



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü



**KLİNİK AÇIDAN ÖNEMLİ BAKTERİYEL  
VE FUNGAL PATOJENLERİN DNA'SININ  
TAYİNİNE YÖNELİK NANO-POLİMERAZ ZİNCİR  
REAKSİYONU (NANO-PCR) TEMELLİ  
YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

Kübra ASLAN

Biyokimya Anabilim Dalı

İzmir  
2023



EGE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KLİNİK AÇIDAN ÖNEMLİ BAKTERİYEL VE FUNGAL  
PATOJENLERİN DNA'SININ TAYİNİNE YÖNELİK  
NANO-POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (NANO-  
PCR) TEMELLİ YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Kübra ASLAN

Danışman: Doç. Dr. Serap EVRAN

Biyokimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Bitirme Tezi

İZMİR, 2023



**KABUL ONAY SAYFASI**

**Kübra ASLAN** tarafından **Yüksek Lisans** tezi olarak sunulan “**Klinik açıdan önemli bakteriyel ve fungal patojenlerin DNA’sının tayinine yönelik nano-polimeraz zincir reaksiyonu (Nano-PCR) temelli yöntemlerin geliştirilmesi**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve .....tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:****İmza**

<b>Jüri Başkanı</b>	: .....	.....
<b>Raportör Üye</b>	: .....	.....
<b>Üye</b>	: .....	.....



**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ****ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Klinik açıdan önemli bakteriyel ve fungal patojenlerin DNA’sının tayinine yönelik nano-polimeraz zincir reaksiyonu (Nano-PCR) temelli yöntemlerin geliştirilmesi**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

.... / .... /  
2023

İmzası

Kübra ASLAN



**ÖZET**

**Klinik açıdan önemli bakteriyel ve fungal patojenlerin DNA'sının tayinine  
yönelik nano polimeraz zincir  
reaksiyonu (Nano-PCR) temelli yöntemlerin geliştirilmesi**

ASLAN, Kübra

Yüksek Lisans Bitirme Tezi, Biyokimya Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Serap EVRAN

2023, 121 Sayfa

Enfeksiyönel hastalıklarda doğru tedavilerin zamanında uygulanabilmesi için hastalığa neden olan patojen mikroorganizmaların erken ve doğru bir şekilde tanımlanması oldukça kritiktir. Genotipik özelliklerden faydalanılarak mikroorganizmaları tür düzeyinde hassas, doğru ve hızlı bir şekilde tanımlamaya olanak sağlayan PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tekniği modern tıp laboratuvarlarının ve klinik mikrobiyolojinin vazgeçilmez bir aracı haline gelmiştir.

PCR tekniğinde kalıp DNA'ya erişimin sınırlı, kalıbın yüksek guanin-sitozin oranına sahip olması, reaksiyon içerisinde sekonder yapılaşma gibi yöntemin verimini ve spesifikliğini etkileyen birtakım zorluklar vardır. Bu zorlukları aşmak için PCR programında modifikasyonlar uygulanmış, bileşenlerine ekler yapılmış fakat bu sorunlara evrensel uygulamaya sahip bir çözüm üretilmemiştir. Son yıllarda güçlü adsorban ve termal iletkenlik gibi özelliklere sahip nanomalzemeler ile PCR'in performansını düşüren bu sorunların aşılabileceği yönünde iddialar öne sürülmüştür.

Bu tez çalışmasında, klinik açıdan öneme sahip patojenlerin tespiti için geleneksel mikrobiyal tayin yöntemlerine kıyasla daha spesifik, hassas, hızlı ve bunun yanında çoklu analize imkan tanıyan bir PCR yöntemi geliştirildi. Patojenlerin genomlarında korunmuş bölgelerin amplifikasyonu ile birbiri yanında

analizi hedeflenirken, nanomalzemelerin çoklu amplifikasyonun gerçekleştiği ortamda reaksiyon verimi üzerine etkisi araştırıldı.

**Anahtar kelimeler:** Multipleks PCR, Nano-PCR, Patojen tayini,



**ABSTRACT****Development of nanoparticle-polymerase chain reaction (Nano-PCR) based  
methods for the detection of clinically important bacterial and fungal  
pathogen's DNA**

ASLAN, Kübra

Msc Thesis, Biochemistry Department

Supervisor: Doç. Dr. Serap EVRAN

2023, 121 Pages

Early and precise identification of pathogen microorganisms those causing the disease is very crucial in infectious diseases. By providing sensitive, accurate and fast identification of the microorganism in species level through genotypic characteristics, polymerase chain reaction (PCR) technique has become essential tool in modern medicine laboratories and clinical microbiology.

PCR faces certain challenges those affecting PCR efficiency and specificity including limited availability of template, high guanin-cytosine content, secondary structure formation. Even though, PCR program modification have been adapted and additives have been used, a solution being universally applicable have not been introduced to overcome these challenges. In recent years, claims have been raised that nanomaterials adhering properties including strong adsorbance and thermal conductivity could be used to overcome these challenges causing decrease in PCR performance.

In this thesis study, a PCR technique have been developed which is more spesific, sensitive, faster than conventional microbial identification method and is also offering multiple analysis for the detection of clinically important pathogens. Simultaneous detection of pathogen have been aimed through amplification of

conserved region in pathogen's genome, whereas the effect of nanomaterials on the reaction efficiency in multiple amplification setting have been investigated.

**Keywords:** Multiplex PCR, Nano-PCR, Pathogen detection



## ÖNSÖZ

Mikrobiyal çeşitliliğin giderek arttığı günümüz ekolojisinde mikrobiyal tanı gibi önemli bir alanda süregelen gereksinimlerin ve problemlerin incelendiği bu tez çalışması mikrobiyolojik, moleküler biyolojik ve biyokimyasal prensipleri derinlemesine inceleme ve gerek teorik gerekse de deneysel becerilerimi geliştirme fırsatı bulduğum, her aşamasında yeni bakış açıları kazandığım keyifli bir yolculuk oldu benim için. Tıbbi bilimlere ve moleküler biyolojik gelişmelere duyduğum ilgi ile başladığım bu çalışma, danışmanlarımda ilgi ve uzmanlık alanlarıyla şekillendi. Bu süreçte ben de modern çağımızın popüler tekniklerinin 1980'li yıllardan günümüze kadar ulaşan ve hala tazeliğini koruyan yönlerini özümsemeye ve bu yönleri birikimlerimiz ve araştırmalarımızla birlikte eksiksiz ve sade bir şekilde aktarmaya, günümüz teknolojisindeki konumlarını artı ve eksi yönleriyle inceleyerek vurgulamaya gayret ettim.

İZMİR

.././2023

Kübra ASLAN



## İÇİNDEKİLER TABLOSU

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	VII
ABSTRACT .....	IX
ÖNSÖZ .....	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	XVII
TABLolar DİZİNİ .....	XX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	XXI
1. GİRİŞ .....	1
1.1 Enfeksiyonel Hastalıklar .....	3
1.1.1 Hastane kaynaklı enfeksiyonlar .....	7
1.2 Enfeksiyonel Hastalıklarda Tanı .....	10
1.2.1 Kültür ve koloni temelli yöntemler .....	11
1.2.2 Moleküler teknikler .....	16
1.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....	23
1.3.1 PCR'in temel prensibi .....	26
1.3.2 PCR'in etkinliğini ve spesifikliğini etkileyen parametreler .....	29
1.4 PCR'in Kısıtlamaları Ve Geliştirilen Stratejiler .....	33
1.4.1 Dimetil sülfoksit (DMSO) .....	33
1.4.2 Betain .....	34
1.4.3 Non-iyonik deterjanlar .....	34
1.4.4 Formamid .....	34
1.4.5 Tetrametilamonyumklorür (TMAC) .....	35
1.4.6 Sığır Serum Albumin (BSA) .....	35

## İÇİNDEKİLER TABLOSU(devam)

	<u>Sayfa</u>
1.4.7 Tek Zincirli DNA Bağlayıcı Protein (SSBP) .....	35
1.4.8 Hot-start PCR .....	35
1.4.9 Touch-down PCR .....	37
1.4.10 Nested PCR .....	37
1.4.11 Nano-PCR .....	38
1.5 Mikroorganizmalar.....	43
1.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 .....	43
1.5.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 .....	44
1.5.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> BAA-2473 .....	45
1.5.4 <i>Candida albicans</i> CNM-CL 8701 .....	46
1.5.5 <i>Fusarium oxysporum</i> CNM-CM 3197 .....	46
1.5.6 <i>Scedosporium (Lemontospora) prolificans</i> CNM-CM 1627.....	47
2. MATERYAL .....	49
2.1 Kalıp DNA .....	49
2.2 Primerler ve dNTP Setleri.....	49
2.3 Taq Polimeraz, PCR Tamponu .....	50
2.4 MgCl <sub>2</sub> ve Su.....	50
2.5 Nanopartiküller .....	50
2.6 Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler.....	51
2.7 Ekipmanlar .....	51
3. YÖNTEM .....	53
3.1 Sterilizasyon, Aseptik Koşulların Sağlanması Ve Saklama Koşulları.....	53
3.2 Kalıp DNA Eldesi .....	53
3.2.1 Bakteriyel Genomik DNA Eldesi.....	54
3.2.2 Fungal Genomik DNA Eldesi .....	54
3.2.3 Genom Amplifikasyonu .....	55

## İÇİNDEKİLER TABLOSU(devam)

	<u>Sayfa</u>
3.3 Kalıp DNA'ların Kontrolü.....	55
3.4 Primer seçimi ve homoloji analizleri.....	55
3.5 Geleneksel PCR İle Primerlerin Analizi Ve Primer Bağlanma Sıcaklıklarının Belirlenmesi .....	57
3.6 Agaroz Jel Elektroforezi.....	58
3.7 Multipleks PCR Ve Optimizasyon Çalışmaları.....	59
3.8 Optimizasyon Çalışmaları .....	59
3.8.1 Bakteriyel ve fungal PCR .....	59
3.8.2 MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonu.....	60
3.8.3 Primer konsantrasyonu.....	60
3.9 Altın Nano-multipleks PCR.....	60
3.10 Multipleks PCR İçin Agaroz Jel Elektroforezi.....	61
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	62
4.1 Kalıp DNA'ların Eldesi .....	62
4.2 Primer Homoloji Ve Sekonder Yapı Analizleri.....	65
4.3 Tekli PCR ile Primer Yeterlilik Testleri.....	70
4.4 Multipleks PCR Optimizasyonu .....	77
4.5 Nano-multipleks PCR.....	79
4.6 Altın Nano-multipleks PCR.....	79
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	84
6. KAYNAKLAR DİZİNİ .....	89
7. TEŞEKKÜR.....	98
ÖZGEÇMİŞ.....	99



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
<b>Şekil 1. 1</b> Türkiye geneli hastane kaynaklı enfeksiyonlarda karşılaşılan MDR ya da PDR organizmalar ve görülme yüzdeleri .....	6
<b>Şekil 1. 2</b> Avrupa’da hastane kaynaklı enfeksiyonlarda en yaygın gözlenen mikroorganizma türleri .....	9
<b>Şekil 1. 3</b> Enfeksiyonel hastalıklarda tanı için kullanılabilir yöntemler ....	11
<b>Şekil 1. 4</b> Smitwick yöntemi ile tanımlanan <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ) ....	14
<b>Şekil 1. 5</b> ELISA ya da EIA testlerinin genel prensibi .....	18
<b>Şekil 1. 6</b> Nükleik asit temelli yöntemlerde tanı için baz alınan ribozomal RNA yapılarının şematik gösterim a) prokaryotik hücreler için b) ökaryotik hücreler için c) ökaryotik hücrelerin ribozom alt birimlerinin yerleşimi .....	20
<b>Şekil 1. 7</b> Multipleks PCR ile tür tayini şematik gösterimi .....	22
<b>Şekil 1. 8</b> Polimeraz zincir reaksiyonu kullanım alanları .....	24
<b>Şekil 1. 9</b> Bir Döngü içerisinde DNA’nın amplifikasyonu; temelde üç aşamadan oluşur. Çift iplikli DNA zincirlerinin ayrıldığı denatürasyon, dizilere komplementer primerlerin kalıp DNA ile eşleştiği primer bağlanma evresi ve polimerizasyonun gerçekleştiği uzama evresi. ....	28
<b>Şekil 1. 10</b> Temel olarak bir kalıp, ilgili kalıba spesifik primer ve DNA Taq polimeraz varlığında gen parçasının tekrarlı olarak termal döngüye sokularak birçok kopyasının elde edildiği yöntemdir .....	28
<b>Şekil 1. 11</b> a) Agaroz jel elektroforez görüntüsü; b) Jelin 1. kuyucuğunda yer alan DNA markeri ile DNA numuneleri boyutlarına göre analizlenmektedir.....	29
<b>Şekil 1. 12</b> ExcelTaq™ Hot start II DNA polimeraz ve aktivitesi şematik gösterimi	36
<b>Şekil 1. 13</b> A) Nanopartiküllerin polimeraz ile etkileşime girerek polimerazın aktivitesini düzenlemesi B) Altın nanopartiküllerin güçlü adsorban özellikleri ile PCR bileşenlerini yüzeyinde düzenlemesi.....	40
<b>Şekil 1. 14</b> <i>Staphylococcus aureus</i> a) mikroskop altındaki görüntüsü (Gram boyama) b) kolonilerin katı besiyerinde morfolojik görüntüsü.....	44

## ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
<b>Şekil 1. 15</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <b>a)</b> mikroskop altındaki görüntüsü (Gram boyama) <b>b)</b> kolonilerin katı besiyerinde morfolojik görüntüsü.....	45
<b>Şekil 1. 16</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <b>a)</b> mikroskop altındaki görüntüsü (Gram boyama) <b>b)</b> kolonilerin MacConkey (laktöz fermente edebilen bakteriler için seçici besiyeri) agar morfolojik görüntüsü.....	45
<b>Şekil 1. 17</b> <i>Candida albicans</i> <b>a)</b> hiflerinin ve 2-4 µM boyutlardaki chlamydosporlarının mikroskop altındaki görüntüsü (Gram boyama) <b>b)</b> kolonilerin katı besiyerindeki morfolojik görüntüsü.....	46
<b>Şekil 1. 18</b> <i>Fusarium oxysporum</i> <b>a)</b> mikroskop altındaki görüntüsü <b>b)</b> kolonilerin katı besiyerindeki morfolojik görüntüsü .....	47
<b>Şekil 1. 19</b> <i>Scedosporium prolificans</i> <b>a)</b> annelidlerin mikroskop altındaki görüntüsü <b>b)</b> kolonilerin katı besiyerindeki morfolojik görüntüsü.....	48
<b>Şekil 4.1</b> Kit ve Manuel Yöntemle izole edilen genomik DNA'ların jel görüntüsü.....	64
<b>Şekil 4. 2</b> SaF ve SaR primerlerinin veri tabanı eşleşmeleri.....	66
<b>Şekil 4.3</b> KpF ve KpR primerlerinin veri tabanı eşleşmeleri.....	66
<b>Şekil 4. 4</b> PaF ve PaR primerlerinin veri tabanı eşleşmeleri.....	67
<b>Şekil 4. 5</b> CaF ve CaR primerlerinin veritabanı eşleşmeleri.....	67
<b>Şekil 4.6</b> FoF ve FoR primerleri veri tabanı eşleşmeleri.....	68
<b>Şekil 4.7</b> SpF ve SpR primerlerinin veri tabanı analizleri.....	68
<b>Şekil 4. 8</b> <i>Staphylococcus aureus</i> spesifik PCR ürünü jel görüntüsü.....	70
<b>Şekil 4. 9</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i> spesifik PCR ürünü jel görüntüsü.....	71
<b>Şekil 4.10</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> spesifik PCR ürünü jel görüntüsü.....	72
<b>Şekil 4. 11</b> <i>Candida albicans</i> spesifik PCR ürünü jel görüntüs.....	73
<b>Şekil 4. 12</b> <i>Fusarium oxysporum</i> spesifik PCR ürünü jel görüntüsü.....	74
<b>Şekil 4. 13</b> CaF ve CaR primerlerinin veritabanı eşleşmeleri.....	75
<b>Şekil 4. 14</b> T <sub>a</sub> 'nın PCR ürünleri üzerinde etkisi.....	76
<b>Şekil 4. 15</b> Farklı sıcaklıklarda multipleks amplifikasyon.....	76

**ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)**

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
<b>Şekil 4. 16</b>	Nanopartikül konsantrasyonlarının PCR üzerine etkisi.....	80
<b>Şekil 4. 17</b>	0,5-1,0 nM Altın nanopartiküllerin multipleks PCR'a etkisi (5 ng kalıp).....	82
<b>Şekil 5. 1</b>	Adım adım multipleks PCR geliştirme basamaklar.....	87
<b>Şekil 5. 2</b>	HKE tespitinde kullanılacak tanı yöntemi için multipleks PCR koşulları.....	88



**TABLolar DİZİNİ**

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 1. 1</b>	Ülkeler genelinde gelir düzeyine göre ilk on ölüm nedeni sıralamaları .....	4
<b>Tablo 1. 2</b>	Patojenlerin tespitinde kullanılabilir seçici ve ayırt edici besiyerleri. ....	13
<b>Tablo 1. 3</b>	Mikrobiyal tanıda nano-PCR (Yang et al., 2022, modifiye edilmiştir.) 41	
<b>Tablo 2. 1</b>	PCR’da kullanılan primer setleri.....	49
<b>Tablo 3. 1</b>	Multipleks PCR’da kullanılan primer setleri.....	56
<b>Tablo 3. 2</b>	PCR Reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları.....	57
<b>Tablo 3. 3</b>	Primerlerin erime sıcaklıkları.....	58
<b>Tablo 3. 4</b>	Multipleks PCR bileşenleri.....	59
<b>Tablo 3. 5</b>	Altın-nanoPCR kompozisyonu.....	60
<b>Tablo 4. 1</b>	Patojenlerin belirli koşullarda gösterdikleri morfolojik özellikleri	62
<b>Tablo 4. 2</b>	Genomik DNAların saflık ve konsantrasyon sonuçları.....	64
<b>Tablo 4. 3</b>	Primer setlerinin heterodimer ve homodimer oluşturma eğilimleri	69

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
μL:	mikrolitre
μM:	mikromolar
Atm:	atmosfer
Cfu:	colony forming unit
Dk:	dakika
fM:	femtomolar
mL:	mililitre
mM:	milimolar
ng:	nanogram
nm:	nanometre
nM:	nanomolar
°C:	santigrat derece
pM:	pikomolar
Rpm:	revolution per minute (bir dönme hızı /dönme frekansı birimi).
S:	Svedburg
U:	Unit
UV:	Ultraviyole
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
A, G, C, T:	Adenin, Guanin, Sitozin, Timin
AgNP:	Gümüş nanopartikül
ATCC: koleksiyonu	American Type Culture Collection, Amerika tür kültür
AuNP:	Altın nanopartikül

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)**

bp:	baz çifti
CNP:	karbon nanotoz
CNT:	Karbon nanotüp
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EDTA:	Etilendiamin tetraasetik asit
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> :	Magnetit
GO:	grafen oksit
HAI, HKE:	Hospitally acquired infection, Hastane kaynaklı enfeksiyon
ITS:	Internal transcribed spacer
NA:	Nutrient agar
NB:	Nutrient broth
PCR, PZR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA:	Ribonükleik asit
rRNA:	ribozomal RNA
ZnO:	Çinko oksit

## 1. GİRİŞ

Enfeksiyonlar, modern tıpta geniş spektrumlu antimikrobiyal ajanların varlığına rağmen hala ölümcüldür. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2020 yılında yayınladığı bir rapora göre dünya çapındaki ilk on ölüm sebebi arasında bulaşıcı enfeksiyon hastalıkları dördüncü sırada yer almaktadır. Yine aynı raporda, sıralama ülkelerin gelir düzeyine yapılmış, ülkelerin milli gelir düzeyleri azaldıkça bulaşıcı enfeksiyon hastalıklarının listede üst sıralara yükseldiği bildirilmiştir (World Health Organisation, 2020).

Birçok hastalıkta benzer semptomların ve klinik bulguların gözlenmesi, hastalığın kaynağına ulaşmayı zaman alıcı kılabilir ve tedavi sürecini karmaşıklaştırabilir. Deneysel tedavide, tipik bir enfeksiyona neden olan patojenlerin tespitinden sonra bu patojenleri elimine etmek için genel olarak geniş spektrumlu ve çoğunlukla pahalı olan antimikrobiyal ajanlar kullanılmaktadır. Enfeksiyonun erken evrelerinde sıklıkla gerekli olmasına rağmen, patojen tanımlamasından sonra geniş spektrumlu antimikrobiyal ajanların kullanımı önerilmemektedir. Bu uygulama, antimikrobiyal direnç katkısında bulunmaktadır ve maliyetlidir. Bu nedenle, antimikrobiyal terapiye paralel bir şekilde enfeksiyona neden olan mikrobiyal patojenlerin hızlı ve hassas bir şekilde belirlenmesi önemlidir. Bu sayede, geniş spektrumlu antimikrobiyal ajan kullanılmasıyla ziyade hedeflenmiş bir tedaviye olanak sağlanarak maliyetlerin azaltılması hedeflenmektedir.

Enfeksiyona neden olan patojenlerin hızlı ve hassas tayini sayesinde deneysel tedavinin uygunluğunun sağlanmasının yanı sıra antimikrobiyal direnç olasılığı da en aza indirgenmiş olur. Örneğin, *Candida albicans* enfeksiyonlarında geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı etkili olmayacaktır (Drummond et al., 2022). *Enterococcus faecium* türlerinin vancomisin dirençleri ile bilinmeleri nedeni ile *Enterococcus faecium* enfeksiyonunda vancomisin geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının uygun olmayacaktır (Markwart et al., 2019). İzolatın *Pseudomonas* olarak tanımlanması durumunda, diğer geniş spektrumlu gram negatif ajanlar yerine antipseudomonal bir antibiyotik olan sefalosporin ve

penisilin tercih edilmesi hem doğru tedavinin izlenmesi hem de maliyet açısından önemlidir (Shahab Qureshi, 2023).

Mikrobiyolojik tanı yöntemlerinin ana hedefi, enfeksiyon kaynağı ile ilgili yeterli bilgiyi mümkün olan en kısa sürede ve doğru şekilde tanımlayarak tedavi sürecinin başlamasına olanak sağlamaktır. İdeal bir tanı yöntemi hassas, spesifik, hızlı, kolay, yaygın, ucuz, çoklu analize imkan tanıyan bir yöntem olmalıdır ve elde edilen veri kolay yorumlanabilmelidir.

Günümüzde enfeksiyonel hastalıkların tanısı, kültür temelli ve moleküler biyolojik yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir. Kültür temelli yöntemler, rutin tanıya iyi adapte edilmiş, fenotipik özelliklerden faydalanarak mikroorganizmaların hem kalitatif hem de kantitatif analiz edilmesine imkan sağlayan yöntemlerdir. Mikroorganizmalar, tekrarlı kültürasyon adımlarından geçerek izole edilirler ve daha sonra mikrobiyolojik analiz, biyokimyasal testler gibi yöntemlerle karakterize edilirler. Sonuçların çıkması 7-14 gün arasında değişmekte olup bazı mikroorganizmaların kültive edilemediği koşullarda daha uzun sürebilmektedir (Vazquez-Pertejo, 2023a).

Moleküler biyolojik yöntemler, enfeksiyona sebep olan mikroorganizmayı genomlarında korunmuş gen bölgelerinden ('house-keeping' genleri olarak adlandırılır) ya da genomun rastgele parçalarını tarayarak karakterize eden hızlı, spesifik ve etkin yöntemlerdir. Mikroorganizmalar bu yöntemlerle, kültür temelli yöntemlerde olduğu gibi değişen fenotipik özelliklerinden değil, genotipik özelliklerinden yararlanılarak karakterize edilirler (Mothershed & Whitney, 2006).

