Vidovic, J.-A. Dillon, M. Karbalaei, F. Ghanbari, *et al.*, "Prevalence and genotyping of methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients in a university hospital, Isfahan, Iran," *Jundishapur Journal of Microbiology*, vol. 10, 2017.
- [326] J. Ngezahayo, S. O. Ribeiro, V. Fontaine, L. Hari, C. Stévigny, and P. Duez, "In vitro study of five herbs used against microbial infections in Burundi," *Phytotherapy Research*, vol. 31, pp. 1571-1578, 2017.
- [327] M. F. Cansizoglu, Y. T. Tamer, M. Farid, A. Y. Koh, and E. Toprak, "Rapid ultrasensitive detection platform for antimicrobial susceptibility testing," *PLoS biology*, vol. 17, p. e3000291, 2019.
- [328] A. Lupetti, S. Barnini, B. Castagna, P. Nibbering, and M. Campa, "Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of Gram-positive cocci in blood cultures by direct inoculation into the BD Phoenix system," *Clinical microbiology and infection*, vol. 16, pp. 986-991, 2010.
- [329] G. Luka, A. Ahmadi, H. Najjaran, E. Alocilja, M. DeRosa, K. Wolthers, *et al.*, "Microfluidics integrated biosensors: A leading technology towards lab-on-a-chip and sensing applications," *Sensors*, vol. 15, pp. 30011-30031, 2015.

- [330] O. Sherlock, N. O'Connell, E. Creamer, and H. Humphreys, "Is it really clean? An evaluation of the efficacy of four methods for determining hospital cleanliness," *Journal of Hospital Infection*, vol. 72, pp. 140-146, 2009.
- [331] A. Subramanian, J. Irudayaraj, and T. Ryan, "A mixed self-assembled monolayer-based surface plasmon immunosensor for detection of E. coli O157: H7," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, pp. 998-1006, 2006.
- [332] O. Tokel, U. H. Yildiz, F. Inci, N. G. Durmus, O. O. Ekiz, B. Turker, *et al.*, "Portable microfluidic integrated plasmonic platform for pathogen detection," *Scientific reports*, vol. 5, pp. 1-9, 2015.
- [333] B.-K. Oh, Y.-K. Kim, K. W. Park, W. H. Lee, and J.-W. Choi, "Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of Salmonella typhimurium," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 19, pp. 1497-1504, 2004.
- [334] B.-K. Oh, Y.-K. Kim, W. Lee, Y. M. Bae, W. H. Lee, and J.-W. Choi, "Immunosensor for detection of Legionella pneumophila using surface plasmon resonance," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 18, pp. 605-611, 2003.
- [335] B.-K. Oh, W. Lee, Y.-K. Kim, W. H. Lee, and J.-W. Choi, "Surface plasmon resonance immunosensor using self-assembled protein G for the detection of Salmonella paratyphi," *Journal of biotechnology*, vol. 111, pp. 1-8, 2004.
- [336] A. D. Taylor, J. Ladd, Q. Yu, S. Chen, J. Homola, and S. Jiang, "Quantitative and simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens with a multi-channel SPR sensor," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, pp. 752-758, 2006.
- [337] G. Ucak Ozkaya, M. Z. Durak, I. Akyar, and O. Karatuna, "Antimicrobial Susceptibility Test for the Determination of Resistant and Susceptible S. aureus and Enterococcus spp. Using a Multi-Channel Surface Plasmon Resonance Device," *Diagnostics*, vol. 9, p. 191, 2019.
- [338] H. Baccar, M. Mejri, I. Hafaiedh, T. Ktari, M. Aouni, and A. Abdelghani, "Surface plasmon resonance immunosensor for bacteria detection," *Talanta*, vol. 82, pp. 810-814, 2010.
- [339] L. Louie, S. Matsumura, E. Choi, M. Louie, and A. Simor, "Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus," *Journal of clinical microbiology*, vol. 38, pp. 2170-2173, 2000.
- [340] T. Narayan, S. Kumar, S. Kumar, S. Augustine, B. Yadav, and B. D. Malhotra, "Protein functionalised self assembled monolayer based biosensor for colon cancer detection," *Talanta*, vol. 201, pp. 465-473, 2019.
- [341] B. Szymańska, Z. Lukaszewski, K. Hermanowicz-Szamatowicz, and E. Gorodkiewicz, "A biosensor for determination of the circulating biomarker CA125/MUC16 by Surface Plasmon Resonance Imaging," *Talanta*, vol. 206, p. 120187, 2020.
- [342] V. Mani, D. P. Wasalathanthri, A. A. Joshi, C. V. Kumar, and J. F. Rusling, "Highly efficient binding of paramagnetic beads bioconjugated with 100 000 or more

- antibodies to protein-coated surfaces," *Analytical chemistry*, vol. 84, pp. 10485-10491, 2012.
- [343] X. Pei, B. Zhang, J. Tang, B. Liu, W. Lai, and D. Tang, "Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review," *Analytica chimica acta*, vol. 758, pp. 1-18, 2013.
- [344] Y. Teramura, Y. Arima, and H. Iwata, "Surface plasmon resonance-based highly sensitive immunosensing for brain natriuretic peptide using nanobeads for signal amplification," *Analytical biochemistry*, vol. 357, pp. 208-215, 2006.
- [345] Y. Sun, Y. Bai, D. Song, X. Li, L. Wang, and H. Zhang, "Design and performances of immunoassay based on SPR biosensor with magnetic microbeads," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23, pp. 473-478, 2007.
- [346] L. Gao, J. Zhuang, L. Nie, J. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, *et al.*, "Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles," *Nature nanotechnology*, vol. 2, pp. 577-583, 2007.
- [347] S. D. Soelberg, R. C. Stevens, A. P. Limaye, and C. E. Furlong, "Surface plasmon resonance detection using antibody-linked magnetic nanoparticles for analyte capture, purification, concentration, and signal amplification," *Analytical chemistry*, vol. 81, pp. 2357-2363, 2009.
- [348] A. A. Joshi, M. W. Peczu, C. V. Kumar, and J. F. Rusling, "Ultrasensitive carbohydrate-peptide SPR imaging microarray for diagnosing IgE mediated peanut allergy," *Analyst*, vol. 139, pp. 5728-5733, 2014.
- [349] O. L. B. Acevedo and D. Pauron, "Protein-lipid interaction analysis by surface plasmon resonance (SPR)," 2014.
- [350] C. Mercer, A. Jones, J. F. Rusling, and D. Leech, "Multiplexed electrochemical cancer diagnostics with automated microfluidics," *Electroanalysis*, vol. 31, pp. 208-211, 2019.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

İletişim Bilgisi: gulsumucak@gmail.com

Konferans Bildirileri

1. M. Z. Durak, G. Ucak, I. Akyar, O. Karatuna, Ö. Ekiz, "Development of a Surface Plazmon Resonance (SPR) Based Biosensor for the Rapid Detection of Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA)", *Institute of Food Technologists*, Chicago, Amerika Birleşik Devletleri, p.47, 2016.

Makaleler

1. G. Ucak Ozkaya, M. Z. Durak, I. Akyar, and O. Karatuna, "Antimicrobial Susceptibility Test for the Determination of Resistant and Susceptible *S. aureus* and *Enterococcus* spp. Using a Multi-Channel Surface Plasmon Resonance Device," *Diagnostics*, vol. 9, p. 191, 2019.