Günümüzde rutin tanıya en iyi adapte edilmiş moleküler biyolojik teknik 1985'te Amerika'da Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilen ve 1986'da Nobel ödülü kazanan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniğidir (Mullis, 1990).

Herhangi bir numunede varolan DNA parçasının tekrarlı termal ısıtma ve soğutma işlemleriyle milyonlarca kopyasının oluşturulmasına dayanan PCR yöntemi, geleneksel kültür temelli yöntemlere iyi bir alternatif oluşturmaktadır. Fakat, PCR ile amplifikasyonda kalıp DNA'ya erişimin sınırlı olduğu veya kalıbın yüksek guanin-sitozin içeriğine sahip olduğu durumlarda düşük reaksiyon

verimliliği ve spesifikliği gibi kısıtlamaları vardır. Bunun yanında, bazı DNA fragmentlerinin amplifiye edilmesi DNA'nın sekonder yapı oluşturması ve yüksek erime sıcaklıkları gereksinimlerinden dolayı oldukça zordur. Bu konuda ilk atılım *Thermus aquaticus* isimli, yüksek sıcaklıklarda çalışabilmeyi sağlayan *Taq* DNA polimerazın keşfidir (Brock & Freeze, 1969). Daha sonra, 'hot-start (sıcak-başlatma)' gibi enzim modifikasyonlarına dayanan yaklaşımlar ortaya çıkmıştır (Lebedev et al., 2008; Stevens et al., 2016). Bazı amplifikasyon problemleri, PCR programında değişiklikler yaparak giderilmeye çalışılmıştır. Bu doğrultuda, touch-down PCR, nested PCR, slow-down PCR gibi PCR spesifikliğini artıran çeşitli yaklaşımlar uygulanmıştır (Frey et al., 2008; Green & Sambrook, 2019; Hecker & Roux, 1996). Tüm bu çalışmalar sayesinde PCR'in hassasiyeti önemli ölçüde artırılrsa da bu çalışmalarla, PCR'in spesifikliği hassasiyeti kadar artırılamamıştır. İyi düzeyde optimize edilmiş koşullarda bile spesifik olmayan amplifikasyonlar, primer dimerizasyonu gibi PCR verimini düşüren sonuçlarla karşılaşılabilir. Karşılaşılabilmektedir.

GC içeriği yüksek kalıp molekül varlığında, düşük kopyalı segmentlerin amplifikasyonunda ya da uzun PCR'lar gibi bazı özel durumlarda amplifikasyon gerçekleşmez ya da zayıf PCR ürünleri gözlenir. Bu spesifikite sorunlarının üstesinden gelebilmek için hem endüstride hem akademide büyük çabalar sarfedilmiş, reaksiyona bazı reaktifler eklenmiştir. Bu reaktifler arasında betain, dimetil sülfoksit (DMSO), formamid, gliserol, non-iyonik deterjanlar, sığır serum albumin (BSA), tek zincirli DNA bağlayıcı protein (SSBP) gibi ajanlar PCR enhanserleri olarak kullanılmıştır (Chevet et al., 1995; Farrell & Alexandre, 2012; Hardjasa et al., 2010; Perales et al., 2003; Yuce et al., 2014). Ayrıca primer-dimer oluşumunu engellemek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Fakat PCR spesifikliği ile ilgili sorunlar hala devam etmektedir.

## 1.1 Enfeksiyonel Hastalıklar

Enfeksiyonel hastalıklar bakteri, virüs, fungus, parazit gibi genellikle mikroskopik boyutlardaki organizmaların sebep olduğu hastalıklardır. Yaygın olarak görülen soğuk algınlığı, grip, Covid-19, mide gribi, hepatit gibi hastalıklara virüsler, *Helicobacter pylori*, Tüberküloz, Klamidya, *Neisseria gonorrhoeae* ve diğer cinsel yolla bulaşan hastalıklara bakteriler, vajinal kandida enfeksiyonları,

*Cryptosporidiosis*, *Tinea versicolor* gibi hastalıklara ise funguslar neden olur (Cole & Kramer, 2016).

Enfeksiyonel hastalıklar, dünya çapında özellikle de gelir düzeyi düşük ülkelerde önde gelen ölüm sebeplerindedir. 2019'da alt solunum yolları enfeksiyonları ve ishal hastalığının dahil olduğu iki bulaşıcı hastalık Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirlenen ilk on ölüm sebebi arasında ön sıralara yerleşmiştir (World Health Organisation, 2020) (Tablo 1.1). Ölüm nedenleri ülkelerin gelişmişlik düzeyleriyle ilişkilendirildiğinde ve sıralama yeniden yapıldığında gelişmişlik düzeyi azaldıkça enfeksiyonel hastalıkların bu listede daha üst sıralara yerleştiği görülmüştür.

**Tablo 1.1** Ülkeler genelinde gelir düzeyine göre ilk on ölüm nedeni sıralamaları (World Health Organisation, 2020; modifiye edilmiştir).

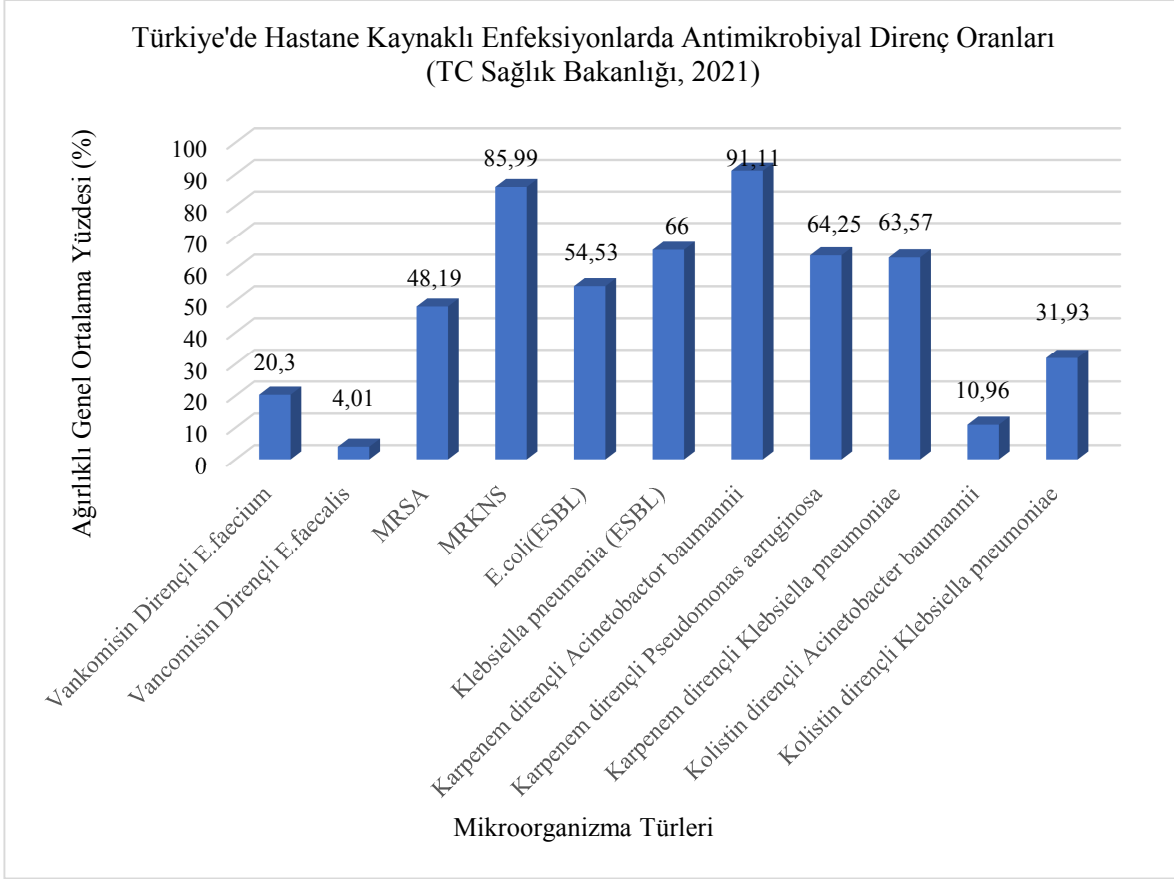
Sıralama	Dünya çapında	Düşük gelir düzeyine sahip ülkeler	Yüksek gelir düzeyine sahip ülkeler
1	Kalp hastalıkları	Yenidoğan şartları	Kalp hastalıkları
2	Felç	<b>Alt solunum yolu enfeksiyonları</b>	Alzheimer hastalığı
3	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı	Kalp Hastalıkları	Felç
4	<b>Alt solunum yolu enfeksiyonları</b>	Felç	Akciğer kanseri
5	Yenidoğan şartları	<b>İshal hastalıkları</b>	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
6	Akciğer kanseri	Sıtma	<b>Alt solunum yolu enfeksiyonları</b>
7	Alzheimer	Trafik Yaralanmaları	Kolon kanseri
8	<b>İshal hastalıkları</b>	<b>Tüberküloz</b>	Böbrek hastalıkları
9	Diyabet	HIV/AIDS	Hipertansiyon hastalıkları
10	Böbrek hastalıkları	Karaciğer sirozu	Diyabet

Enfeksiyonel hastalıklar yetersiz beslenme ve hijyen uygulamaları eksikliği gibi durumlarda ortaya çıkabildiği gibi bağışıklık sistemi baskılanmış, kronik hastalıklardan muzdarip, aşırı genç ya da yaşlı bireylerin fizyolojik durumlarından kaynaklanabilir. Bu hastalıklar, gerekli tedavi ve önleyici faaliyetlerle iyileştirilmediğinde direkt temas veya indirekt temas yollarıyla bulaşabilir. Direkt temasta enfeksiyonlar, aerosol partikülleri veya hava damlacıkları (soğuk

algınlığı, öksürük) kan, tükürük benzeri vücut sıvıları (HIV, hepatitis), deri (konjuktivit, suçiçeği ) ve mukoz membranlar ya da cinsel temas yoluyla (bel soğukluğu, frengi) insandan insana bulaşan enfeksiyonlardır. İndirekt temas ile bulaşan enfeksiyonlar, hava ya da çevresel materyallerde bulunan mikroorganizmalar aracılığıyla sağlıklı bir bireyin enfekte olmasıdır. Kontamine olmuş materyaller (frengi, soğuk algınlığı), hava (grip, kızamık), yiyecek veya içme suyu (kolera, ishal kan emen böcekler (berelyoz, sıtma ) ya da enfeksiyonlu kuzu, köpek kemirgen hayvanlar (şarbon, kuduz) ya da toprak, su, ve hava gibi enfekte edici ajan barındıran çevresel koşullar (lejyoner ve kancalıkurt hastalığı ) indirekt enfeksiyonlara neden olur (Department Health et al., 2006). Hastane kaynaklı enfeksiyonlar gibi bazı enfeksiyon tipleri birden fazla yolla bulaşabilir.

Enfeksiyonel hastalıklarla çeşitli hijyenik uygulamalar, antimikrobiyal terapi, sağlıklı beslenme gibi uygulamalarla mücadele edilmektedir. Bu uygulamalarla hastalık semptomları giderilebilir ve enfeksiyon tedavi edilebilir. Fakat çağımızın en büyük problemlerinden olan antimikrobiyal direnç geliştiğinde hastalığın kaynağına ulaşmak ve onu tedavi etmek zor, maliyetli bazen imkansız olabilmektedir.

Antimikrobiyal direnç, enfeksiyona neden olan patojenin zamanla değişmesi ve antimikrobiyal terapiye cevap vermemesidir. Antimikrobiyal direncin temel nedeni antimikrobiyal ajanların yanlış ya da gereğinden fazla kullanılmasıdır. Birçok enfeksiyonda tedavinin ilk aşamasında geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı da antimikrobiyal dirence katkı sağlamaktadır (Ciżman and Srovin, 2018). Bu, hastalığın kaynağının tam olarak tespit edilemediği durumlarda geçerlidir. Tespit edilse bile bu tespit yöntemlerinin zaman alıcı ve kesin olmayan yöntemler olması enfeksiyona zamanında müdahale edememe, yanlış müdahale etme gibi istenmeyen uygulamaları beraberinde getirebilir hatta hastane kaynaklı (HKE ya da nozokomiyal) yeni enfeksiyonların gelişmesine sebebiyet verebilir (X. Yang et al., 2021).



**Şekil 1.1** Türkiye geneli hastane kaynaklı enfeksiyonlarda karşılaşılan MDR ya da PDR organizmalar ve görülme yüzdeleri (T.C Sağlık Bakanlığı, USHİESA Özet Raporu, 2021.)

T.C Sağlık Bakanlığı 2021 yılında yayınladığı, eğitim araştırma hastaneleri, üniversite hastaneleri, devlet hastaneleri ve özel hastanelerden topladığı verilerle Türkiye geneli hastane enfeksiyonlarında karşılaşılan ve antimikrobiyal direnç geliştiren bakterileri Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı (USHİESA) raporunda özetlemiştir (T.C Sağlık Bakanlığı, 2021) (Şekil 1.1). Bu raporda antimikrobiyal direnç gösteren mikroorganizmalardan *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* çoklu ilaç direnci gösteren organizmalardır veya gram negatif bakterileri tedavi etmek için kullanılan penisilin, sefalosporin, karpenem, monolaktam, kinolonlar, aminoglikozitler, tetrasilinler ve polimiksinler gibi yaygın antibiyotik gruplarıyla tedavi edilemeyen pan-drug dirençli organizmalardır (Fischbach & Walsh, 2009; T.C Sağlık Bakanlığı, 2021).

### 1.1.1 Hastane kaynaklı enfeksiyonlar

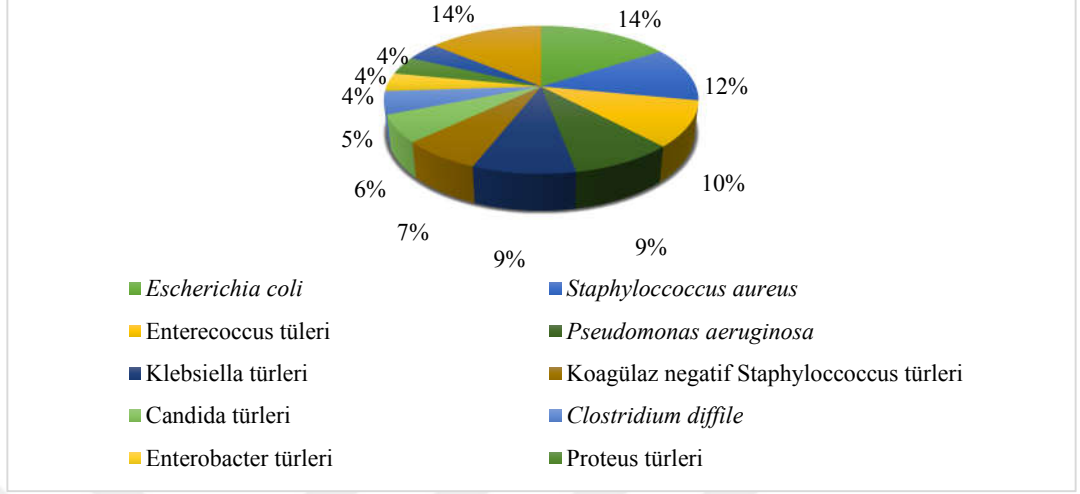
Nozokomiyal ya da hastane kaynaklı enfeksiyonlar (HKE, Hospitally acquired infections-HAI), hastane ya da tıbbi müdahalelerin yapıldığı sağlık kuruluşlarındaki hastalarda hastaneye yatıştan sonra 48 saat ile 30 gün içerisinde gözlenen enfeksiyonlardır (Maurici et al., 2022; Szabó et al., 2022; Yılmaz Aydın ve Aydın, 2022). Bu enfeksiyonlar, kateter veya ventilatör gibi tıbbi cihazlardan, doğru olmayan antibiyotik kullanımı ya da Amerikan Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (CDC) tarafından belirlenen enfeksiyon kontrol prosedürlerinin doğru uygulanmadığı durumlarda ortaya çıkar ve hastanın hastaneye yatma sebebi olan hastalıkla ilişkili değildir (CDC, 2022). Özellikle yaşlı, ameliyat geçirmiş, organ nakli olmuş, yoğun bakım ünitelerinde kalan, diyabet hastası, kronik akciğer rahatsızlığına sahip, böbrek yetmezliği çeken hastalar için nozokomiyal enfeksiyonlar büyük risk teşkil etmektedir. Bu enfeksiyonlar artan hastane yatış sürelerinin uzaması, bakım ve tedavi masraflarının, hastalık ve/ya ölüm oranlarının artması ile sonuçlanır.

Nozokomiyal enfeksiyonlara bakteri, virüs ve fungus gibi mikroorganizmalar neden olur. Hastanelerde veya sağlık kuruluşlarında kontamine olmuş ekipman, araç ya da bileşen kullanımı, kateter veya ventilatör gibi ekipmanların yanlış kullanımı ya da bakımlarının aksatılması, sağlık personeli ve hasta teması, kontamine klima sistemleri, çalışan sayısının yetersiz olması, nüfus yoğunluğunun fazla olduğu hastaneler, yetersiz sterilizasyon ve sanitasyon prosedürleri, şırınga ve iğne gibi tek kullanımlık malzemelerin birden fazla kere kullanılması gibi durumlar nozokomiyal enfeksiyonlara sebebiyet veren unsurlardır (Dadi et al., 2021; Szabó et al., 2022 ).

CDC'ye göre hastane kaynaklı enfeksiyon tipleri; santral kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu (SKİ-KDE, CLABSI), kateter ilişkili idrar yolu enfeksiyonu (Kİ-İYE, CAUTI), ventilatör ilişkili pnömoni (VIP, VAP) ve cerrahi alan enfeksiyonları (CAE, SSI)'dir. *Clostridium diffille* enfeksiyonları (CDI) enfeksiyonları da hastane kaynaklı enfeksiyonlar arasındadır (CDC, 2014). Hastanelerde en sık gözlenen HAI; CAUTI, daha sonra VAP, SSI, CLABSI ve CDI'dir. Akut hastanelerde ise bu sıralama pnömoni, gastrointestinal enfeksiyonlar, SSI ve UTI'dir. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA),

Amerika'daki hastanelerde en çok izole edilen ve çoklu ilaç direncine (MDR) sahip tür olarak belirlenmiştir. Bu belirlemelere göre %50'den fazla CLABSI'nın, yaklaşık %60 CAUTI'nin, %50 VAP'in ve %40'tan fazla SSI'nin nedeni MRSA'dır. Avrupa Birliği ve Avrupa Ekonomik Alanında bu durum farklı olmakla birlikte en sık izole edilen organizmalar sırasıyla *E. coli* (% 16,1), *S. aureus* (% 11,6), *Klebsiella spp.* (% 10,4), *Enterococcus spp.* (% 9,7), *P. aeruginosa* (% 8,0), *C. difficile* (% 7,3), koagulaz-negatif *Staphylococci* (% 7,1), *Enterobacter spp.* (% 4,4) ve *Proteus spp.* (% 3,8) (Şekil 1.2) olarak belirlenmiştir (Szabó et al., 2022). Dicle Üniversitesinin üç yılı kapsayan retrospektif çalışması sonucunda da USHIESA raporundaki MDR/PDR organizmalarına benzer sonuçlar elde edilmiş ve enfeksiyonlardan elde edilen patojenler *A. baumannii* (% 32), *K. pneumoniae* (% 18,9), *Enterococcus spp.* (% 13,1), *P. aeruginosa* (% 12), *Candida spp.* (% 9,1), *E. coli* (% 6,3), *S. aureus* (% 1,7) ve diğer gram negatif mikroorganizmalar olarak rapor edilmiştir (Yılmaz Aydın ve Aydın, 2022). *Aspergillus spp.* türleri (*A. flavus*, *A. fumigatus*), *Candida spp.* türleri (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*), *Trichosporon spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Mucorales*, *Fusarium spp.*, *Scedosporium prolificans*, *Pneumocystis jirovecii* gibi türler de hastanede çevresel koşullardan kaynaklanan nozokomiyal enfeksiyonlara sebebiyet veren mikroorganizmalardır. Hepatit B ve Hepatit C gibi virüsler de nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan viral türler arasındadır (Perlroth et al., 2007; Suleyman & Alangaden, 2021).

## Hastane kaynaklı enfeksiyonlarda en yaygın gözlenen mikroorganizma türleri



**Şekil 1.2** Avrupa’da hastane kaynaklı enfeksiyonlarda en yaygın gözlenen mikroorganizma türleri (Szabó et al., 2022, modifiye edilmiştir.).

Nozokomiyal enfeksiyonlar tedavi kalitesini düşürürken, tedavi için gereken maliyeti de artırmakta, tedavi veya teşhis edilemediği durumlarda ise sepsis, pneumonia gibi ciddi komplikasyonlara ve hatta ölüme sebebiyet vermektedir. Hastane kaynaklı enfeksiyonlar, Amerika Birleşik Devletleri’nde yataklı hastalarının % 3,2’sinde, Avrupa Birliği ve Avrupa Ekonomik Alanında % 6,5’inde ve tüm dünya çapında % 10’unda görülmektedir (Szabó et al., 2022). Gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde bu oranların, gelişmiş ülkelere kıyasla 2 ile 25 kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Asya Bölgelerindeki hastanelerden bildirilen hastane kaynaklı enfeksiyon geliştirme yüzdesi sırasıyla %11, 8 ve %10,0’dur (Szabó et al., 2022). CDC’ye göre Amerika’da yıllık hastane kaynaklı enfeksiyon geçiren 1,7 milyon hastanın 99 bini ölüm ile sonuçlanmaktadır ve bu ölümlerin 23 binine çoklu ilaç direncine (MDR) sahip organizmalar sebebiyet vermektedir (Alothman et al., 2020; Shahida et al., 2016). Hastane kaynaklı enfeksiyonların Amerika’da maliyeti yıllık 20 milyar US\$’dır. Avrupa’da ise 3 milyon enfeksiyonlu hastadan 37 bini MDR nedeniyle yaşamını yitirmektedir (Szabó et al., 2022).

Son yapılan araştırmalar, %50 oranda HAI’nin önlenilebileceğini göstermektedir. Alınabilecek önlemlerle hasta tedavi kalitesinin artması, hastane

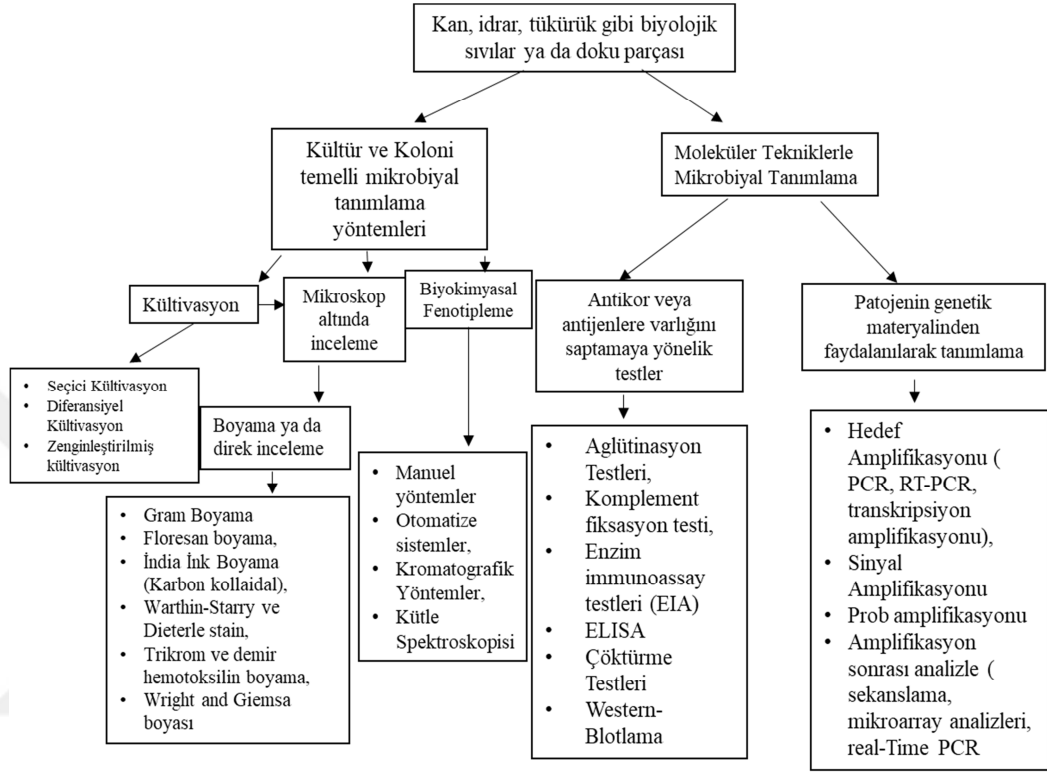
yatış sürelerinin kısalması, sağlık kuruluşları ve hasta üzerindeki finansal yükün azalması ve ölümlerin azalması sağlanabilir. Alınabilecek bu önlemler, kişisel ve çevresel hijyen kurallarının belirlenmesi ve uygulanması, sterilizasyon ve sanitasyon uygulamalarının geliştirilmesi, çapraz kontaminasyona sebep olacak hasta-sağlık çalışanı-hasta temaslarının engellenmesi, antibiyotik kullanımı yönetimi, kateter vb. tıbbi gereçlerin profesyonellerce kullanımının yaygınlaştırılmasını içermektedir (Szabó et al., 2022). Enfeksiyon tipine göre alınabilecek bu önlemler, Dünya Sağlık Örgütü'nün 2002 yılında yayınladığı "Hastane Kaynaklı Enfeksiyonların Önlenmesi ve Kontrolüne İlişkin Kılavuz İlkeler" adlı kılavuzda yer almaktadır. Bu kılavuza göre alınabilecek tüm önlemlerin merkezinde mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından sağlanacak, patojenin tür düzeyinde tanımı, antimikrobiyal terapi için önerileri, numune alma ve saklama koşulları, periyodik enfeksiyon verilerinin oluşturulması ve yorumlanması, uygun sterilizasyon ve sanitasyon prosedürlerinin belirlenmesi gibi aksiyonlar yer almaktadır (World Health Organisation, 2002). Tüm bu aksiyonlar temelde, enfeksiyona neden olabilecek patojenlerin uygun ve güvenli bir şekilde tanımlanması ve bu tanımlamaya göre epidemiyolojik önemlerini ortaya koymayı gerektirmektedir. Bu nedenle, patojen tayin yöntemleri mikrobiyoloji ve tıp laboratuvarları için oldukça önemli bir konudur.

## 1.2 Enfeksiyonel Hastalıklarda Tanı

Enfeksiyonlara neden olan patojenlerin hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanması, mikrobiyolojik tanıda oldukça önemlidir. Mikrobiyolojik tanının primer görevi enfeksiyon kaynağının ve bu kaynağın antimikrobiyal direncinin optimum sürede belirlenmesidir. Patojen tanımlamada ve beraberinde gereken tedavi başlangıcında meydana gelebilecek en ufak bir gecikme hastalığın gidişatı üzerinde rolü büyüktür.

Günümüzde enfeksiyonel hastalığa neden olan patojenlerin tespitinde bu patojenlerin fenotipik ve genotipik özelliklerinden yararlanır. Enfeksiyon teşhisi koyulan bir hastadan kan, idrar, tükürük ya da diğer biyolojik sıvılar ya da dokular gibi numuneler alınır. Bu numuneler, çeşitli boyama yöntemleriyle boyanıp mikroskop altında incelenebilirler, kültive edilebilirler, bağışıklık sistemi yanıtı olan antikorlara ya da virülans faktörü olabilecek bir antijene karşı test

edilebilirler. Son olarak, organizmanın genetik materyalinden faydalanılarak spesifik bir patojen varlığı için test edilebilirler (Vazquez-Pertejo, 2023a). Her bir yöntem kendi içerisinde uygulanan birden fazla tanımlama yöntemi ve bunların kombinasyonunu içerebilir (Şekil 1.3).



**Şekil 1.3** Enfeksiyonel hastalıklarda tanı için kullanılacak yöntemler (Vazquez-Pertejo, 2023a, 2023b, 2023c, Spyrou et al., 2022, Chandler et al., 2016; Ravea et al., 2019)

Kültür temelli yöntemler, rutin tanıya iyi adapte edilmiş, fenotipik özelliklerden faydalanarak mikroorganizmaların hem kalitatif hem de kantitatif analiz edilmesine imkan sağlayan yöntemlerdir. Mikroorganizmalar, tekrarlı kültür adımlarından geçerek izole edilirler ve daha sonra mikrobiyolojik analiz, biyokimyasal testler gibi yöntemlerle karakterize edilirler.

### 1.2.1 Kültür ve koloni temelli yöntemler

Kültür temelli yöntemlerde enfeksiyonun kaynağı olan bölgeden swap benzeri araçlarla alınan biyolojik numunelerdeki patojenler genellikle kanlı agar, çikolota agar gibi zenginleştirilmiş ortamlarda kulture edilirler. Fakat bu besiyerleri, çoğu patojenin üreyebileceği nitelikte besinler içermelerinden dolayı

spesifik tanımlama için mutlaka ikinci bir aşamaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla patojenlerin yapısal ya da biyokimyasal olarak gösterdikleri özelliklerden faydalanılarak patojenler tanımlanırlar.

Patojenler, spesifik antibiyotiklere karşı hassas oluşları, bazı reaktiflerle oluşturdukları reaksiyonlar, pH-ozmotik basınç gibi değişkenlere verdikleri yanıtlar ile karakterize edilebilirler. Bu karakterizasyon, spesifik seçici ya da ayırt edici besiyerinde kùltive etmeyle yapılabilir. Örneğin; anaerop ve endospor oluşturmeyan, gram negatif çubuk şekilli bakteroidler, diş eti enfeksiyonların kistik fibroza kadar çeşitli hastalıklara neden olan bir grup bakteri türüdür. Kanamisin ve vancomisin içeren kanlı agar ortamında hem seçici hem de diferansiyel olarak izole edilerek tanımlanabilirler. Burada kanamisin ve vankomisin, sırasıyla fakültatif anaerop bakterilerin ve gram pozitif bakterin büyümesini inhibe ederken, kan içerisinde yer alan K vitamini ve hemin molekùlü ile spesifik pigment üretimi teşvik edilir (Vazquez-Pertejo, 2023a, 2023b). Böylece, bakteroidlerin kısmi olarak tanımlamaları yapılabilir. Tablo 1.2’de bazı mikroorganizma türlerini tanımlama kullanılacak seçici ve diferansiyel besiyerlerine örnekler verilmiştir.

Benzer şekilde, Sefsulodin-Irgasan-novobisin (CIN) agar’da antibiyotiklerle seçici inhibisyon sağlanırken, mannitol fermantasyonu ile pH düşüşüne paralel bir şekilde besiyerinde kırmızı kolonilerin oluşması ile *Yersinia* türlerinin ayırt edici şekilde tanımlanması sağlanabilir (Devenish & Schiemann, 1981; Spyrou et al., 2022; Vazquez-Pertejo, 2023a). *Yersinia* türleri, veba hastalığının bubonik, pnömonik ve septisemik tüm türlerine sebep olmalarıyla ve “Kara ölüm” pandemisi (1347-1353) gibi hastalıklara sebep olmalarıyla bilinirler (Spyrou et al., 2022).

Mikroskopik incelemeler, analizi gerçekleştiren analiste ve analizde kullanılan ekipmana göre hızlı ve kesin olabilirler. Analist, olası patojeni tayin etmek için biyolojik numuneyi ayırt edici boyalarla boyayabilir ya da direkt olarak boyamadan mikroskop altında inceleyebilir, fakat bu işlemlerden önce  $10^5$ /mL hücre sayısı elde edecek kadar hücreyi konsantre etmesi gerekir. Bu da biyolojik numunenin ancak kùltivasyon sonrası tanımlanabileceği anlamına gelmektedir.

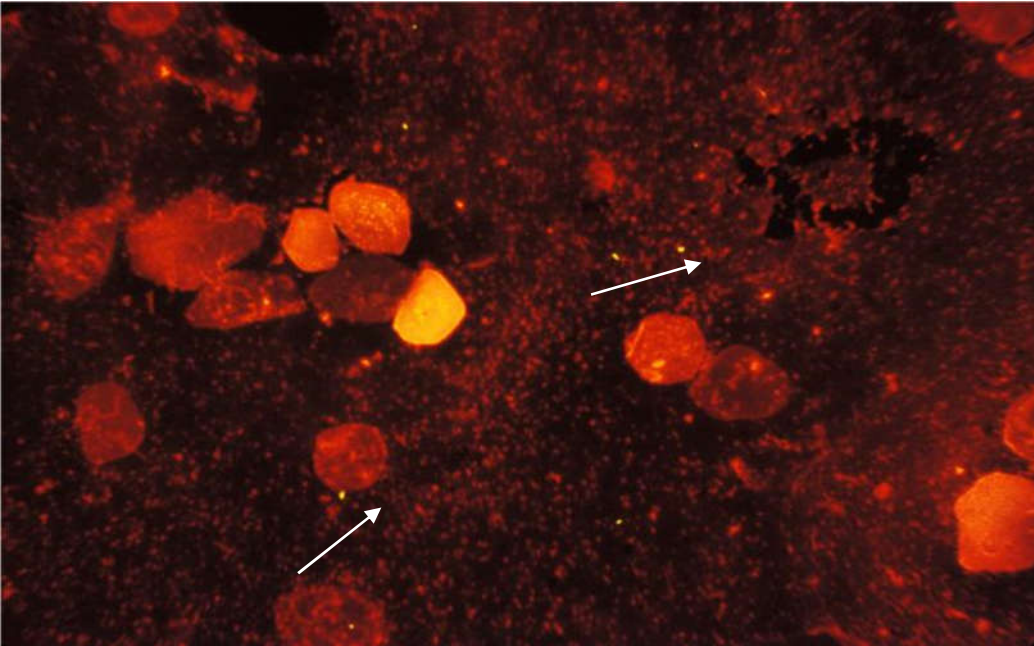
**Tablo 1.2** Patojenlerin tespitinde kullanılabilir seçici ve ayırt edici besiyerleri (Vazquez-Pertejo, 2023a).

Organizma	Tercih edilen besiyeri	Organizma	Tercih edilen besiyeri
Bakteroidler	Kanamisin-vancomisin lake edilmiş kanlı agar	<i>Francisella tularensis</i>	Kan veya çikolata-sistin agar
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Bacteroides</i> safra Eskülin Agarı	<i>Legionella</i> türleri	Tamponlanmış kömürlü maya ekstraktı ortamı
<i>Bordetella pertussis</i>	Metisilinli ve cephaleksinli Bordet-Gengou agar	Leptospira türleri	Tavşan serumlu Fletcher ya da Stuart Ortamı, BSA-Tween80 içeren Leptospira ortamı
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> agar	<i>Neisseria gonorrhoea</i> veya <i>Neisseria Menengitis</i>	Modifiye Thayer, Martin Agar New York City Agar
<i>Camphylobacter jejuni</i>	Sefoperazon-vancomisin agar	Salmonella ve <i>Shigella</i> türleri	MacConkey agar, eosin methylene blue, <i>Salmonella-shigella</i> agar, selenitli broth
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Tinsdale agar sistin-tellürür kanlı agar Löffler koagüle serum ortamı	<i>Vibrio</i> türleri	Tiyosülfat sitrat safra tuzları sükroz agar
<i>Escherichia coli</i>	MaCConkey-Sorbitol Agar	<i>Yersinia</i> Türleri	Sefsulodin-Irgasan novobiosin agar
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cetrimide agar	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ChromoSelective agar

Gram boyama tekniği ile lama ısı ile fiksasyonu sonrası sırasıyla kristal viyole, iyodin, renk giderici ve safranin gibi boyalara maruz bırakılarak patojenin gram durumu (pozitif veya negatif), hücre morfolojisi (basil ya da kok), veya hücre düzeni (kümeli, zincirli ya da diploid) hakkında bilgi sahibi olunabilir. Fakat bu şekilde gerçekleştirilen bir tanımlama tedaviye başlamak için yetersizdir.

Hücre özellikleri ve morfolojisi hakkında bilgiler sağlansa da gram boyama tekniğinde birden fazla morfoloji ya da özellik göstergesi kontaminasyon göstergesi olabileceği gibi polimikrobiyal enfeksiyonun da göstergesi olabilir (Vazquez-Pertejo, 2023c).

Asit-haslığı boyama tekniğiyle, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Cryptosporidium* gibi türler tayin edilebilir. Fakat bu yöntemde tayin edilmesi beklenen organizmalar biyolojik numunelerde kısıtlı miktarlarda bulunurlar. Tekrarlı kültivasyona ihtiyaç duyulmasından dolayı hassasiyetleri oldukça düşüktür. Akridin-turuncusu, auramin-rodamin ve auramin O boyası, kalkoflor beyazı gibi floresan boyalarla biyolojik numunelerdeki patojen antikorları hedeflenerek *Legionella*, *Mycobacterium* ve dermofitler gibi patojenler tanımlanabilir. Fakat bu yöntemlerde sonuçları okumak ve yorumlamak oldukça zordur. CDC tarafından yayımlanan bir raporda asit-haslığı testi ve floresans boyama sonucunda tükürükten elde edilen bir numunedeki patojenin *Mycobacterium tuberculosis* olduğu saptanmıştır (Vazquez-Pertejo, 2023a). İki yöntemin birleştirilmesiyle elde edilen bu yöntem ise ‘Smithwick’ yöntemidir. Işık mikroskopu ile analizlenen ve görüntüsü elde edilen *Mycobacterium tuberculosis* Şekil 1.4’te gösterilmiştir.



**Şekil 1. 4** Smitwick yöntemi ile tanımlanan *Mycobacterium tuberculosis* (Halk Sağlığı Resim Kütüphanesi (PHIL), CDC, 1971).

Dieterla ve Warthin-Starry boyası ile *Helicobacter pylori*, *Microsporidia*, *Spirochetes* ve *Bartonella henselae* (kedi çizdiği hastalığı) gibi organizmalar tanımlanabilir. Giemsa ve Wright boyaları ile kanda bulunabilecek parazitler, fagosit ve dokularda *Histoplasma capsulatum* ve bazı hücre içi patojen bakteriler tespit edilebilir. Trikrom boyası ve demir hemotoksisilin boyası *Cryptosporidium* gibi bazı mikrosporlar ve bağırsak protozoalarının tanımlanması için kullanılabilir. İndia ink boyası ile akciğer enfeksiyonları ve menenjit gibi hastalıklara neden olan *Cryptococcus neoformans* tanımlaması yapılabilir (Vazquez-Pertejo, 2023c).

Biyokimyasal fenotipleme yöntemlerinde ise temelde kültür ve koloni temelli yöntemler ile seçici/ ayırt edici kültürasyon tekniklerinin bazılarını ya da kombinasyonunu kullanılarak spesifik türlerin karakterizasyonu için kullanılan veritabanından yararlanılır. Belirli yapısal özellikler ve reaksiyon profilleri ile oluşturulan veritabanı ile analizlenen organizmanın gösterdiği özellikler kıyaslanarak patojen tanımlaması yapılabilir. BacTec (Becton Dickinson, Franklin Gölleri, NJ, ABD), BacT / Alert (bioMérieux, Marcy'Etoile, Fransa), VITEK (bioMérieux), PHOENIX (Becton Dickinson) veya Microscan WalkAway (Siemens Healthcare Diagnostics, Münih, Almanya) gibi cihazlar endüstride mikrobiyal tanımlama için kullanılan mevcut otomatize cihazlardır (Chandler et al., 2016; Ravea et al., 2019). Kromatografik ve spektroskopik (MALDI-TOF-MS) yöntemlerle benzer şekilde mikroorganizmanın ürettiği spesifik bir metabolitin tayin edilip veri tabanı ile kıyaslanmasına dayanan yöntemlerdir. Biyokimyasal fenotipleme yöntemleriyle çalışırken ön analiz olarak mikroskopik analiz ve boyama ile karakterizasyona, ayrıca ek kültürasyon adımına ihtiyaç duyulur.

Kültür temelli yöntemler, hassas, kolay adapte edilebilir, pahalı olmayan ve klinik numunedeki popülasyon hakkında hem kalitatif hem de kantitatif veri sağlayabilen yöntemlerdir. Fakat, tipik bir numune patojenlere ek normal flora organizmalarını da içerir. Çoğu durumda, izolasyon prosedürleri saf kültür elde etmek için gerçekleştirilmelidir. Bu da, ek kültürasyon gerektirir. Bu yüzden, kültür temelli yöntemler, yoğun emek gerektiren ve zaman alıcı yöntemlerdir.

Kültür ortamının hazırlanması, agar plakalara inokulasyon ve tür tayini için çoklu izolasyon adımı tayin için gereken süreyi uzatmaktadır.

Kültür ve koloni temelli yöntemlerde sonuçların çıkması 1-3 gün arasında değişmekte ve bazı mikroorganizmaların kültive edilemediği koşullarda daha uzun sürebilmektedir. Böylece, patojen tanımlaması için geçen süre günler bazen haftaları bulabilir. Bu, yöntemlerin düşük hassasiyette olmasının bir sonucudur. Fenotipik özelliklerin mikroorganizma türleri arasında benzerlik göstermesi bu yöntemlerin spesifikliğini düşüren etkenlerdendir.

### 1.2.2 Moleküler teknikler

İmmünolojik ve nükleik asit temelli teknikler gibi moleküler yöntemler mikrobiyal tanıyı önemli ölçüde geliştirmiştir. Geleneksel kültür temelli yöntemlere kıyasla moleküler tekniklerin bazı avantajları vardır. Moleküler teknikler, geleneksel teknikler gibi değişebilen fenotipik özelliklerden değil, daha stabil olan genotipik özelliklerden yararlanırlar.

İmmuno-tayin yöntemleri mikrobiyal tanıda kültürasyonu gerektirmeden hızlı tanı ve karakterizasyon sağlayan teknikler oldukları için moleküler tanı tekniklerinde öncü niteliğinde yöntemlerdir. İmmünolojik tekniklerin prensibi antikorların spesifik antijenleri tanımasına dayanır. Hastalık esnasında hasta bireyin bağışıklık sistemi yanıtları ya da semptomların gözlenmesine neden olan virülans faktör antijenleri ve antikorları bu yöntemlerin hedefi olabilir.

Aglutinasyon testlerinde, lateks boncuk, jelatin partiküller ya da bakteriler, bir antikor ya da antijen ile eşleştirilirler. Bu partikül kompleksleri daha sonra numune (serum, beyin-omirilik sıvısı) ile karıştırılır. Eğer hedeflenen antijen ya da antikor numunede bulunuyorsa ölçülebilir aglütinasyon gerçekleşir. Aglütinasyon testleri hızlıdır fakat diğer tüm yöntemlere kıyasla daha az hassastır. Böbrek yetmezliğine ve akciğerlerde ciddi kanamalarla “ağır pulmoner hemoraji sendromuna yol açmalarıyla bilinen spiroketler sınıfından *Leprospirosis* türleri klinikte aglutinasyon testleri ile tanımlanabilmektedir. Bunun yanında, hayvanlardan insanlara geçen hastalıklardan biri olan Bruselloz’a neden olan *Brusella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* gibi türlerin de klinikte tayini için aglütinasyon testlerinden faydalanılır. Fakat tanı, kültür temelli ve

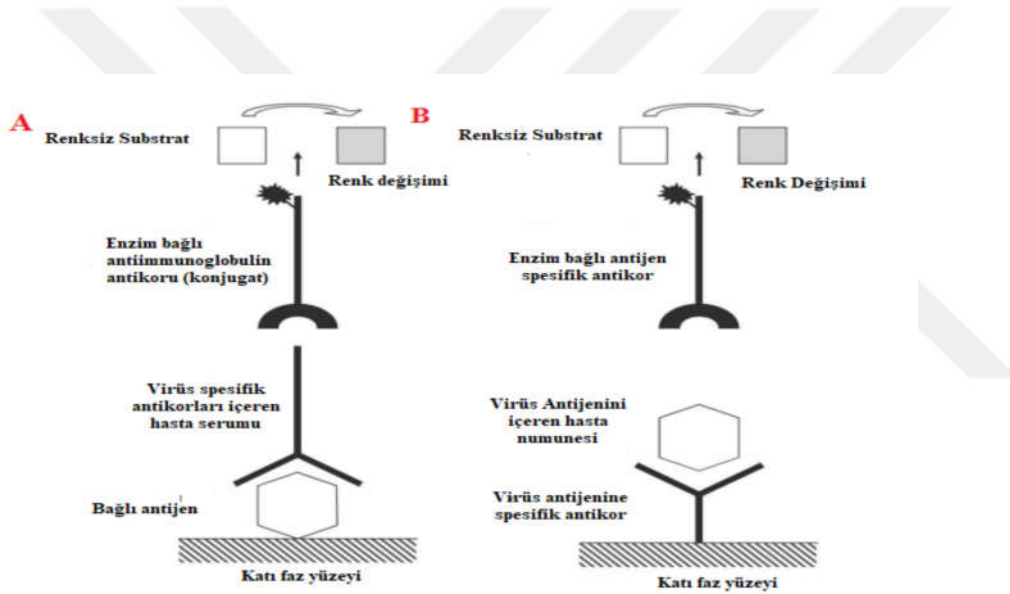
moleküler tekniklerle kombine edilmelidir (Otašević et al., 2018; Vazquez-Pertejo, 2023a).

Komplement fiksasyon testleri (CFT), özellikle viral ve fungal türlerin tanımlanmasında kullanılır. Numunenin bilinen komplement ve antijen ile inkübe edilmesi sonucu oluşan etkileşimlerden yola çıkılarak hedef antikorun ölçülmesine dayanır. Bu yöntem oldukça pahalı ve çok fazla iç kontrol gerektirmektedir. Spiroketler sınıfından *Treponema pallidum* ve alt türleri olan *T. pallidum* spp *endemicum*, *T. pallidum* ssp *pertenue*, *T. carateum*) organizmalarının neden olduğu ve cinsel yolla bulaşan bir hastalık olan “Sifilis” hastalığının tanısında komplement fiksasyon testi temelli bir yöntem olan “Kardiyolipin Wasserman” testi kullanılmaktadır. *Coxiella burnetii* enfeksiyonunda ortaya çıkan ve endokardit, akut solunum sıkıntısı sendromu gibi belirtileri olan Q humması enfeksiyonunun tanısında komplement fiksasyon testleri kullanılmaktadır. Fakat, bu testlerde. *Legionella micdadei* (%34) ve *Bartonella* (%50) gibi organizmalarla çapraz reaksiyon görüldüğü rapor edilmiştir (Musso & Raoult, 1997).

Çöktürme testleri, antikor-antijen komplekslerinin agaroz jel gibi bir matrikste görünür bir şekilde çöktürülmesine dayanan yöntemdir. Farklı çöktürme testleri mevcuttur fakat çok fazla antikor ya da antijen gereksiniminden dolayı bu yöntemlerin hassasiyeti düşüktür. Bu da kullanımı oldukça sınırlandırmaktadır. *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* gibi organizmaların birlikte sebep olduğu akut piyogenik menenjit gibi polimikrobial enfeksiyonlarda tercih edilmektedir (Vazquez-Pertejo, 2023b). Enzim immunitayin yöntemleri, patojenlere ait antijenleri tespit etmek için antikorları ya da hastada gelişen bağışıklık sistemi antikorlarını tespit etmek için antijenleri kullanan tekniklerdir.

Basit bir katı faz enzim immunitayin yöntemlerinde, virüs ile enfekte olmuş hücreler, hücre lizatları, saflaştırılmış ya da kısmi saflaştırılmış, rekombinant viral antijenler ya da sentetik peptitler, genellikle mikrokuyucuklu cam ya da plastik plaka olabilen bir katı faza immobilize edilir. Hasta serumu, antijenle ve bağlı antikorla inkübe edilir, yıkama adımından sonra işaretlenmiş antiimmunoglobulin konjugatlar görüntülenir (Şekil 1.5). Eğer kullanılan işaret bir

enzim ise, test enzim immunitayin (EIA) ya da enzim aracılı immunosorbent tayin (ELISA) olarak adlandırılır. Eğer floresan bir işaret kullanılıyorsa immunofloresan test (IFT) olarak adlandırılır. Test sonunda bağlanan antikor, enzime bağlı olarak analizlenir. Bu amaçla genellikle horseradish peroksidaz (HRP) ya da alkalın fosfataz (AP) enzimi kullanılır. HRP-EIA testlerinde ortofenildiamin (OPD) renksiz kromojeni ve substrat olarak hidrojen peroksit kullanılır. Eğer HRP-konjugatı antikor-antijen kompleksine bağlanırsa renksiz kromojen sarıya döner ve reaksiyon ürünü spektrofotometrik olarak 490-492 nm'de analizlenir. Bu sayede bir hasta numunesinde herhangi spesifik bir antikorun bulunup bulunmadığı belirlenir (Vazquez-Pertejo, 2023c).



**Şekil 1. 5** ELISA ya da EIA testlerinin genel prensibi (Vainionpää et al., 2015; modifiye edilmiştir).

ELISA testleri çok geniş skalada enfeksiyon hastalıklarının tespiti için geliştirebilmektedir. HIV Tip 1 ve Tip 2, *Salmonella typhi*, Herpes simplex 1 ve 2, insan adonovirus, *Bordetella pertussis*, *Brucella*, *Chikugunya*, *Clamidia Trachomatis*, *Cytomegalovirus*, *Epstein barr* virüsü, Hepatit C, Hepatit D, *Helicobacter pylori*, *İnfluenza*, Covid-19, *M. tuberculosis*, *Rubella*, *Treponema Palladum*, *Toxoplasma gondii* gibi çeşitli enfeksiyonlar için geliştirilen ELISA kitleri ticari olarak mevcuttur.

ELISA testlerinin yüksek kapasiteli, hızlı, nispeten düşük maliyetli, hassas ve kantitatif veri sunan bir yöntem oluşu klinik tanıda önemli bir avantajdır. Fakat hastanın yaşı, mikrobiyal serotip, hastalığın aşaması gibi birçok faktörden etkilendiği için hassasiyeti durumdan duruma farklılık göstermekle birlikte çoğunlukla düşüktür (Vainionpää et al., 2015; Vazquez-Pertejo, 2023a).

Western-blot testleri, blotlama ile numunedeki antimikrobial antikörlerin hedef antijen ile hibridizasyonu sonucu oluşan kompleksi blotlama ile başka bir membrana taşıyarak tayin etmeye dayanan bir yöntemdir. Western-blot testlerinin hassasiyeti ELISA testlerinden daha düşüktür, genellikle ELISA tarama testi sonucunda pozitif olarak elde edilen sonucu doğrulamak için kullanılır.

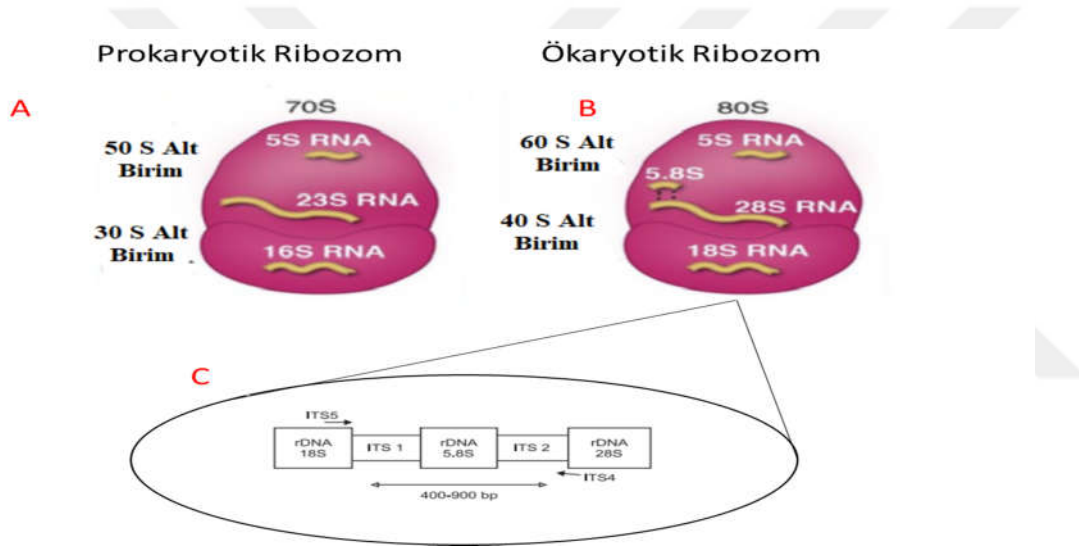
Nükleik asit temelli tanı yöntemleri ya da nükleik asit temelli testler (NAT), DNA ve RNA'ları kullanarak geliştirilen teknolojilerdir. Tüm nükleik asit temelli yöntemlerin ana karakteristiği patojenleri tanımlamada kullanılacak bir genetik sekans seçimidir. Genelde patojen tanımlaması, ilgili organizmanın genomunda korunmuş 'house-keeping' olarak adlandırılan gen bölgelerinin seçimi ya da genomlarının rastgele kısımlarının taranması yoluyla yapılır (Mothershed & Whitney, 2006; Otašević et al., 2018). Dirençlilik ya da virülans faktörleri sentezlemede kullanılan gen bölgelerinin hedeflenmesi de mikrobiyal patojenitenin anlaşılmasında ve bu patojenleri tanımlamada oldukça önemlidir.

İdeal olarak, mikrobiyal karakterizasyonda kullanılan bir gen bölgesi, her türe özgü olan bölgeler içermelidir. Bakteri, arkea ve ökaryotlar gibi yaşamın her formunda bulunan ribozomal RNA (rRNA) moleküllerini kodlayan gen bölgeleri yaşayan tüm organizmaların gerçek kimliklerinin saptanmasında ve onların taksonomik yakınlığının incelenmesinde kullanılmaktadır.

Ribozomlar, proteinler ve rRNA'dan oluşan hücre içi partiküllerdir. Ribozomun büyüklüğü, ultrasantrifüjle partiküllerin çökme hızının bir ölçüsü olan Svedburg (S) birimi ile belirtilir. Bakteriyel ve arkeal hücreler 30 S ve 50 S alt birimlerden oluşan 70S ribozomlara sahiptir. 30 S alt birimi yaklaşık 1540 nükleotid içeren 16s rRNA molekülünü içerir. 50S alt birimi, 2900 nükleotid içeren 23S rRNA bölgesini içerir (Şekil 1.6a). Funguslar, 40S ve 60S olmak üzere iki alt birimden oluşan 80S ribozom içerirler. 40S rRNA, 18S rRNA ve büyük 60S

altbirimi 25S rRNA ve 5.8S rRNA içermektedir (Şekil 1.6b) (Siqueira & Rôças, 2005).

Büyük alt birim (23S ve 25S rRNA) ve küçük alt birim genleri (16S ve 18S rRNA) mikrobiyal kimlik saptama, karakterizasyon ve sınıflandırmada sıklıkla kullanılırlar. 16S rRNA geninin amplifikasyonu, bakterilerin tür düzeyinde tanımlanabilmesi için son derece hassas bir yöntemdir (Al-jailawi et al., 2014). Küçük alt birim genleri, tüm yaşayan sistemlerde evrimsel süreçte en fazla korunan makromoleküllerdir. Küçük altbirimleri kullanmanın avantajı tüm organizmalarda bulunması, yeterli bilgiyi sağlayacak kadar uzun, kolayca sekanslanabilecek kadar kısa olmasıdır.



**Şekil 1. 6** Nükleik asit temelli yöntemlerde tanı için baz alınan ribozomal RNA yapılarının şematik gösterim a) prokaryotik hücreler için b) ökaryotik hücreler için c) ökaryotik hücrelerin ribozom alt birimlerinin yerleşimi (Champney, 2020).

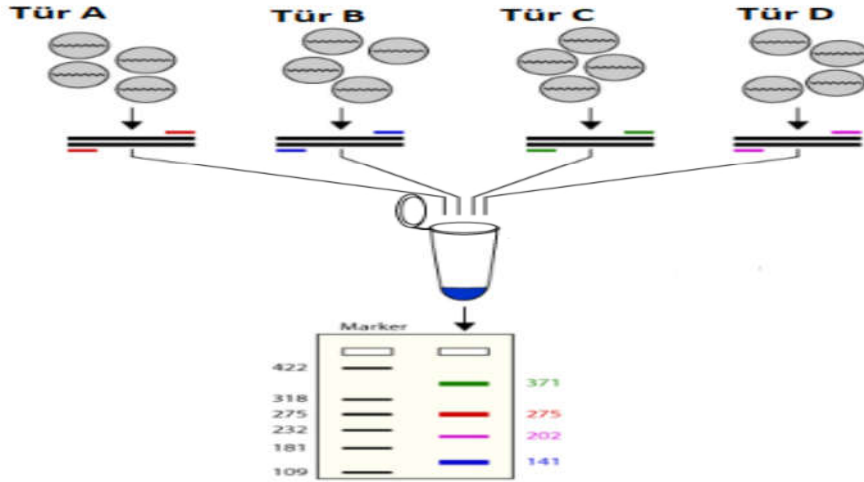
2012 yılında Uluslararası Fungal Barkodlama Konsorsiyumu resmi olarak nükleer ribozomal RNA'daki ITS (internal transcribed spacer) bölgelerinin fungal barkodlamada kullanılabileceğini önermişlerdir. Funguslarda tüm ITS bölgeleri, yaklaşık 400-900 bp uzunluğundadır ve iki boşluk içerir. Bu boşluk, 5.8 S rRNA ile ayrılan ITS1 ve ITS2 bölgeleridir. ITS bölgesi, ITS1'in 5' ucunda 18 rRNA geni vardır ve ITS2'nin 3' ucunda 28 rRNA birimi vardır (Şekil 1.6c) (Lebonah et al., 2014).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kabul edilen ilk nükleik asit temelli test, *Chlamydia* ve *Gonococci* tayini için geliştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonunun 1983'te keşfi ile birlikte nükleik asit temelli tanı yöntemlerinde çığır açılmıştır (Mullis, 1990). Bu doğrultuda bir patojenin spesifik ve tek başına tayininden birden fazla organizmanın birlikte tayinine kadar çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.

Geleneksel PCR, Real-time PCR, Revers-trankriptaz PCR (RT-PCR), Ligaz Zincir Reaksiyonu (LCR), nükleik asit sekansı temelli amplifikasyon (NASBA), transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA), iplikçik yer değiştirme amplifikasyonu (SDA), dönen daire amplifikasyonu (RCA), dönen prob teknolojisi (CPT), hibrid yakalama amplifikasyonu gibi teknikler spesifik tek bir patojeni tanımlamak için kullanılan nükleik asitlerin amplifikasyonuna dayalı tekniklerdir. Bu yöntemler hedefledikleri molekülün yapılarına ya da yöntemde uygulanan amplifikasyonun biçimine göre ayrılırlar. Örneğin; geleneksel PCR ve real-time PCR, hedef olarak DNA'yı hedeflerken RT-PCR, NASBA gibi teknikler RNA'yı hedefler. Yine NASBA, SDA, TMA, RCA gibi izotermal amplifikasyon teknikleri ise izotermal amplifikasyon ile termal döngü cihazı gereksinimini ortadan kaldırır. Hibrit yakalama teknolojisinde hedef DNA/RNA hibritlerinin kolorimetrik olarak AP enzimi ile tayin edilmesi hedeflenir (Mothershed & Whitney, 2006).

İzotermal ya da döngü amplifikasyonuna dayalı yöntemler birbirlerinden metodun uygulanışı, hassasiyeti, spesifikliği, kontaminasyona duyarlılığı gibi yönlerden ayrılırlar da temelde organizmaların genomlarında korunmuş bölgelerin hedeflenerek çoğaltılıp tayin edilmesini sağlayan tekniklerdir.

Tek organizma tayininin dezavantajlı olduğu durumlar için çoklu analize imkan veren multipleks PCR, microarray ya da broad-range (16 S PCR) gibi teknikler geliştirilmiştir. Multipleks PCR, iki ya da daha fazla hedef DNA sekansınının birden fazla primer çifti varlığında tek bir reaksiyonda amplifiye edildiği PCR tekniğidir (Şekil 1.7) (Markoulatos et al., 2002).



Şekil 1. 7 Multipleks PCR ile tür tayini şematik gösterimi (Acharya Tankeshwar, 2022).

Enfeksiyonel hastalıklar alanında multipleks PCR, virüslerin bakterilerin ve parazitlerin kimlik saptanmasında kıymetli bir yöntem haline gelmiştir (Lucignano et al., 2011). Multipleks PCR tek bir organizmanın genomunda farklı bölgelerin aynı anda hedeflenmesi için kullanılabileceği gibi aynı anda farklı organizmaların hedeflenmesi için de kullanılabilir. Ticari olarak, klinik ve gıda başta olmak üzere birçok alanda kullanılmak üzere tasarlanmış multipleks PCR kitleri mevcuttur. Örneğin; solunum yolu patojenleri çoklu tanı test kiti ile, Influenza A ve B, Solunum sinsityal virüsü, Adenovirüs, *Mycoplasma pneumoniae*, insan rhinovirüsü aynı anda tespit edilebilmektedir (Sansure, S3066E-6RP, China). Benzer olarak el, ayak ve ağız hastalıklarına neden olan patojenler olan *Coxsachie* virus, *Rubella* virüs, insan enterovirus gibi patojenlerin birlikte tayin edildiği multipleks PCR çeşitleri vardır.

Nükleik asit temelli yöntemler daha hassas, spesifik ve genelde daha hızlı veriler sağladıkları için rutin analizler için daha uygundur. Bu tekniklerde elde edilen verilerin yorumlanabilmesi herhangi bir taksonomik uzmanlık gerekmez. Ayrıca bu sonuçlar, herhangi bir kültürasyon adımı gerektirmeden doğrudan mikroorganizmalardan ekstraksiyon sonucu tayin edilebilen moleküller aracılığıyla elde edilir.

Nükleik asit temelli yöntemlerin kültür koloni temelli ve immünolojik testler üzerinde avantajları birtakım avantajları vardır (Mothershed and Whitney,

2006; Nikiforova et al., 2015; Otašević et al., 2018; Sousa and Pereira, 2013; Vainionpää et al., 2015). Bunlar;

- ✓ Sadece kùltive edilebilen değil, kùltive edilemeyen organizmalarda tayin edilebilir,
- ✓ Klinik örneklerde kùltivasyon adımı gerekmeksizin tayin gerçekleştirilebilir,
- ✓ Numune alma ve taşıma sırasında dikkatli bir şekilde kontrol edilen anaerobik koşullar gerektirmezler (anaerobik bakteriler ve diğer kırılgan mikroorganizmalar transit sırasında canlılığı kaybedebilir, bu durum nükleik asit temelli yöntemler için bir dezavantaj değildir),
- ✓ İmmunolojik yöntemlerden daha spesifik ve kùltür koloni temelli yöntemlerden daha hızlıdır.
- ✓ Kùltür ve koloni temelli ve yöntemlerden daha hassastırlar.

Bu çalışmada, nozokomiyal enfeksiyonlarda sıklıkla karşılan bakteri ve mantar patojenlerin tespitinde kullanılmak üzere polimeraz zincir reaksiyonu temelli yöntemlerin geliştirilmesi üzerine çalışıldı. Bu amaç doğrultusunda, Bölüm 1.3'de PCR yöntemi, temel prensibi ve bileşenleri gibi konular üzerinde duruldu, PCR tasarlanırken dikkat edilecek unsurlara değinildi.

### **1.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

Belirli bir gen bölgesinin bir ve birden fazla kopyası baz alınarak istenilen büyüklük ve sayıda kopyalarının elde edilmesine olanak sağlayan moleküler biyolojik teknik polimeraz zincir reaksiyonu (PZR ya da PCR) olarak adlandırılmıştır (Mullis, 1990).

Polimeraz zincir reaksiyonu, keşfinden itibaren akademide ve endüstride kıymetli bir araç olarak kullanılmaktadır (Şekil 1.8). Başlıca klinik araştırmalar ve medikal tanının ayrılmaz bir parçası olan PCR, bilim dünyasında vazgeçilmez bir teknik haline gelmiştir. Geleneksel PCR tekniğinde çeşitli modifikasyonlar yapılarak kullanım alanı artırılmıştır.

Genetik araştırmalarda, PCR çok az numune ile bile DNA parçalarının hızlı bir şekilde amplifiye edilmesini sağlayarak Southern- ve Northern-blot gibi hibridizasyon tekniklerinin gelişmesine katkı sağlamıştır. Hücre ve dokuların

spesifik ekspresyon düzeylerinin araştırıldığı çalışmalar PCR'ın diğer yaygın kullanımı arasındadır. Burada floresan bir boya yardımıyla PCR ürünlerinin kantitatif olarak analizlendiği Real-Time PCR'dan faydalanılır (Agne et al., 2009; Mothershed & Whitney, 2006).

PCR ayrıca, genetik mutasyonların ve sonuçlarının araştırıldığı sekanslama çalışmalarına da katkı sağlar. İnsan genom projesinde, bir klondaki spesifik bir genomun varlığı PCR ile tespit edilir. Bu sayede klonlar hakkında daha detaylı bilgiler edinmeye olanak tanınır. Ayrıca kromozomal analiz teknikleriyle kalıtsal hastalıkların erken tanısı kolaylaşır. Geleneksel klonlama tekniğinde küçük DNA parçaları bir vektöre aktarılmadan önce PCR ile çoğaltılır (Agne et al., 2009).



Şekil 1. 8 Polimeraz zincir reaksiyonu kullanım alanları ( Agne et al., 2009 )

3'-ekzonükleaz aktivitesinden yoksun polimeraz enzimi kullanılması ya da PCR bileşenlerinin olması gereken özellikler dışında kullanılmasıyla uygulanan hata eğilimli PCR (Error-prone PCR) ve gen bölgeleri içerisinde belirli bir gen dizisini ekleme ya da çıkarmak için örtüşme uzatma (Overlap Extension PCR) gibi teknikler protein mühendisliği için modifiye edilen kıymetli PCR tekniklerindedir. Bu tekniklerin kullanıldığı mutagenез çalışmalarıyla genetik hastalıkların tedavisine yönelik çalışmalar gerçekleştirilir ve endüstride kullanılan

katma değeri yüksek makromoleküllerün etkinliğini ve performansı artırılabilir (Agne et al., 2009).

Tıpta böbrek, beyin, akciğerleri gibi çeşitli organlarda enfeksiyona neden olan bir patojen olan *M. tuberculosis* gibi organizmaların genotiplenerek erken tanı ve tedavisinde PCR önemli bir araçtır. Nötropeni hastalarında *Aspergillus* spp. türlerinin erken tanısında oldukça önemlidir fakat kültür temelli yöntemler bu patojen tespitinde yetersizdir. Burada PCR ile spesifik tanı yapılabilir. Tümör hücreleri tarafından üretilen ve kanser biyobelirteçi olarak değerlendirilen mRNA, reverse transkriptaz enzimi ile DNA'ya dönüştürülerek Revers-transkriptaz PCR (qPCR) ile spesifik kanserlerin tanısında kullanılabilir (Agne et al., 2009). Yine kanser ve nörodejeneratif hastalıkların anlaşılmasında büyük önem taşıyan metilasyon spesifik PCR (MS-PCR), spesifik bir genin metillenme durumunun araştırılmasında kullanılır (Mothershed & Whitney, 2006).

Virolojide, virüslerin ve nükleik asitlerin karakterize edilerek enfeksiyon esnasında viral davranışın belirlenmesinde etkin rol oynamaktadır. Bu sayede klinik tedavinin ve daha ileri araştırmaların ilerletilmesine yardımcı olmaktadır. Örneğin; qPCR, daha antikolar oluşmadan *Influenza A*, *retrovirüs HIV* ve *SARS-CoV-2* gibi enfeksiyonlarının erken tanısında kullanılmaktadır. Bu özellikle bağış yapılan kan numunelerinin analizi için ve hastalığın prognozisi yani seyrinin tahmini için oldukça önemlidir.

Dişçilikte PCR tekniği sayesinde yüz ve çene ile ilgili enfeksiyonların erken tanısı yapılabilir. Bu sayede, peridontal hastalıkların, çürüklerin, oral kanserin ve endodontal enfeksiyonlar gibi hastalıkların tedavisinde etkin müdahale sağlanabilir (Agne et al., 2009).

Adli tıpta parmak izi kontrolüyle, olay yerinden izole edilen küçük bir DNA parçası PCR ile çoğaltılarak suçluların DNA'larının bulunduğu bir veritabanıyla kıyaslanır. Ayrıca DNA parmak izi kontrolüyle babalık testi de yapılabilmektedir. Bu yöntemde olası çocuk, kardeş ve ebeveynler bir DNA numunesi ile kıyaslanır (Agne et al., 2009).

Çevre mikrobiyolojisinde, toksik atıklardaki çürükçül mikroorganizmalar tespit edilerek kirli bölgelerde biyoremediasyon çalışmaları yapılabilir. Gen-prob

temelli PCR ile araştırmacılar, su kaynaklarında bulunan koliform gibi zararlı organizmaları erken tespit edebilirler. Ek olarak, kamu sağlığı için risk teşkil eden mikrobiyal patojenlerin tespitinde ve izlemesinde kullanılır (Agne et al., 2009).

Ziraatte gıda patojenlerinin tayini, bitki ıslahında genotipleme ve genetiği değiştirilmiş organizma (GMO) analizlerinde de PCR'dan sıklıkla faydalanılmaktadır (Agne et al., 2009).

### 1.3.1 PCR'ın temel prensibi

Çoğaltılması hedeflenen DNA'nın, polimeraz enzimi katalizi ve hedef DNA'ya özgül komplementer primerler varlığında bir dizi reaktifin yardımıyla istenilen uzunlukta çoğaltılmasına yarayan bu teknik temelde DNA fragmentinin tekrarlanan ısıtma ve soğutma işlemleriyle termal değişime maruz bırakılmasıdır (Kadri, 2019).

Her PCR analizi kalıp DNA, primerler, nükleotidler ve DNA polimeraza gereksinim duyar. DNA polimeraz enzimi bireysel nükeotidleri fosfodiester bağıyla birbirine bağlayarak PCR zincirini uzatır. Reaksiyondaki primerler, amlifiye edilecek DNA ürününü spesifikleştirir (Bittar & Bittar, 1996).

Reaksiyon solüsyonu ilk önce hedef ya da kalıp DNA'ya ait iki komplementer zincirinin erime noktasına kadar ısıtılır. Çoğaltılmak istenen gen bölgesi kalıp DNA olarak ifade edilmektedir. Bu işlem, polimeraz zincir reaksiyonundaki iki ipliğin birbirinden ayrılmasını sağlayan *denatürasyon (1)* aşamasıdır. Genellikle bu sıcaklık, 90-95°C arasındadır. Tipik bir PCR reaksiyonunda biri başlangıç biri ise döngü denatürasyonu olmak üzere iki tip denatürasyon uygulanmaktadır. Bu iki tip denatürasyonu birbirinden ayıran temel özellik zamandır. Başlangıç denatürasyonu 5-10 dk arasındayken, döngü denatürasyonunda bu süre 30 sn ile 1 dk arasındadır. Başlangıç denatürasyonunun uzun olmasının sebebi bütün DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrılmalarını sağlamaktır (Bittar & Bittar, 1996)

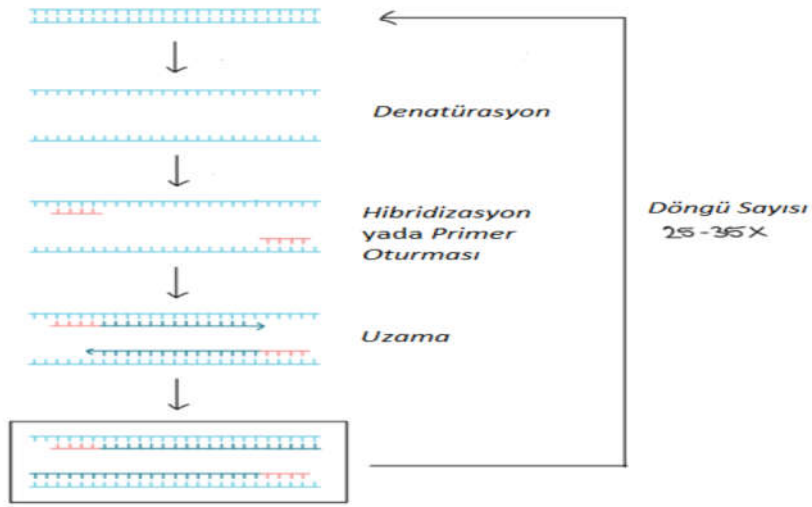
Primerler, tek zincirli nükleik asit dizilerinden oluşan kısa DNA dizileridir. Kalıp DNA'nın iki zincirine komplementer yani tamamlayıcı olacak şekilde dizayn edildikten sonra sentetik olarak sentezlenirler (Bittar & Bittar, 1996). Temelde ileri ve geri olmak üzere iki tip primer kullanılmaktadır.

Primerlerin, kalıp DNA iplikliklerine bağlanması ya da bağlanması için reaksiyonun belirli bir sıcaklıkta olması gerekmektedir. Bu, primer bağlanma sıcaklığı ( $T_m$ ) olarak adlandırılmaktadır. Primer bağlanma sıcaklığı primer dizisinin uzunluğu ve bu dizinin % G-C (Guanin-Sitozin) içeriği ile ilişkilidir. Ortalama 55-65 °C olan primer bağlanma sıcaklıkları aşağıdaki formül ile de hesaplanabilir.

$$T_m = 4^{\circ}\text{C} (\text{G/C nükleotitleri sayısı}) + 2^{\circ}\text{C} (\text{A/T nükleotitleri sayısı})$$

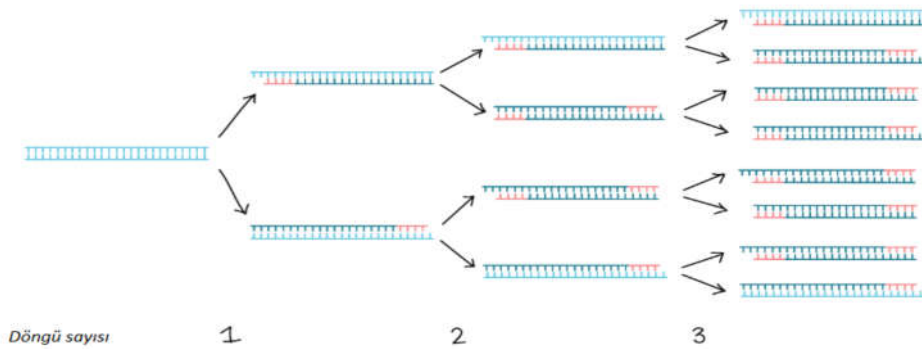
Denatürasyon evresiyle ikiye ayrılan kalıp DNA zincirlerine, sıcaklık-spesifik primerlerin bağlanması için reaksiyon sıcaklığı düşürülür. Bu evreye *primer bağlanma evresi (2)* ya da *hibridizasyon* adı verilmektedir.

Sıcaklık yeniden yükseltilerek DNA polimerazın DNA ipliğini uzatılmasını sağladığı *uzama evresine (3)* geçilir. Bu adımda reaksiyona substrat olarak eklenen dört nükleotid (adenin (A), guanin (G), sitozin (C), timin (T)) ile primerler, kalıp dizisine göre DNA polimeraz enzimi ile fosfodiester bağıyla bağlanırlar (Şekil 1.9). Aynı denatürasyon evresinde olduğu gibi birbirlerinden süre açısından farklı olan döngü uzaması ve son uzama evresi olmak üzere iki uzama evresi vardır. Döngü uzaması, tipik olarak 30 sn ile 1 dk arasındayken son uzama evresi 5 ile 10 dk arasındadır.



**Şekil 1. 9** Bir döngü içerisinde DNA'nın amplifikasyonu; temelde üç aşamadan oluşur. Çift iplikli DNA zincirlerinin ayrıldığı denatürasyon, dizilere komplementer primerlerin kalıp DNA ile eşleştiği primer bağlanma evresi ve polimerizasyonun gerçekleştiği uzama evresi (Khan Academy, 2016)

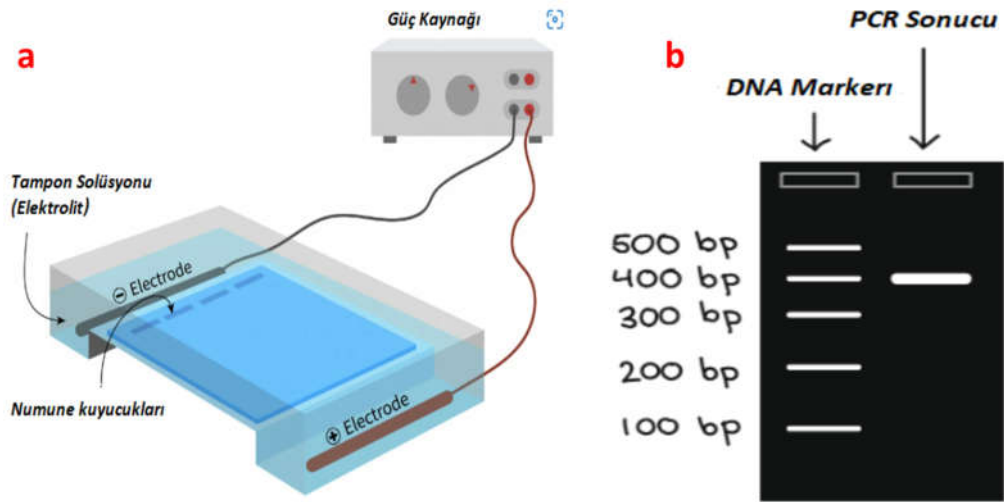
PCR ile DNA'nın istenilen miktarda amplifikasyonu için denatürasyon, hibridizasyon ve uzama evrelerinin tekrar etmesi gerekmektedir. Buna döngü adı verilmektedir. Her bir döngüde reaksiyonun başında varolan DNA sayısı ikiye katlanır ( $2^n$  sayıda kalıp sayısına ulaşılır, n; döngü sayısını ifade eder) (Şekil 1.10). Reaksiyon sonucunda amplifiye olan DNA'lardan oluşan PCR ürünü elde edilir.



**Şekil 1. 10** Temel olarak bir kalıp, ilgili kalıba spesifik primer ve DNA Taq polimeraz varlığında gen parçasının tekrarlı olarak termal döngüye sokularak birçok kopyasının elde edildiği yöntemdir (Khan Academy, 2016)

PCR ürünü, tanımlanmış uzunlukta bir DNA parçası olmalıdır. Amplifiye edilen ürünü analizlemek için agaroz/poliakrilamid jel elektroforezi, blotlama, restriksiyon endonükleaz kesimi, direk sekanslama, elektrokemilüminesans, yüksek performanslı sıvı kromatografisi gibi çeşitli teknikler kullanılır. En basit ve yaygın olarak kullanılan teknik elektroforez tekniği ve genellikle floresans bir boya olan etidyum bromür ile boyanmış DNA'nın görüntülenmesidir.

Yükleme boyası ile jele yüklenen ve daha sonra jelde uygulanan elektriksel güç ile göç eden PCR ürünü olan DNA, yük ve boyutuna göre agaroz jel elektroforez tekniği ile birbirinden ayrılır. Bu matrikste, kısa ya da küçük moleküller daha uzağa ilerlerken büyük ya da uzun moleküller daha geride kalır (Şekil 1.11 a). Elektroforez tamamlandıktan sonra agaroz porlarında boyutlarına göre ayrılmış DNA molekülleri, etidyum bromür (EtBr) boyası ile görünür hale getirilir. Molekül ağırlığı bilinen DNA işaretleyici (marker) varlığında analizlenen DNA'ya ait boyut analizi de yapılabilir (Sigma Aldrich, 2000).



**Şekil 1.11** a) Agaroz jel elektroforez görüntüsü; b) Jelin 1. kuyucuğunda yer alan DNA markeri ile DNA numuneleri boyutlarına göre analizlenmektedir (Bittar & Bittar, 1996; PCR Product Analysis, 2000.; modifiye edilmiştir).

### 1.3.2 PCR'in etkinliğini ve spesifikliğini etkileyen parametreler

Spesifik DNA parçasını amplifiye etme özelliği sayesinde birçok alanda sağlam ve güvenilir bir yöntem olan PCR'in uygulamada dikkat edilmesi gereken engelleri vardır. Spesifik uygulamada PCR değişkenleri arasında kalıp DNA

miktarı ve kalitesi, nükleozit trifosfat ve magnezyum konsantrasyonu, döngü parametreleri gibi etkenler PCR'ın etkinliğini ve uygunluğunu etkilemektedir. Bu nedenle reaksiyon koşulları uygulama esnasında optimize edilmelidir.

Özellikle adli ve klinik uygulamalarda olmak üzere kontaminasyona karşı önlemler alınması gerekmektedir. Mikroorganizma kontaminasyonunu engellemek için örnek hazırlama, reaksiyon hazırlama, termal döngü cihazı ve analiz alanı gibi uygulama aşamalarında aseptik çalışma kuralları takip edilmelidir. Ekipmanların, çalışma alanlarının ultraviyole ışık ve kimyasal dekontaminasyon prosedürlerine ile steril edilmesi ve temizlenmesi de uygulanacak önlemlerdendir.

#### **1.3.2.1 DNA polimeraz enzimi ve konsantrasyonu**

Birçok DNA polimeraz enzimi birbirinden termal stabilite, ekzonükleaz aktivitesi, işlenebilirliği, revers transkriptaz aktivitesi gibi özellikleri ile birbirinden ayrılmaktadır. Yüksek sıcaklıklara dayanıklı olması ve geniş pH aralıklarında optimum aktivite göstermesi ile Taq DNA polimeraz en yaygın kullanılan DNA polimeraz enzimidir (Bittar & Bittar, 1996; Kadri, 2020). Tavsiye edilen Taq DNA polimeraz konsantrasyonu, reaksiyon başına 1-2,5 unit/mL'dir. Enzim gereksinimi, hedef DNA'ya, primere ve tedarikçiye göre değişebilir. Farklı marka ürünler, farklı formülasyona, gereksinim duyduğu çalışma koşullarına ve 'unit' tanımlarına göre farklı aktivite gösterebilirler. Eger enzim konsantrasyonu çok fazla olursa (>4 unit/mL), PCR'da non spesifik bağlanmalar gözlenebilir, çok az olursa yetersiz PCR ürünü ile sonuçlanabilir.

Her termostabil DNA polimeraz enziminin optimum aktivite göstermek için kendine has tampon gereksinimi vardır. Çoğunlukla bu tampon pH 8.3-9.0 ve 10 mM-50 mM konsantrasyonda Tris-HCl tamponudur. Reaksiyon tamponu konsantrasyonu genelde enzimin tedarikçisi tarafından belirlenir.

#### **1.3.2.2 Magnezyum konsantrasyonu**

Magnezyum konsantrasyonunun PCR'ın etkinliği ve spesifikliği üzerinde önemli bir etkisi vardır. Polimerazın aktif bölgesiyle bağ yaparak kofaktör görevi gören  $Mg^{2+}$ , dNTP'lerin fosfat grubu ile primerlerin 3' ucu arasında

fosfodiester bağı oluşumuna yardımcı olur. Aynı zamanda DNA'ların (primer ve kalıp) negatif yüklerini stabilize eder.

Enzim aktivitesi üzerinde direkt etkisine ek olarak, döngü esnasında oluşan primer-kalıp, kalıp-kalıp, primer-primer gibi hibridlerin  $T_m$ 'leri üzerinde de etkilidir. Ayrıca, reaksiyonda EDTA gibi şelatör ya da serbest nükleotid varlığı da etkin magnezyum konsantrasyonunda önemlidir.  $Mg^{2+}$  konsantrasyonu çok az ise, az PCR ürünü elde edilir veya hiç elde edilmeyebilir. Eğer  $Mg^{2+}$  konsantrasyonu çok fazla olursa, kalıp ile primerin spesifik olmayan bağlanması ya da primer dimeri oluşması ile sonuçlanabilir. Her primer çifti için  $Mg^{2+}$  konsantrasyonu 0,5 mM-5 mM arasında ayarlanmalıdır.

### **1.3.2.3 Deoksiribonükleotidtrifosfat (dNTP)**

Çoğu PCR için toplam 80 mM ile 800 mM (her bir dNTP için 20-200 mM) arasında dNTP konsantrasyonu önerilir. Yüksek konsantrasyonlar Taq DNA polimerazın yanlış nükleotidi bağlamasıyla oluşan mutant PCR ürününe sebebiyet verir. Bu yüzden fazla konsantrasyonlarda dNTP kullanımlarından kaçınılmalıdır.

### **1.3.2.4 Kalıp DNA**

Kalıp DNA kalitesi, PCR uygulamalarının başarısı için en kritik parametrelerden biridir. İzolasyon aşamasında yapı ve stabilitesini korumuş, aynı zamanda izolasyon adımında kullanılan ve PCR reaksiyonunu inhibe edebilecek iz miktardaki SDS ya da fenol, kloroform gibi organik kimyasallardan da arındırılmış olmalıdır (Agne et al., 2009; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2012)

Primer konsantrasyonlarının, kalıp konsantrasyonundan  $10^7$  kat fazla olması standart bir PCR reaksiyonu için iyi bir yöntem ve kuraldır. 0,5 mM üzerinde primer kullanılması, PCR ürününe negatif etkileyecek miktarda primer-dimeri oluşması ile sonuçlanır (Markoulatos et al., 2002).

### **1.3.2.5 Döngü parametreleri**

Denatürasyon evresinde DNA zincirlerinin birbirinden ayrılması kritiktir. 94-96 °C'de 1 dk genellikle bu ayrılma için yeterlidir. Fakat, kalıp DNA'nın G-C içeriğinin fazla olduğu durumlarda daha yüksek sıcaklıklar gerekebilir. Bir PCR

reaksiyonunda her zaman kalıp DNA için aşırı primer bulunmaktadır.  $T_m$ 'de serbest primer ve kalıba bağlı olan primer dengededir. Primer bağlı olan kalıp DNA, uzama sıcaklığında polimeraz enzimi ile uzatılmaya başlar. Kalıba bağlı primerler ile serbest primerlerin dengede kalabilmesi için yeni primer kalıp bağlanmaları olması gerekmektedir. Bu nedenle, primer bağlanmalarının etkin olabilmesi, primer bağlanma sıcaklığı ile denatürasyon sıcaklığı arasındaki soğuma hızına bağlıdır. Bu yüzden genelde, gerçek hibridizasyon sıcaklığı hesaplanan hibridizasyon sıcaklığından daha farklıdır. Primer bağlanmasının en spesifik ve etkin olduğu sıcaklık ise primer bağlanma sıcaklığıdır ( $T_a$ ).  $T_a$ , deneysel olarak belirlenir ve genellikle  $T_m$  ile arasında 5°C pozitif ya da negatif yönde fark vardır. Yüksek  $T_a$ , yüksek spesifiklik düşük bağlanma oranı anlamına gelirken düşük  $T_a$  az düşük spesifiklik yüksek bağlanma oranı anlamına gelmektedir. Uzama evresi sıcaklığı Taq polimeraz enzimi optimum çalışma sıcaklığı ile ilgiliyken, uzama süresi, amplifiye edilen bölgenin uzunluğuna göre belirlenir. 500 baz çifti uzunluğunda bir DNA için bu süre 1 dk iken daha uzun DNA'lar için bu süre 2 ile 3 dk arasında olabilmektedir (Agne et al., 2009; Kadri, 2020).

#### **1.3.2.6 Primer dizaynı ve konsantrasyonu**

Çoğu PCR uygulamalarında, PCR primerleri 10-30 baz çifti uzunluğunda ve % 40-60 oranında guanin-sitozin içeriğine sahiptir.

Primerlerin kendi içlerindeki veya aralarındaki etkileşimden kaçınılmalıdır. Ek olarak, primerlerin ve kalıp DNA'ların sekonder yapı oluşturmaları engellenmelidir. PCR'in etkinliği ve spesifikliği 3' ucu iki ya da daha fazla guanin ve sitozin içeren dizilerin tasarımıyla artırılabilir. Ayrıca, iki primer arasındaki erime sıcaklıkları farkı çok fazla olmamalıdır. Uygulamaya göre primerler, spesifikliği kontrol etmek ya da bir sonraki uygulama basamağında faydalı olması amacıyla farklı özellikte olabilirler. Buna modifiye primerler örnek gösterilebilir (Dieffenbach et al., 1993).

Genellikle, 0,1 mM-0,5 mM konsantrasyonlarda primer kullanımı önerilir. Yüksek konsantrasyonlarda primer kullanımı yanlış primer bağlanmasına, böylece spesifik olmayan ürün oluşumuna ve primer dimerleri oluşumuna neden olur. Bu

yan ürünler bir sonraki PCR döngüsündeki substrat olacağı için amplifiye edilmesi istenen ürünün düşük verimde elde edilmesine neden olur.

#### 1.4 PCR'ın Kısıtlamaları Ve Geliştirilen Stratejiler

PCR kullanılan alanlarda kıymetli bir teknik olmasına rağmen, bazı kısıtlamaları vardır. PCR'ın uygulanabilirliği, etkinliği ve spesifikliğı ile ilgili olarak bazı durumlarda zorluklarla karşılaşmaktadır.

PCR'ın etkinliğini belirleyen parametreler aşağıdaki gibidir;

i) spesifiklik; yalnızca istenilen bölgenin amplifiye edilmesi

ii) verimlilik; istenilen bölgenin yeterli miktarda amplifiye edilmesi

iii) uygunluğu; son PCR ürününde sekans hatası olmaması

iv) hassasiyet; az miktarda kalıp miktarı ile bile doğru amplifikasyon gerçekleşmesi

Başlıca dedeksiyona yönelik analizlerde, örneklerdeki kalıp DNA'ya erişebilirliğin sınırlı olması, yöntemin spesifikliğı kadar hassaslığını da etkilemektedir. Ayrıca reaksiyon esnasında primer dimerleri oluşumu gözlenmekte veya primerlerin istenilen bölgeden farklı bir bölgeye bağlanması sonucu spesifik olmayan ürünlere ait bantlar oluşabilmektedir. Kalıp DNA'nın sahip olduğu yüksek GC içeriğı, termal ısıtma ve soğutma işlemlerinin yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Oldukça hassas bir teknik olduğu için eser miktarda DNA miktarı ile bile yanıltıcı PCR ürünleri ile sonuçlanabilmektedir. Bütün bu sebepler PCR verimini olumsuz etkilemektedir.

Günümüzde yapılan çalışmalarda PCR etkinliğini artırmak amacıyla reaksiyona bazı organik ve inorganik moleküller eklenmekte, reaksiyonu güçlendirmek amacı ile döngü koşullarında modifikasyonlar yapılmaktadır.

##### 1.4.1 Dimetil sülfoksit (DMSO)

DMSO, yüksek dielektrik sabitine sahip ve polar bir organosülfür bileşimidir. Kalıp DNA'nın sekonder sekonder yapılaşmasını engellemek amacıyla PCR'a eklenen bir ek bileşendir (Hardjasa et al., 2010).

PCR'da kullanılabilir DMSO konsantrasyonu %1-10 arasındadır. Fakat %2'den fazla DMSO kullanımı, daha fazla Taq polimeraz gerektirebilir.

DMSO'nun kalıp DNA'nın majör ve minör oyuklarıyla zayıf hidrojen bağları kurarak çift zincirli heliksi destabilize ettiği düşünülmektedir. Bu özellikle GC içeriğinin %60'ın üzerinde olduğu durumlarda faydalıdır. Diğer durumlarda kullanımı non-spesifik bağlanmalara ve yanlış primer bağlanmalarına sebebiyet verdiği rapor edilmiştir. Çünkü, reaksiyonda artan hidrojen bağları sayesinde denatürasyon adımında heliksin ayrılması zorlaşmaktadır. Ayrıca, DNA polimeraz enzimi aktivitesini de olumsuz etkileyip mutasyonlara neden olabileceği öne sürülmüştür (Hardjasa et al., 2010).

#### **1.4.2 Betain**

Betain (N,N,N-trimetilglisin), glisinin 3 metil bağlı analogu olan bir zwitter iyonik amino asittir ve nükleotid kompozisyonuna bağlı olarak DNA erime sıcaklığını düşürür. Özellikle GC içeriği yüksek hedef DNA varlığında tercih edilir. Denatürasyon aşamasında heliksin ayrılmasını kolaylaştırdığı bilinmektedir (M. Musso et al., 2006). Betain genelde DMSO ile birlikte de kullanılabilir. Önerilen konsantrasyonlar 1,0- 1,7 M arasındadır.

#### **1.4.3 Non-iyonik deterjanlar**

Non-iyonik deterjanların fonksiyonu sekonder yapı oluşumlarını engellemek ve DNA polimerazı stabilize etmektir. Bunun yanında, DNA ekstraksiyon protokolü esnasında potansiyel kontaminant olan SDS'in inhibe edici etkisini de önler. Amplikon verimini artırmak için Triton X-100, Tween 20, ya da NP-40 gibi iyonik olmayan deterjanlar, %0,1 ile %1 arasında reaksiyonda kullanılabilir (Varadaraja & Skinneratb, 1994). Fakat %1 ve üzeri konsantrasyonlar PCR'ı inhibe edebilir. Ayrıca, iyonik olmayan deterjan varlığı PCR'ın etkinliğini azaltabilir ve potansiyel spesifik olmayan amplifikasyonlara yol açabilir.

#### **1.4.4 Formamid**

Formamid, DMSO'da olduğu gibi DNA'nın majör ve minör oyuklarıyla hidrojen bağı yaparak DNA çift heliks yapısını destabilize eder, bu sayede DNA

erime sıcaklıklarını düşürür. Önerilen konsantrasyonları % 1-1,5'tur (Saiki & Mcconlogue, 1988).

#### **1.4.5 Tetrametilamonyumklorür (TMAC)**

Tetrametilamonyum klorürün, primer bağlanma sıcaklığını yükselterek hibridizasyon sıcaklığını yükselttiği bilinmektedir (Chevet et al., 1995). Bu sayede spesifik olmayan primer bağlanmaları engellenebilir. Önerilen konsantrasyonları 15-100 mM arasında olmakla birlikte TMAC'ın Taq polimeraz aktivitesi üzerine olumsuz etkileri olduğu rapor edilmiştir (Chevet et al., 1995; Shaik et al., 2008).

#### **1.4.6 Sığır Serum Albumin (BSA)**

Sığır serum albumin, DNA izolasyon aşamasında potansiyel kontaminant olan fenolik bileşenlerin elimine edilmesi ve reaksiyon bileşenlerinin tüp çeperlerine yapışmasını engellenmesi gibi amaçlarla PCR'da kullanılmaktadır. 0,8 mg/mL konsantrasyonlara kadar kullanılabilir (Farell & Alexandre, 2012).

#### **1.4.7 Tek Zincirli DNA Bağlayıcı Protein (SSBP)**

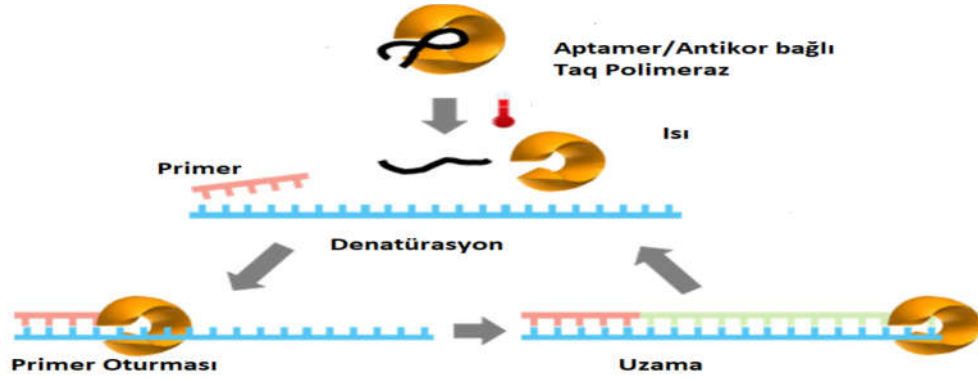
Bir nükleoprotein olan SSBP, denatürasyon aşamasından sonra daha az kararlı hale tek zincirli DNA'yla bağ kurarak sekonder yapıların oluşumunu engeller. Ayrıca çift zincirli heliksi de stabilize ederek PCR verimini artırır (Perales et al., 2003).

#### **1.4.8 Hot-start PCR**

Normal bir PCR prosedüründe reaksiyon kurma aşaması oda koşullarında ya da daha soğuk koşullarda gerçekleştirilir. DNA polimeraz aktivitesinden dolayı primerler DNA'ya non-spesifik bağlanarak non-spesifik ürünler oluşmasına neden olabilir. Ek olarak primer dimer bağlanmaları da gözlenebilir.

'Hot start' PCR'da DNA polimeraz ve magnezyum klorür gibi önemli reaktifler reaksiyondan fiziksel olarak ayrılarak ya da kimyasal modifikasyonlar yoluyla engellenirler. DNA polimeraz enzimi optimum primer bağlanma sıcaklığına kadar reaksiyona eklenmez. AccuStart Taq polimeraz ve Platinum Taq polimeraz, antikorlarla modifiye edilmiş Hot-start PCR'da kullanılan enzimlerdir. Bu enzimler, antikorlarla modifiye edildikleri için ancak optimum bağlanma

sıcaklıklarında antikorlar enzimden ayrıldığı zaman aktivite gösterebilirler. Böylece, spesifik olmayan veya yanlış olan bağlanmaların ve sekonder yapılaşmanın önüne geçilir ( Şekil 1.12) (Lebedev et al., 2008; Stevens et al., 2016).



**Şekil 1. 12** ExcelTaq™ Hot start II DNA polimeraz ve aktivitesi şematik gösterimi (SMOBIO Technology, Inc)

Fiziksel ayırım yönteminde ise Taq polimeraz ve diğer reaksiyon bileşenleri arasına wax boncuklarla ile fiziksel bariyer kurulur. Denatürasyon adımında sıcaklığın artmasıyla wax bariyer aşılar ve amplifikasyon başlar.

Reaksiyona Taq DNA polimerazın geç eklendiği yaklaşımda ise reaksiyon karışımı Taq polimeraz olmaksızın denatürasyon sıcaklığına kadar ısıtılır ve optimum sıcaklığa geldiğinde Taq polimeraz eklenir. Bununla birlikte, bu yaklaşım diğerlerine göre daha az güvenilirdir ve kontaminasyona neden olmaktadır. 3' uçlarında kimyasal olarak dönüşümlü modifiye olan dNTP'ler de sıcaklıkla aktive olmadan Taq polimerazla etkileşime girmezler. Sekonder yapı oluşturmuş primerlerin kullanımı da uygulanan yöntemlerden biridir. Denatürasyon ile lineer yapıya geçen primerler kalıba doğru bir şekilde oturabilir. Timidin fosforamiditlerle keplenmiş primerler UV (365 nm) altında fotokimyasal olarak ayrılabilir ve primer bağlanma sıcaklığında kalıba bağlanabilirler (Lebedev et al., 2008).

Hot-start PCR genelde, başlangıç DNA miktarının az olduğu durumda reaksiyon verimindeki kaybı azaltmak için kullanılır. Primer dimeri, non-spesifik

bağlanmalar ve yanlış bağlanmaları engeller. Ancak, uzun süre ısıya maruz kalan kalıp DNA'nın hasar görmesine neden olur. Yine aynı şekilde düşük sıcaklıklara gereksinim duyan PCR çeşitlerinde kullanıma uygun değildir. Antikor temelli yöntemlerde prosedür için gereken maliyet oldukça yüksektir (Lebedev et al., 2008).

#### **1.4.9 Touch-down PCR**

Touch-down PCR, aynı Hot-start PCR'da olduğu gibi spesifik olmayan baz eşleşmelerini engellemek ve PCR'in spesifikliğini artırmak için tasarlanan PCR uygulamasıdır.

PCR'in ilk döngülerinde, primer bağlanma sıcaklığı yüksek değerlere ayarlanır, daha sonraki aşamalarda kademeli olarak düşürülür. Burada amaç, daha yüksek sıcaklıklarda daha spesifik, daha düşük sıcaklıklarda ise daha az spesifik bağlanma olacağı için, reaksiyon sırasında primer bağlanma sıcaklığının, reaksiyonun spesifikliğini belirlemesidir. İlk döngülerde yüksek spesifiklikte elde edilen ürünlerden daha spesifik ürünler elde edilir. Daha sonraki aşamalarda ise reaksiyon verimini artırmak için sıcaklık düşürülür. Yüksek primer bağlanma sıcaklıklarında, primer ve kalıp arasında çok spesifik baz eşleşmesi gerçekleşir ve bu nedenle ilk amplikon, en spesifik amplikondur. Ardından, ilk döngü amplikonları daha düşük sıcaklıklarda sentezlenecektir. Bu şekilde, yüksek erime sıcaklıklarında üretilen amplikon sayısı, spesifik olmayan dizilerin sayısına kıyasla daha fazla olacaktır. Touch-down PCR, başlangıçtaki döngülerde yüksek primer bağlanma sıcaklıkları kullanarak PCR spesifikliğini ve bu sıcaklıkları kademeli olarak düşürerek PCR verimliliğini artırır. Bu yöntemde, PCR'in sonucunun kalitesi önemli ölçüde artsa da uygulamada zorluklara ve maliyetli ekipmanların kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır (Hecker & Roux, 1996).

#### **1.4.10 Nested PCR**

İki farklı primer setinin kullanıldığı bu yöntemde, iki farklı PCR reaksiyonu gerçekleştirilerek spesifik olmayan bağlanmaların azaltılması hedeflenir. İlk set primerlerle, uzun kalıp DNA'dan içinde hedeflenen bölgenin de olduğu bir gen parçası amplifiye edilir. Ardından bu PCR'dan elde edilen ürün ile hedeflenen gen

bölgesi daha az spesifik olmayan ürün ile amplifiye edilmiş olur (Green & Sambrook, 2019).

Gen dizileme, adli tıp gibi genetik araştırmaların yapıldığı alanlarda bu yöntem kullanışlı olsa da patojen tayini gibi zamanın önemli olduğu alanlarda kullanıma uygun değildir.

#### 1.4.11 Nano-PCR

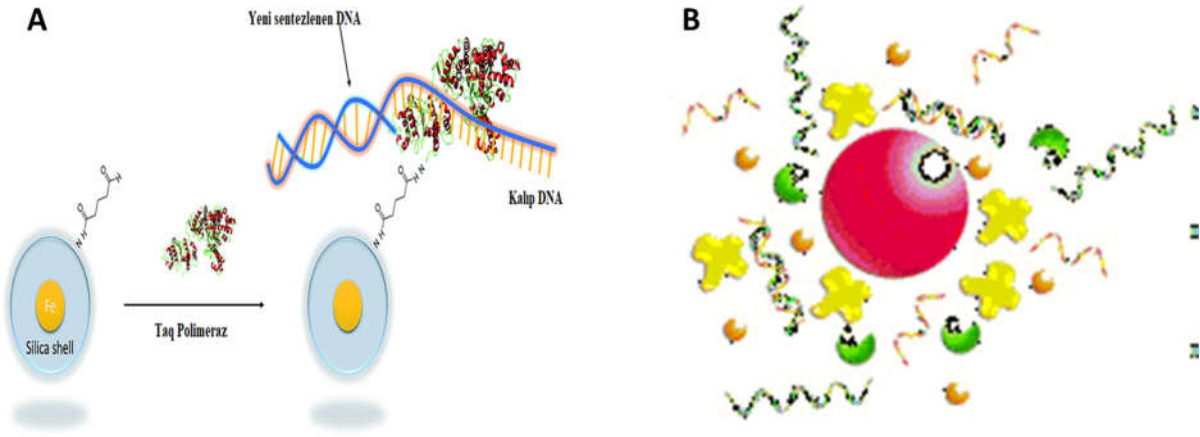
Nanomalzemeler, boyutları 100 nm'den küçük, laboratuvarında kolay ve ucuz bir şekilde, istenilen boyut ve termal özellikte sentezlenebilen nanopartiküllerdir. Termal olarak kararlıdır ve biyoyoumludurlar. Bu özellikleri sayesinde elektronik, hava-uzay, askeri, kimyasal, biyomedikal ve sağlık ürünlerinin geliştirilmesinde sıklıkla kullanılırlar (Ali et al., 2018; Z. Wang et al., 2018).

Son yıllarda nanomalzemelerin biyolojik sistemler üzerine etkilerinin anlaşılması ve biyolojik sistemlere uygulanmasıyla Nano-PCR isimli yeni bir PCR tekniği ortaya çıkmıştır. Nano-PCR tekniğinde nanopartiküller, başlıca enzim, primer ve kalıp içeren reaksiyon sistemine eklenir. Bu sayede nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerini kullanarak PCR'da karşılaşılan spesifiklik, hassasiyet ve verimlilik gibi performans kriterlerini geliştirmek amaçlanır (Yang et al., 2022).

Nanopartiküller, PCR'da ilk kez Li ve ark. tarafından 2005 yılında çok döngülü (multi round) PCR ve multipleks PCR gibi spesifikliğin diğer PCR çeşitlerine kıyasla daha kritik olduğu reaksiyon tiplerinde etkisinin gözlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Bu amaçla, 283 baz çifti uzunluğundaki lambda-DNA'sını çift döngülü PCR'la 35 döngüde amplifiye eden model sistemi geliştirmişlerdir. Çift döngülü PCR'da spesifik olmayan ürünlerin oluşmasının daha çok gözlenmesi hipotezinden yola çıkılarak tasarladıkları sisteme, 10 nm boyutlarda ve 0,2 nM-1,0 nM değişen konsantrasyonlarda altın nanopartiküller eklemiştir. Elde ettikleri sonuca göre 0,4 nM AuNP kullanıldığında spesifik olmayan ürün oluşumunun azaldığını ve 25 °C gibi düşük sıcaklıklarda bile primer bağlanmasının gerçekleştiğini rapor etmişlerdir (H. Li et al., 2005). Li ve arkadaşlarının yaptığı bu öncü çalışma sonrasında aynı yıl ve ilerleyen yıllarda nanopartiküllerin PCR üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar giderek artmıştır.

Altın nanopartiküle ek olarak, gümüş nanopartikül gibi diğer metal nanopartiküllerin, grafen oksit ve karbon nanopartiküller gibi karbon temelli nanopartiküllerin, çinko oksit, titanyum dioksit, magnetit, magnezyum oksit ve silisyum oksit gibi oksitlenebilen nanopartiküllerin, kuantum noktalar ve upconversion (UC) nanopartiküller gibi floresan nanopartiküllerin PCR verimi üzerine olumlu etkileri rapor edilmiştir (Abdul Khaliq et al., 2010; D. Cui et al., 2004; Kambli & Kelkar-Mane, 2016a, 2016b; R et al., 2012; Vu et al., 2008; Yang et al., 2022; Zhang et al., 2008). Buna ek olarak metal-organik yapılar ve yukarıda bahsedilen nanopartiküllerin kombinasyonlarının da test edildiği çalışmalar yapılmıştır.

Nanopartiküllerin PCR üzerine olumlu etkisinin araştırılmasının yanı sıra bazı çalışmalar nanopartiküllerin reaksiyon etki mekanizmasını aydınlatmaya yönelmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen bulgular olası dört farklı mekanizmayı ortaya koymuştur. Bu mekanizmaların kullanılan nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri ile ilişkili olduğu ve reaksiyon verimini farklı açılardan etkiledikleri bildirilmiştir. Buna göre; 1) AuNP, GO, CNP gibi iyi termal iletkenliğe sahip nanopartiküllerin prosesi hızlandırıp reaksiyon süresini kısaltarak PCR verimini artırdığını, 2) QD's, CNP's, magnetit, polimer modifiye silika gibi yüzeyleri Van der Waals etkileşimine elverişli olan nanopartiküllerin reaksiyon bileşenleri ile etkileşime girerek ya da polimeraz için bağlanma bölgesi sağlayıp aktivitesini düzenleyerek PCR spesifikliğini artırdığını (Şekil 1.13a), 3) polimer modifiye altın nanopartikül, GO, CNT's, amin-ZnO gibi pozitif yüke sahip nanopartiküllerin yüzeylerinde adsorbladıkları negatif yüklü nükleik asit zincirleri ile etkileşime girerek PCR spesifikliğini artırdığını (Şekil 1.13b), bazı nanopartiküllerin katalitik aktivite ya da tek iplikli DNA'yı seçici olarak bağlayan tek iplikli DNA bağlayıcı protein (SSBP) gibi davranarak reaksiyon verimini artırdığı rapor edilmiştir (Yang et al., 2022).



**Şekil 1. 13** A) Nanopartiküllerin polimeraz ile etkileşime girerek polimerazın aktivitesini düzenlemesi B) Altın nanopartiküllerin güçlü adsorban özellikleri ile PCR bileşenlerini yüzeyinde düzenlemesi (Yang et al., 2022; modifiye edilmiştir).

Ali ve arkadaşları, tüm bu mekanizmaların birlikte çalışmasının da mümkün olabileceğini savunmuş ve bunu aşağıdaki örnekle açıklamışlardır. PCR başlamadan önce nanopartiküller DNA polimeraz, magnezyum iyonları, primerler ve çift iplikli DNA zincirleriyle etkileşim kurarlar. Bu sayede reaksiyon ‘hot-start’ etkisi gibi bir şekilde durdurulmuş olur. PCR başladığında, nanopartiküller termal iletkenlik özellikleriyle ısı yayılımını hızlandırırlar ve PCR’ın ilk adımında DNA’nın hızlıca denatüre olmasını sağlarlar ve DNA denatüre olduğunda nanopartiküller tek iplikli DNA bağlayıcı protein gibi davranarak renatürasyonu engellemek için yüzeyinde adsorblar. Primer bağlanması aşamasında, nanopartiküllerin yeniden PCR komponentlerini adsorbe ederek yüzeyde kondanse olmasını sağlar. Böylece reaktifler etkileşimde bulunarak primer bağlanması kolaylaşır. Son uzama evresinde reaksiyondaki ısının nanopartiküller sayesinde hızlı bir şekilde azalması sağlanmış olur (Ali et al., 2018).

Henüz yeni bir teknik olduğu için bugüne kadar yapılmış nano-PCR çalışmalarının birçoğu reaksiyon mekanizmasını anlama ve nanopartiküllerin PCR üzerindeki etkilerini araştırmaya yönelik olmuştur. Buna ek olarak nano-PCR, spesifikliğin ve hassasiyetin oldukça önemli ve problematik olduğu mikrobiyolojik tanı alanında da çeşitli uygulama alanları bulmuştur.

Enfeksiyonel hastalıklarda sıklıkla karşılaşılan bakteri ve virüs türleri için nano-PCR uygulamaları geliştirilmiş ve kullanılan nanopartiküllerle reaksiyon hassasiyet ve spesifikliğin anlamlı derecede arttığı rapor edilmiştir (Tablo 1.3). Genellikle altın nanopartikül ve formlarının yaygın olarak test edildiği mikrobiyal tanı için geliştirilen sistemlerde ticari olarak satın alınan ya da Turkevich yöntemi gibi sentetik yollarla sentezlenen altın nanopartiküller kullanılmaktadır (Yang et al., 2022). Yapılan çalışmalarda artan PCR verimi için, optimum altın nanopartikül konsantrasyonu 0,1 ile 50,0 nM arasında geniş aralıkta değişmekte olup etkin nanopartikül boyutları ise 5 nm ile 60 nm arasında değişmektedir (Y. Cui et al., 2014; Liu et al., 2019; Qin et al., 2021; Upadhyay et al., 2020; J. Wang et al., 2015; M. Wang et al., 2019; X. Wang et al., 2014; Xue et al., 2021; Yang et al., 2022; Yuan et al., 2016; Zhu et al., 2017).

**Tablo 1.3** Mikrobiyal tanı nano-PCR (Yang et al., 2022, modifiye edilmiştir.).

Kategori	Tanı	Kullanılan nanopartikül ve etkisi
Bakteri tanısı	<i>Salmonella typhi</i> tür belirleme	Azalan non-spesifik ürün ve artan PCR verimi (0,248 nM AuNP(15-20 nm) ve 0,068 nM AgNP (10-16 nm); PCR inhibisyonu (25-30 nm Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ) (Rehman et al., 2015)
	Bakteriyel aerosol ( <i>E.coli</i> ve <i>B.subtilis</i> )	0,9 nM AgNP, 0,6 nM TiO <sub>2</sub> NP ve ikili kombinasyonu (Xu & Yao, 2013)
	Beyin yiyen amip tayini	PCR veriminde artış; <i>Acanthamoeba</i> spp., için 0,4 µg/ml GO, 0,04 µg/ml CoO, 0,4 µg/ml Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , <i>Balamuthia mandrillaris</i> için her birinden 0,4 µg/ml, <i>Naegleria fowleri</i> için 0,04 µg/ml GO, 4,0 µg/ml CuO, 0,04 µg/ml Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Gabriel et al., 2018)
Virüs tanısı	Domuz parvovirüsü	(1-100 nm) katı nanopartikül ile 100 kat artan hassasiyet (X. Wang et al., 2014)
	Vizon enterit Virüsü	Artan hassasiyet, NP tipi bilinmiyor (J. Wang et al., 2015)
	Yalancı uyuz virüsü ve domuz bocavirüsü	Katı kolloidal AuNP (1–100 nm) ile 100- 1000 kat artan PCR hassasiyeti ve spesifikliği (Luo et al., 2015)

	At Herpes virüsü (EHV-1)	1,0 nM AuNP (15 nm) ile artan PCR verimi (hassasiyet) (El-Husseini et al., 2016)
	Ensefalomyokardit virüsü	Katı kolloidal AuNP (1–100 nm) ile 100 kat artan PCR hassasiyeti ve spesifikliği (Yuan et al., 2016)
	Domuz epidemik ishal virüsü	Katı kolloidal AuNP (1–100 nm) ile 100 kat artan PCR hassasiyeti ve spesifikliği (Yuan et al., 2015)
	Domuz epidemik ishal virüsü ve bulaşıcı gastroenterit virüsü	Katı Au NP (1–100 nm) ile artan PCR hassasiyeti (Zhu et al., 2017)
	Sığır solunum sinsityal virüsü	AuNP (23 nm) ile artan PCR hassasiyeti (Liu et al., 2019)
	Sığır Rotavirüsü, Sığır Parvovirüsü ve Sığır Viral ishal Virüsü	0,5 µL hacimde 10 nM AuNP (10 nm) ile artan PCR hassasiyeti ve spesifikliği (M. Wang et al., 2019)
	HPV-16 ve HPV-18 DNA	Katı AuNP (1–100 nm) ile artan PCR hassasiyeti (X. Ma et al., 2020)
	Köpek vektör kaynaklı patojenler	ZnO (1–2) µm nanoçiçek ile reaksiyon süresinin kısalması artan hassasiyet ve spesifiklik (Upadhyay et al., 2020)
	Köpek Koronavirüs-1 ve -2	Katı kolloidal AuNP (1–100 nm) ile 100 kat artan PCR hassasiyeti ve spesifikliği (Qin et al., 2021)
	Kaz Parvovirüsü	AuNP ile 100 kat artan PCR hassasiyeti ve spesifikliği (H. Ma et al., 2022)
	Kedi kalisivirüs, kedi panlösemi sendromu virüsü, kedi herpesvirüsü tip-1	AuNP (60 nm) ile 10-100 kat artan PCR hassasiyeti ve spesifikliği (Ye et al., 2022)
	Japon ensefalit virüsü	1,6 ve 3,2 nM AuNP (13.2 ± 2.4 nm) ile artan PCR hassasiyeti (13.2 ± 2.4 nm) (Huang et al., 2008)
<b>Tümör tanısı</b>	Tek baz mutasyonu ile tümör izleme	50 nM AuNP (14.33±0.04 nm) ile artan PCR hassasiyeti ve spesifikliği (Xue et al., 2021)
	Yumurtalık kanseri tanısı için miRNA tayini	9,71 µg/ml GO ile artan PCR hassasiyeti ve spesifikliği (Hu et al., 2021)

Daha etkin bir PCR için optimum nanopartikül özellikleri, nanopartikülün toplam yüzey alanı, yüzey yükü gibi özelliklerine bağlı olmasının yanı sıra Taq polimeraz enzimi, kalıp DNA ve son ürün boyutu gibi PCR bileşen ve ürünlerin özellikleriyle değiştiği belirtilmiştir (Ali et al., 2018; Lin et al., 2009; Vu et al., 2008; Yang et al., 2022).

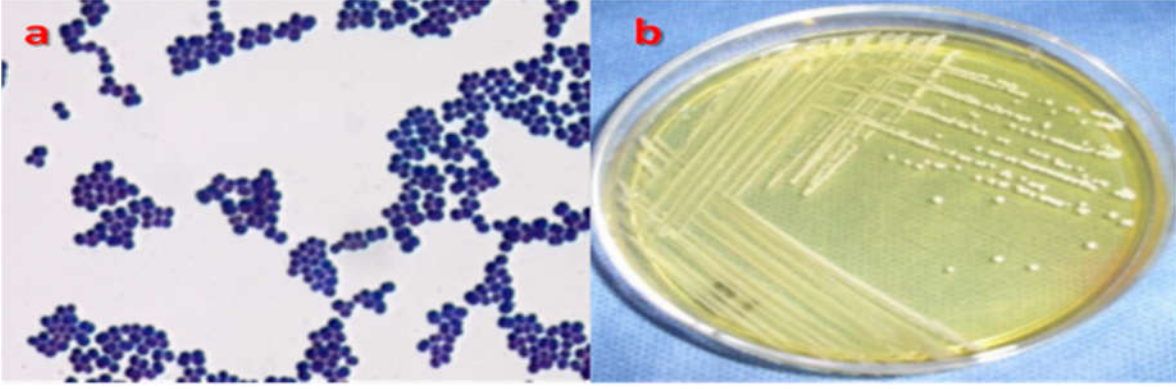
Nanopartiküllerin termal döngü koşulları, reaksiyon verimi ve komponentleri üzerine etkisi düşünüldüğünde, bu partiküllerin patojen tayini için geliştirilen PCR'da kullanımı karşılaşılan problemleri ve eksiklikleri aşmak için ucuz ve evrensel bir yöntem olma potansiyeli taşıdığı belirtilmektedir. DMSO, betain, tek zincirli DNA bağlayıcı protein gibi organik moleküllerin kullanımı PCR spesifikliğı üzerinde etkili olsa da DNA polimeraz aktivitesi üzerinde olumsuz etkileri gözlenmiştir. Touch-down PCR, Nested PCR ve Hot start gibi yaklaşımlar özellikle patojen tayini gibi hızın da oldukça önemli olduğu bir alan da yetersiz ve zaman alıcıdır.

## **1.5 Mikroorganizmalar**

### **1.5.1 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538**

*S. aureus* (*Sa*), yuvarlak şekilli, üzüm şekli gibi kümeleşen gram pozitif bakteridir (Şekil 1.14 a). Kolonileri, %10 tuz içeren ortamlarda morfolojik olarak sarı ya da altın renkli olarak gözlenebilmektedir (Şekil 1.14 b). 18°C-40°C aralığında aerobik veya anaerobik olarak büyüeyebilirler.

Metisilin dirençli olan türleri de dahil olmak üzere *Staphylococcus* türleri insan derisi, mukozal membranlar gibi yüzeylerde bulunurlar. Özellikle sağlık personelleri, diyabet gibi hastalıklarda düzenli olarak iğne kullanan hastalar, yatalak hastalar, immün yetersiz hastalarda daha yüksek oranlarda görülmektedir.



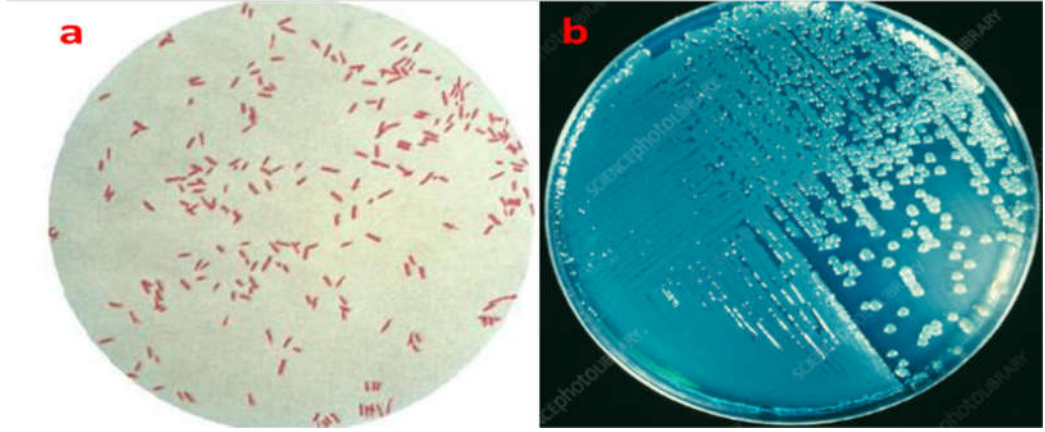
**Şekil 1. 14** *Staphylococcus aureus* a) mikroskop altındaki görüntüsü (Gram boyama) b) kolonilerin katı besiyerinde morfolojik görüntüsü (Kamel, 2021).

### 1.5.2 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

*Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*), enkapsüle, gram negatif (Şekil 1.15 a), areobik, çubuk şekilli hayvanlarda, insanlarda ve bitkilerde hastalığa sebep olan bir bakteridir. Laboratuvar kültürleri genellikle mavi ve yeşil renktedir (Şekil 1.15 b). Toprak, su, insan, hayvan bitki ve hastaneler gibi ortamlardan sıklıkla izole edilirler.

Birçok ilaca karşı dirençli olan bu patojenler, çeşitli ventilatör kaynaklı ve sepsis sendromları gibi nazokomiyal enfeksiyonlara sebep olmaları ve antibiyotik dirençleri ile bilinirler.

Kistik fibrozis, kanser ve AIDS gibi immün bağışıklığı düşmüş hastalara fırsatçı patojen olarak yerleşirler ve özellikle solunum yolu, yanık ve yaralarda, idrar yolunda enfeksiyonlarına neden olurlar.

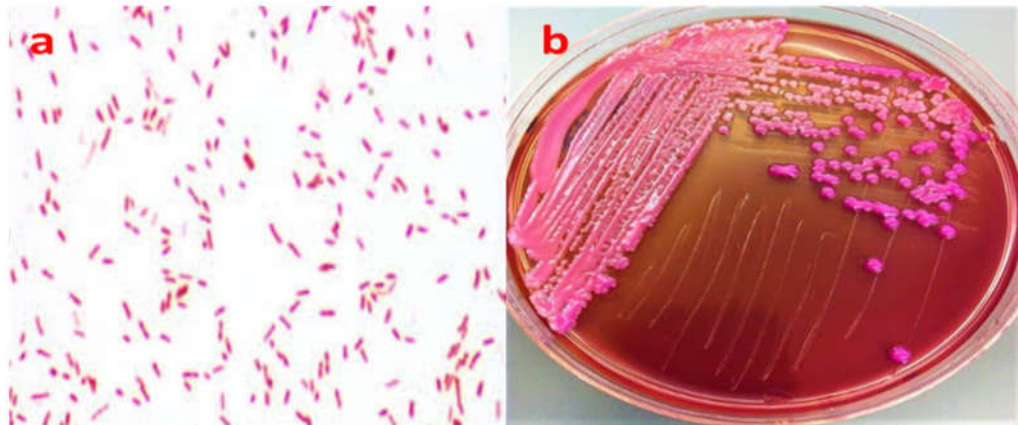


**Şekil 1. 15** *Pseudomonas aeruginosa* a) mikroskop altındaki görüntüsü (Gram boyama) b) kolonilerin katı besiyerinde morfolojik görüntüsü (Kamel, 2021).

### 1.5.3 *Klebsiella pneumoniae* BAA-2473

*K. pneumoniae* (Kp), gram negatif, hareketsiz, laktoz fermente edebilen çubuk şekilli bir bakteri türüdür (Şekil 1.16 a ve Şekil 1.16 b).

Toprakta doğal olarak oluşur ve tüm türlerin %30'u azot döngüsünde bulunur. İnsanların ağız, deri, bağırsak gibi normal florasında bulunmasına rağmen solunduğunda yıkıcı etkileri olabilen bir patojendir. Diyabet, alkolizm, karaciğer hastalıkları, böbrek yetmezliği gibi bağışıklığı düşmüş hastalarda sıklıkla karşılaşılır ve nazokomiyal kaynaklı oldukları bildirilir. Pnomöninin yanı sıra, idrar yolunda, safra kesesi ve ameliyat yaralarında enfeksiyona neden olurlar.

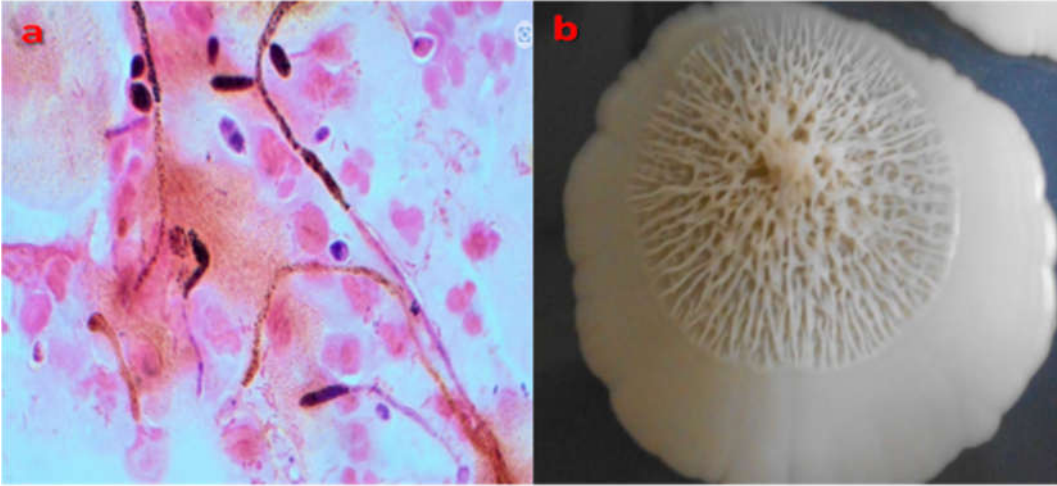


**Şekil 1. 16** *Klebsiella pneumoniae* a) mikroskop altındaki görüntüsü (Gram boyama) b) kolonilerin MacConkey (laktoz fermente edebilen bakteriler için seçici besiyeri) agar morfolojik görüntüsü (Kamel, 2021).

#### 1.5.4 *Candida albicans* CNM-CL 8701

Normal insan boğaz florasında bulunan ve fırsatçı bir maya olan *C. albicans* (*Ca*) türleri insan vücudu dışında da bulunabilirler. Fungal patojenler için kullanılan model organizmalar olarak kullanılan bu türler, flamentöz ve maya gibi büyüdükleri için dimorfik mantarlar olarak tanınırlar. Morfolojik olarak, opaktırlar ve pseudohifler (yalancı hifler) oluştururlar (Şekil 1.17 b). Gram boyama ile incelendiğinde mor renklidirler (Şekil 1.17a ).

Özellikle HIV gibi bağışıklığı düşmüş ve baskılanmış hastalarda patojen olarak rol oynarlar. Kalıcı olarak implante edilmiş medikal cihazlarda ve insan dokularında biofilm oluşturarak *candidiasis* olarak adlandırılan enfeksiyonlara neden olurlar. Kan beyin bariyerini de geçebildikleri için *sistemik candidiasis* hastalarında ölüm oranlarının %40'larda olduğu bilinmektedir. Kadınların %75'inde vulvovajinal enfeksiyonlara sebep olurlar. AIDS ve kanser gibi hastalıklarda, organ nakli geçirmiş hastalarda biofilm oluşumuna neden olurlar.



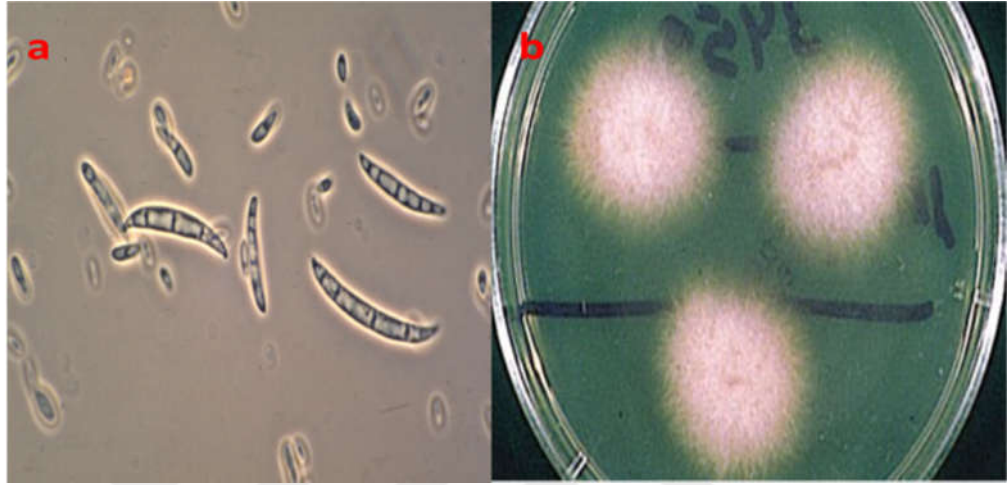
**Şekil 1. 17** *Candida albicans* a) hiflerinin ve 2-4  $\mu$ M boyutlardaki chlamydosporlarının mikroskop altındaki görüntüsü (Gram boyama) b) kolonilerin katı besiyerindeki morfolojik görüntüsü (Beards, 2021).

#### 1.5.5 *Fusarium oxysporum* CNM-CM 3197

Flamentöz fungal insan patojenlerinden olan *F. oxysporum* türleri, hastanelerde kliniklerde bulunurlar. Bu şekilde organ nakli geçirmiş, AIDS,

kanser tedavisi gören hastalar gibi immün sistemi baskılanmış hastaları etkilerler. Ayrıca açık yaralardan ve yanıklardan izole edilen türler vardır.

Mikroskop altında çok hücreli ve orak şeklinde (Şekil 1.18 a) tanımlanan *F. oxysporum* (*Fo*) türleri, katı seçici (saboroud dekstroz agar, SDA, SBA) besiyerlerinde pembe veya mor pigment oluştururlar (Şekil 1.18 b).

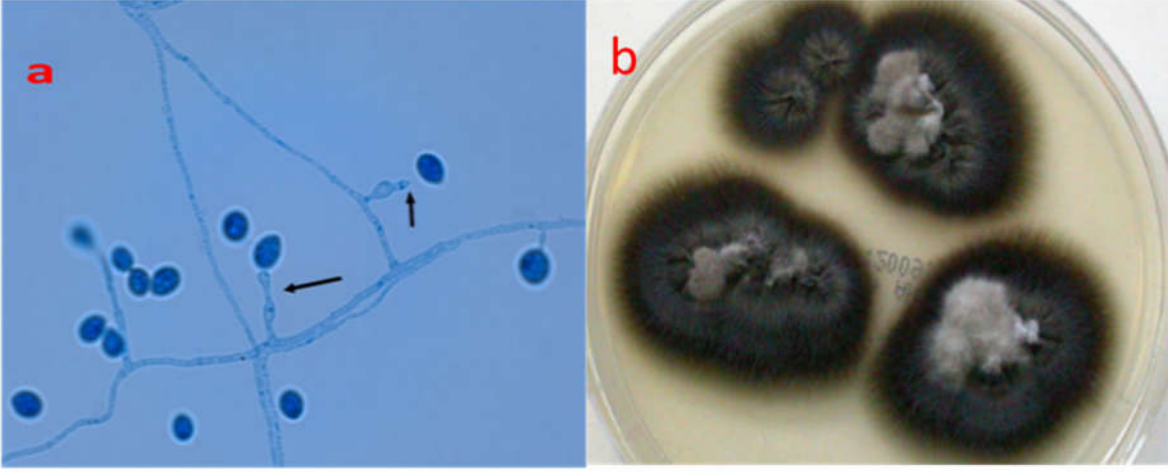


**Şekil 1. 18** *Fusarium oxysporum* a) mikroskop altındaki görüntüsü b) kolonilerin katı besiyerindeki morfolojik görüntüsü (Microbewiki, 2011).

### 1.5.6 *Scedosporum (Lemontospora) prolificans* CNM-CM 1627

Klinik bulgular sıklıkla *S. prolificans* türleriyle karşılaşılmasına rağmen bu türlerin keşif tarihleri 1984'tür. Özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda çoğu ölümcül olan "Scedosporiosis" olarak adlandırılan enfeksiyonlara neden olurlar. Ayrıca, birçok antifungal terapiye de dirençli olmaları ile bilinirler.

*S. prolificans* türleri bu türe özgü belirgin bir boğum şekline sahip ve yakından ilişkili türlerde bulunmayan küçük, hassas annellidler üretirler (Şekil 2.6 a). Katı besiyerinde kahverengimsi yeşil, örümcek ağı şeklinde oluşmuş misel olarak görünürler (Şekil 2.6 b).



**Şekil 1. 19** *Scedosporum prolificans* a) annelidlerin mikroskop altındaki görüntüsü b) kolonilerin katı besiyerindeki morfolojik görüntüsü (Ellis, 2022).

## 2. MATERYAL

### 2.1 Kalıp DNA

Bu çalışmada, PCR yöntemi geliştirmek için kalıp ya da model DNA olarak, bölüm 2.1’de tanıtilan ve hastane kaynaklı enfeksiyonlarda en sık karşılaşılan mikroorganizmaların genomik DNA’ları kullanıldı. Genomik DNA eldesi Bölüm 3.2’de detaylandırıldı.

### 2.2 Primerler ve dNTP Setleri

Bu çalışmada kullanılan primer setleri, Sentegen Biyoteknoloji firması (Ankara) tarafından sentezlendi. Primer dizi ve uzunlukları tablo 2.1’de belirtildiği gibidir. Saflaştırma olarak tuzsuzlaştırma işlemi seçildi ve 50 nmol ölçeğinde temin edildi.

**Tablo 2. 1** PCR’da kullanılan primer setleri.

Organizma	Primer adı	Tür spesifik primerler (5'-3')	Uzunluk (bp)
<i>Candida albicans</i>	CaF	AAGTATTTGGGAGAAGGGAAAGGG'	24
	CaR	AAAATGGGCATTAAGGAAAAGAGC	24
<i>Fusarium oxysporum</i>	FoF	ACATACCACTTGTTGCCTCG	20
	FoR	CGCCAATCAATTTGAGGAACG	21
<i>Scedosporum prolificans</i>	SpF	GCTACTACCGATTGAATGGCTC	22
	SpR	GAATAGAGGGTTTGACGGCTG	21
<i>Staphylococcus aureus</i>	SaF	CATACAGCACCAGGTCACGGGGAA-	24
	SaR	GTTCTCCAGTCGTGTGGATAGC	22
<i>Pseudomonas aureoginosa</i>	PaF	ATGGAAATGCTGAAATTCGGC	21
	PaR	CTTCTTCAGCTCGACGCGACG	21
	*PaF'	ATGGAAATGCTGAAATTCGGCAAATT TGCTGC	32
	*PaR'	CTTCTTCAGCTCGACGCGACGGTTCT	29

		GAG	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KpF	ATTTGAAGAGGTTGCAAACGAT	22
	KpR	TTCACCTCTGAAGTTTCTTGTGTT	25
<p><b>Not:</b> *PaF, *PaR;  <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  organizmasını tayin etmek için  kullanılan ileri ve geri  primerler, spesifikliğin  artırılması amacıyla  uzatılmıştır.</p>			

Deoxynükleozidtrifosfat (dNTP) set olarak dATP, dGTP, dCTP, dTTP 200 µM stok çözeltileri kullanıldı.

### 2.3 Taq Polimeraz, PCR Tamponu

ThermoFisher 500 Unit Taq polimeraz (EP0402) enzimi 10X Amonyum sülfatlı Taq tamponu ile kullanıldı.

### 2.4 MgCl<sub>2</sub> ve Su

ThermoFisher 25 mM magnezyum klorür çözeltisi kullanıldı. Reaksiyonda miliQ saflığında su kullanıldı ve PCR uygulamalarında kullanılmak için 0,22 µM boyutta şırınga ucu filtre kullanılarak filtreden geçirildi.

### 2.5 Nanopartiküller

10 mM PBS tamponundaki 10 nm altın nanopartikül (25 mL) Sigma Aldrich'ten (752584) satın alındı. Kolloid AuNP'lerin moleküler kütlesi ve parçacık sayısı sırasıyla  $10^{-17}$  g ve  $6 \times 10^{12}$  parçacık/mL olarak kabul edildi. Tüm altın nanopartikül dilüsyonları 0,1 M PBS (80 g NaCl, 2.0 g KCl, 21.7 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 2.59 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, yüzey aktif madde içermeyen tampon) ile hazırlandı.

## 2.6 Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

Çalışmaların tamamında kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır. Kimyasalların temin edildiği firmalar ve çalışmalarda sıklıkla kullanılan çözeltiler aşağıda listelenmektedir:

- ✓ Gliserol (Merck) %80 oranında steril d.H<sub>2</sub>O (distile su) ile seyreltilerek kullanıldı.
- ✓ EDTA (Merck): 0,5 M EDTA pH: 8’de hazırlanılarak kullanıldı.
- ✓ Tris,
- ✓ Borik asit,
- ✓ Hidroklorik asit (Sigma),
- ✓ Agaroz,
- ✓ Potasyum klorür,
- ✓ Sodyum klorür,
- ✓ Sodyum dihidrojen fosfat,
- ✓ Disodyum hidrojen fosfat,
- ✓ Potasyum dihidrojen fosfat,
- ✓ Etil alkol,
- ✓ EtBr (Suda %10’luk çözeltisi kullanılmıştır).
- ✓ 6x Loading boyası
- ✓ GeneJET “*Genomic DNA purification kit*”
- ✓ Whole genome amplification kit (Nanohelix),
- ✓ Gene ruler expression DNA marker
- ✓ Tripton,
- ✓ Maya ekstraktı,
- ✓ Nutrient broth,
- ✓ Patates dekstroaz agar

## 2.7 Ekipmanlar

Bu çalışmada kullanılan genel laboratuvar cihazları ve diğer ekipmanlar aşağıda listelenmiştir:

- ✓ UV Kabin (ESCO Class II BSC),

- ✓ Otoklav (HIYARAMA HVE 50),
- ✓ Biorad T-100 Termal Döngü Cihazı,
- ✓ Yatay elektroforez sistemi (Thermo OWL EASYCASTTM B2)
- ✓ Güç kaynağı (Thermofisher),
- ✓ BioTek Epoch 2
- ✓ UV transillüminatör,
- ✓ Mini Santrifüj,
- ✓ pH metre (HANNA pH 211),
- ✓ Isıtıcıli manyetik karıştırıcı,
- ✓ Termal blok ısıtıcı,
- ✓ Analitik terazi (AND GR 200)
- ✓ Vorteks (WhirliMixer TM)
- ✓ Pipet (1-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL)
- ✓ Pipet ucu (1-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL)
- ✓ Steril öze,
- ✓ Drigalski çubuğu,
- ✓ Neşter,
- ✓ Ependorf tüpü (2 ml),
- ✓ Falkon tüpü (50 ml),
- ✓ PCR tüpü, 0,2 ml, düz kapaklı,
- ✓ Otoklav şişesi 500 ml, 1000 ml,
- ✓ Plastik petri kabı 90 mm x15 mm,
- ✓ Erlen, beher, balonjoje, mezür, spatül,
- ✓ Otoklav bandı,

### 3. YÖNTEM

#### 3.1 Sterilizasyon, Aseptik Koşulların Sağlanması Ve Saklama Koşulları

PCR'da tanısı yapılacak mikroorganizmaların yeterli sayıda büyümelerini sağlayacak büyüme ortamları ve çalışmada kullanılmak üzere hazırlanan tampon çözeltiler, pipet uçları kullanılmadan önce 20 dk, 121 °C, 1,5 atm'de otoklavlanarak steril hale getirildi ve plastik ve cam malzemeler etüvde kurutuldu. Çözeltiler, 0,22 mikron steril membran filtre kullanılarak filtreden geçirildi. Tüm hücre ekimi, seyreltme ve reaksiyon kurma işlemleri biyogüvenlik kabini (CLASS II) içerisinde gerçekleştirildi. Biyogüvenlik kabini yüzeyi, otomatik pipetler gibi malzemelerin dış yüzeyleri %70'lik etil alkol ile steril edildi. Neşter, drigalski gibi cam veya metal malzemeler %70'lik alkol ve ardından bek alevi kullanılarak sterilize edildi. Kişisel koruyucu ekipman olarak nitril eldiven ve beyaz laboratuvar önlüğü kullanıldı. Agaroz jel elektroforezi yalnızca 'EtBr kontamine' alanda gerçekleştirildi ve bu alandaki tüm ekipmanlar ve atıklar diğer alanlardakinden ayrıldı. Kullanılmış hücre materyalleri ve hücre ile temas eden tüm ekipmanlar, 20 dk, 121 °C, 1,5 atm'de otoklavlanarak atıldı ya da otoklav sonrası temizlendi. Nükleik asit temelli tüm malzemelerin stok çözeltileri -20°C'de dondurularak, deneyde aynı gün kullanılacak olanlar ise +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi. Bakteri hücreleri -80°C'de gliserol stoklarında, *C. albicans* ve *F. oxysporum* hücreleri +4°C'de agar alt kültürlerinde saklandı. PCR komponentleri (Taq polimeraz enzimi, magnezyum klorür, dNTP stokları ve PCR kalite su -20 °C'de, aynı gün çalışılacaksa porsiyonlanmış solüsyonları +4°C'de muhafaza edildi. EtBr, TE tamponu, steril agar besiyerleri +4°C'de, TBE tamponu ve kitler oda sıcaklığında muhafaza edildi.

#### 3.2 Kalıp DNA Eldesi

Morfolojik olarak beklenen özellikleri gösterene kadar kültive edilen bakteriyel ve fungal hücrelerin diğer hücre materyallerinden ayrılması için genomik DNA izolasyonları yapıldı. Genomik DNA izolasyonu için izlenecek adımlar ilgili hücrelerin morfolojik özellikleri gözetilerek (hücre çeperi varlığı, bakteriler için gram özelliği gibi) belirlendi. Elde edilen genomik DNA'ların TE

tamponu içerisindeki solüsyonları, saflık ve miktar kontrolleri yapıldıktan sonra polimeraz zincir reaksiyonu için kalıp olarak kullanıldı.

### 3.2.1 Bakteriyel Genomik DNA Eldesi

*S. aureus* hücreleri ve *K. pneumoniae* hücreleri -80 °C gliserol stoklarından Nutrient Broth (kullanıma hazır, toz formda, reçetesine uygun olarak 25 mL hacimde hazırlandı) ortamına %2 oranında ekildi ve 37°C'de 175 rpm 'de gece boyu kültivasyona bırakıldı. *P. auroginosa* hücreleri -80 °C gliserol stoklarından LB (Peptone 10 g/L, maya ekstraktı 5 g/L, NaCl 10 g/L) ortamına %2 oranında ekildi ve 28 °C'de 165 rpm'de gece boyu kültivasyona bırakıldı. Bakteriyel suşlar Thermo Scientific™ firmasından temin edilen 'GeneJET genomic DNA purification kit' kullanılarak gram pozitif ve gram negatif ayrımı gözetilerek saflaştırıldı.

### 3.2.2 Fungal Genomik DNA Eldesi

Agar alt kültürü olan *C. albicans* hücreleri 37°C'de PDA (Potato Dextrose Agar)'a seyreltme plaka tekniğiyle ekildi ve 24 saat 37°C 'de statik olarak kültive edildi. Agar alt kültürü olan *F. oxysporum* hücreleri petriden yaklaşık 1-1,5 cm<sup>2</sup> kapsayacak şekilde steril neşter ile kesilerek SDA (Sabaroud Dextrose Agar)'ya inoküle edildi ve 26°C'de 3 gün statik olarak kültive edildi. Daha sonra hücreler aynı besiyerlerinde ve sıcaklıklarda *C. albicans* için 24 saat ve *F. oxysporum* için 14 gün olmak üzere yeniden kültive edildi. Fungal hücrelerin genetik materyali, kimyasal ve mekanik parçalamayı temel alan manuel yöntem kullanılarak saflaştırıldı (Aamir, 2015; modifiye edilmiştir).

- Petride büyütülen *C. albicans* hücrelerinden ependorf tüplerine steril ortamda öze ucuyla hücre (0,1-1,0 mg) alındı. *F. oxysporum* hücreleri petriden yaklaşık 1-1,5 cm<sup>2</sup> kapsayacak şekilde steril neşter ile kesilerek falkon tüplere alındı (mümkün olduğunca besiyeri alınmadı veya uzaklaştırıldı).
- Hücreler 400 µL liziz tamponu ile (% 2Triton X-100, %1 SDS, 200 mM NaOH, 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA) süspanse edildi.

- Örnekler, 65 °C'de 30 dk inkübe edildi ve ardından 13000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi.
- Supernatant dekante edildi. Pellete eşit hacimde fenol: kloroform: izoamil alkol (25:24:1) eklendi. Örnekler, 13000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi.
- Supernatant dekante edildi. Bir önceki adım tekrar edildi. Pellete 50 µL izopropil alkol eklendi ve örnekler -20 °C'de 1-2 saat inkübe edildi.
- Örnekler çözündürüldükten sonra 13000 rpm'de 15 dk santrifüjlendi ve pellet 800 µL %70'lik etanol'de çözüldü. Numunelerden alkol evapore edilerek uzaklaştırıldı ve geriye kalan DNA örneği 200 µL TE tamponunda çözüldü.

### 3.2.3 Genom Amplifikasyonu

Fungal genomik DNA'ların miktarlarının artırılması için "whole genome amplification kit" kullanıldı. Bu kısımda kullanılan genomik DNA'lar Instituto de Salud Carlos 'dan III Dr. Maria José Buitrago Serna tarafından hediye edilmiştir.

### 3.3 Kalıp DNA'ların Kontrolü

Manuel ve kit yöntemi ile izole edilen DNA'ların saflık ve miktar kontrolleri Biotek cihazı ve agaroz jel elektroforezi olmak üzere iki ayrı yöntemle test edildi.

Agaroz jel elektroforezinde %1'lik Agaroz ve yürütme tamponu olarak TBE (Tris-Borik asit-EDTA) kullanıldı. DNA görüntülemek için jel hazırlama aşamasında son konsantrasyon %1 olacak şekilde EtBr eklendi. 6x yürütme boyası (son konsantrasyon 1x olacak şekilde) ve Gene Ruler Expression DNA marker varlığında jele yüklenen DNA numuneleri, 120 mV'de 60 dk boyunca elektroforezlendi. Elektroforez sonrası jel, 254 nm'de UV transilluminatör ile görüntülendi. Sonuçlar kaydedildi. BioTek Epoch 2 multiplaka okuyucu ile analizde, saflaştırılan DNA'ların TE Solüsyonları direk olarak spektrofotometrik olarak analizlendi.

### 3.4 Primer seçimi ve homoloji analizleri

PCR reaksiyonunda kullanılacak primer setleri seçilen mikroorganizmaların genomlarında nesiller boyu korunan gen bölgeleri arasından ve PCR sonrası

elektroforezde birbiri yanında analize imkan sağlayacak büyüklükte seçildi. Oligonükleotitlerin uzunluklarının 10-30 bp arasında, %GC içeriğinin 40-60 arasında, bitiş nükleotidlerinin G veya C olması gibi sekans kriterleri kontrol edildi.

Her bir primer seti ilgili organizmaya spesifikliğı ve inter/intra moleküler etkileşim gösterme eğilimleri sırasıyla <https://eu.idtdna.com/> ve <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> veri tabanları vasıtasıyla sekansların direk olarak yazılması yoluyla analizlendi. Buna göre başarılı olan primer setleri aşağıdaki Tablo 3.1'deki gibidir.

**Tablo 3.1** Multipleks PCR'da kullanılan primer setleri.

Organizma	Gen bölgesi	Tür spesifik primerler	Ürün (bp)
<i>Candida albicans</i>	<i>CaYST1</i>	CaF-5'-AAGTATTTGGGAGAAGGGAAAGGG-3'	310
		CaR-5'-AAAATGGGCATTAAGGAAAAGAGC-3'	
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>ITS4 &amp; ITS5</i>	FoF-5'-ACATAACCACTTGTTGCCTCG-3'	340
		FoR-5'-CGCCAATCAATTTGAGGAACG-3'	
<i>Scedosporum prolificans</i>	ITS2-18S rRNA	SproF-5'-GCTACTACCGATTGAATGGCTC-3'	642
		SpoR-5'-GAATAGAGGGTTTGACGGCTG-3'	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>IleS</i>	SaF-5'-CATACAGCACCAGGTCACGGGGAA-3'	227
		SaR-5'-GTTCTCCAGTCGTGTGGATAGC-3'	
<i>Pseudomonas aureoginosa*</i>	<i>OprL</i>	*PaF-5'- ATGGAAATGCTGAAATTCGGCAAATTTGCTGC- 3'	504
		*PaR-5'- CTTCTTCAGCTCGACGCGACGGTTCTGAG-3'	
<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>ITS-16S-23S</i> rRNA	KpF-5'-ATTTGAAGAGGTTGCAAACGAT-3'	130
		KpR-5'-TTCACCTCTGAAGTTTTCTTGTGTT-3'	

### 3.5 Geleneksel PCR İle Primerlerin Analizi Ve Primer Bağlanma Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Tür-spesifik olarak tasarlanan primerlerin çalışıp çalışmadıklarının kontrolünü yapmak için her bir patojen için geleneksel tekli PCR reaksiyonu hazırlandı. PCR’da kullanılan bileşenler ve son konsantrasyonları Tablo 3.2’de belirtildiği gibidir;

**Tablo 3. 2** PCR Reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları.

Bileşen	Son konsantrasyon/miktar/aktivite
10x Taq Buffer	X (20 mM)
MgCl <sub>2</sub>	25 mM
dNTP set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	100 µM
İleri primer	25 pmol
Geri primer	25 pmol
Kalıp DNA	50-100 ng
Taq DNA polimeraz	0,75 Unit
Total hacim	50 mL

PCR, Tablo 3.2’deki bileşenlerden oluşan reaksiyon karışımı +4°C’de biyogüvenlik kabini içerisinde hazırlandıktan sonra (reaksiyon hacmi PCR saflığındaki su ile tamamlandı) termal döngü cihazına yerleştirildi. Termal döngü koşulları 95 °C’de 3 dk başlangıç denatürasyonu, 95 °C’de 30 sn denatürasyon, değişen sıcaklıklarda 30 sn primer bağlanması, 72 °C’de 1 dk uzama ve 72 °C’de 5 dk final uzamasıdır. Reaksiyon 30 döngüde gerçekleştirildi.

Başlangıç olarak her bir primer seti için değişen sıcaklıklarda gradient PCR gerçekleştirildi. Burada, primerlerin sentez reçetelerinde yer alan primer erime sıcaklıkları (T<sub>m</sub>) (Tablo 3.3) ortalamaları baz alınarak +-5 aralığında 8 farklı primer bağlanma sıcaklığına ayarlanarak PCR için inkübasyona bırakıldı.

**Tablo 3.3** Primerlerin erime sıcaklıkları.

Primer adı	Erime sıcaklığı	Primer adı	Erime sıcaklığı	Primer adı	Erime sıcaklığı
SaF	61 °C	PaF	50 °C	KpF	49 °C
SaR	57 °C	PaR	58 °C	KpR	51 °C
Primer adı	Erime sıcaklığı	Primer adı	Erime sıcaklığı	Primer adı	Erime sıcaklığı
CaF	56 °C	FoF	52 °C	SproF	55 °C
CaR	52 °C	FoR	52 °C	SpoR	54 °C

### 3.6 Agaroz Jel Elektrofrez

%1'lik agaroz TBE tamponu içerisinde ısıtıcı manyetik karıştırıcı ile çözmek üzere kaynatıldı. Agaroz çözeltisinin kaynaması ve berrak çözelti oluşmasının ardından oda sıcaklığında yaklaşık 40-50°C'ye kadar soğutulup içerisine %1'lik EtBr eklenip yavaş yavaş homojen karışması sağlandı. Jel dökme kalıbına hava boşluğu oluşturmadan yavaşça dökülen jel solüsyonuna elektroforez numune tarakları eklendi. Jel yaklaşık yarım saat içerisinde katılaştıktan sonra numune yüklemesi için elektroforez tankına yerleştirildi. Tank jelin üzerini geçene kadar 1x TBE yürütme tamponu eklendi.

Reaksiyon sonunda +4'de muhafaza edilen numuneler, 1x Loading dye varlığında jele yüklendi. Numunelere ek referans olarak Gene Ruler Expression DNA marker da yükleme boyası ile jele yüklendi. Elektroforez koşulları 120 mV olarak ayarlandı ve yükleme boyası jelin %75-80'ini geçene kadar (yaklaşık 45 dk) elektroforeze devam edildi. Elektroforez sonrası tanktan çıkarılan jel, 254 nm'de UV transilluminatör ile görüntülendi. Sonuçlar kaydedildi.

Yükleme boyasının kullanılmasının amaçları aşağıdaki şekilde özetlenmiştir;

- 1) numunenin vizkozitesini artırarak kuyucuklara yüklenmesini kolaylaştırır,
- 2) boya renk sağladığı için yükleme prosesini kolaylaştırır, 3) Boya sayesinde jelde DNA göçünün hangi aşamada olduğu izlenebilir (Lee et al., 2012).

### 3.7 Multipleks PCR ve Optimizasyon Çalışmaları

Bütün patojenlerin DNA'larının birlikte tespit edilebilmesi için 50 µL reaksiyon hacminde ilgili patojenlerin kalıp DNA'ları, bu kalıp DNA'lara spesifik olan primerler varlığında ve diğer bileşenlerle multipleks PCR reaksiyonu hazırlandı. Bileşenler ve oranları Tablo 3.4'te belirtildiği gibidir.

**Tablo 3. 4** Multipleks PCR bileşenleri.

Bileşen	Son konsantrasyon/miktar
10x Taq Buffer	X (20 mM)
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM
dNTP set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	100 µM
İleri primer	10 pmol
Geri primer	10 pmol
Kalıp DNA	10 ng
Taq DNA polimeraz	2,5 Unit
Total hacim	50 mL

Reaksiyon koşulları şu şekilde uygulandı: 95 °C'de 3 dk başlangıç denatürasyonu, 95 °C'de 30 sn denatürasyon, 53.7 °C'de 30 sn primer bağlanması, 72 °C'de 1 dk uzama ve 72 °C'de 5 dk final uzaması. Reaksiyon 30 döngüde gerçekleştirildi.

### 3.8 Optimizasyon Çalışmaları

#### 3.8.1 Bakteriyel ve fungal PCR

Reaksiyon optimizasyon öncesi bakteriyel ve fungal PCR olmak üzere iki gruba ayrılıp 10 ng sabit kalıp DNA varlığında 2,5 U Taq polimeraz kullanılarak multipleks PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon koşulları: 95 °C'de 3 dk başlangıç denatürasyonu, 95 °C'de 30 sn denatürasyon, 53,7 °C'de 30 sn primer bağlanması, 72 °C'de 1 dk uzama ve 72 °C'de 5 dk final uzama şeklinde gerçekleştirildi. Reaksiyon 30 döngüde gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre reaksiyon parametreleri aşağıdaki şekillerde değiştirildi.

### 3.8.2 MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu

10 ng sabit konsantrasyonda kalıp molekül, ileri ve geri primerler varlığında 2,5 U Taq polimeraz kullanılarak multipleks PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. 50 µL Reaksiyon hacminde 1 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM, 3,00 mM, 3,5 mM, 4,0 mM konsantrasyonlarında MgCl<sub>2</sub> gradient optimizasyonu yapıldı. Reaksiyon koşulları: 95 °C’de 3 dk başlangıç denatürasyonu, 95 °C’de 30 sn denatürasyon, 53.7 °C’de 30 sn primer bağlanması, 72 °C’de 1 dk uzama ve 72 °C’de 5 dk final uzamasıdır. Reaksiyon 30 döngüde gerçekleştirildi.

### 3.8.3 Primer konsantrasyonu

Amplifikasyonu gerçekleşmeyen ya da zayıf gerçekleşen bölgeler için primer konsantrasyonu artırılıp diğerlerinin konsantrasyonu azaltılarak reaksiyon karışı hazırlandı. Reaksiyon koşulları: 95 °C’de 3 dk başlangıç denatürasyonu, 95 °C’de 30 sn denatürasyon, 53.7 °C’de 30 sn primer bağlanması, 72 °C’de 1 dk uzama ve 72 °C’de 5 dk final uzaması şeklinde gerçekleştirildi. Reaksiyon 30 döngüde gerçekleştirildi.

## 3.9 Altın Nano-multipleks PCR

Altın nanopartiküllerin heksapleks PCR üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla 0,1 mM PBS tamponunda çözülmüş altın nanopartiküller 0,5-1,0-1,5-2,0-2,5-3,0 nM ve ayrıca 0,5-0,65-0,80-1,0 konsantrasyonlarda seyreltildi. İlgili konsantrasyonlarda AuNP’leri içeren son hacim 50 µL olan reaksiyon karışımları Tablo 3.5’e göre hazırlandı.

**Tablo 3. 5** Altın Nano-PCR kompozisyonu.

Bileşen	Son konsantrasyon/miktar
10x Taq Buffer	X (20 mM)
MgCl <sub>2</sub>	3,0 mM
dNTP set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	100 µM
İleri primer (KpF, PaF <sup>2</sup> , FoF <sup>2</sup> , SaF, ProF)	10 pmol
İleri primer (CaF)	25 pmol
Geri primer (KpR, PaR <sup>2</sup> , FoR, SaR, ProR)	10 pmol

İleri primer (CaR)	25 pmol
Kalıp DNA	10 ng
AuNP	0,5-1,0-1,5-2,0-2,5-3,0 nM
Taq DNA polimeraz	2,5 Unit
Total hacim	50 mL

Reaksiyon koşulları şu şekilde uygulandı: 95 °C’de 3 dk başlangıç denatürasyonu, 95 °C’de 30 sn denatürasyon, 53.7 °C’de 30 sn primer bağlanması, 72 °C’de 1 dk uzama ve 72 °C’de 5 dk final uzaması. Reaksiyon 30 döngüde gerçekleştirildi.

### 3.10 Multipleks PCR İçin Agaroz Jel Elektroforezi

%2’lik agaroz, TBE tamponu içerisinde ısıtıcılı manyetik karıştırıcı ile çözülmek üzere kaynatıldı. Agaroz çözeltisinin kaynaması ve berrak çözelti oluşmasının ardından oda sıcaklığında yaklaşık 40-50°C’ye kadar soğutulup içerisine %1’lik EtBr eklenip yavaş yavaş homojen karışması sağlandı. Jel dökme kalıbına hava boşluğu oluşturmadan yavaşça dökülen jel solüsyonuna elektroforez numune tarakları eklendi. Jel yaklaşık yarım saat içerisinde katılaştıktan sonra numune yüklemesi için elektroforez tankına yerleştirildi. Tank jelin üzerini geçene kadar 1x TBE yürütme tamponu eklendi.

Reaksiyon sonunda +4’de muhafaza edilen numuneler, 1x Loading dye varlığında jele yüklendi. Numunelere ek referans olarak NEB N3236S 50 bp DNA marker da yükleme boyası ile jele yüklendi. Elektroforez koşulları 120 mV olarak ayarlandı ve yükleme boyası jelin %75-80’ini geçene kadar (yaklaşık 100-120 dk) elektroforeze devam edildi. Elektroforez sonrası tanktan çıkarılan jel, 254 nm’de UV transilluminatör ile görüntülendi. Sonuçlar kaydedildi.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Kalıp DNA'ların Eldesi

Prokaryotik ve ökaryotik hücre kültüründe, organizmalar hücrel faaliyetlerin devamlılığının sağlanması için karbon, hidrojen, oksijen, azot, potasyum gibi elementlerce zengin besiyerlerinde kütle ve oksijen transferleri sağlanarak gerekli sıcaklık ve nem benzeri koşullarda inkübe edilerek kültive edilir. Bu, organizmaların doğal habitatlarındaki yaşam ortamlarının yapay bir şekilde sürdürülmesidir. Her bir organizma için çevresel ve elementel koşul gereksinimi değişmekle birlikte, aynı mikroorganizma farklı koşullarda birden fazla metabolik ve morfolojik özellik gösterebilir. Bazı koşulların ekstrem olduğu durumlarda mikroorganizmalar mutasyona uğrayıp genetik gen dizilerinin değişmesi mümkün olabilir (Kamel, 2021).

Polimeraz zincir reaksiyonunda kalıp olarak kullanılan genomik DNA'ların kaynağı kültive edilmiş mikroorganizmalardır. Bu çalışmada kullanılan patojenlerin (*S. prolificans* hariç, bu organizmanın referans suşu mevcut olmadığı için) kültivasyonu ilgili besiyerlerinde karakteristik morfolojik özelliklerin makroskobik olarak tespit edilmesiyle sonlandırıldı. Tablo 4.1'de bu özellikler belirtilmiştir.

**Tablo 4. 1** Patojenlerin belirli koşullarda gösterdikleri morfolojik özellikleri.

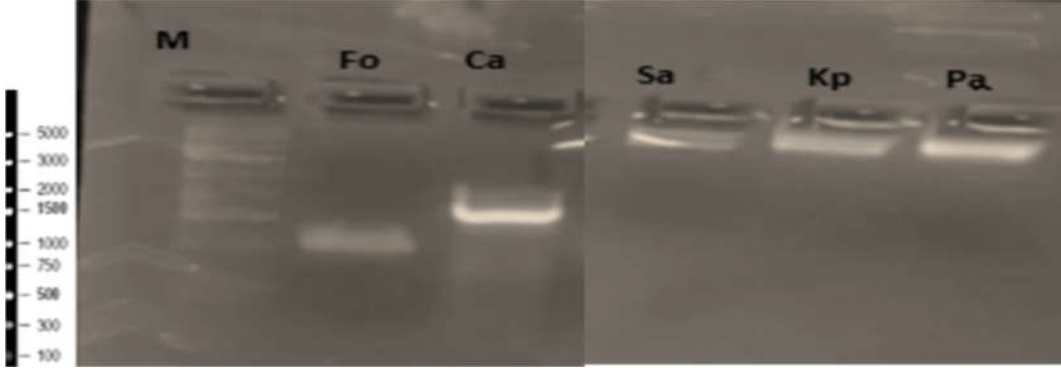
Mikroorganizma	İnkübasyon koşulları	Beklenen morfolojik özellikler
<i>S. aureus</i>	NA, 37 °C 18 saat	Düz, altın sarısı konveks yapıda opak yuvarlak şekilli koloniler (Kamel, 2021)
<i>P. aeruginosa</i>	NA, 28 °C, 18 saat	Yeşilimsi, düz, opak, büyük, yuvarlak ve düzensiz merkezli koloniler (Kamel, 2021)
<i>K. pneumoniae</i>	NA, 37 °C, 18 saat	Beyaz, kabarık, akışkan ve yuvarlak hücreler (Kamel, 2021)
<i>C. albicans</i>	PDA, 37 °C, 1 gün	Küçük, oval, beyaz dallanan hücreler (Krom, 2017)
<i>F. oxysporum</i>	SDA, 26 °C, 14 gün	Beyaz pamuksu miselyumların altında pembe-mor renkli yapılar (Cutuli et al., 2015)

Uygun morfolojik yapıda büyüdüğü tespit edilen hücreler bölüm 3.2’de belirtildiği gibi muamele edilerek genomik DNA’ları izole edildi. Genomik DNA eldesinde kullanılan kit temelde 5 aşamadan oluşmaktadır; liziz, ekstraksiyon, çöktürme, resüspanسیون ve saflaştırma. Liziz aşamasında SDS, setil trimetil amonyum ve 2-merkaptoetanol gibi indirgeyici ajanlarla hücre membrani lipid tabakası, hücre duvarı, nükleer membran ve DNA ilişkili hücre ilişkili proteinlerin parçalanarak DNA’nın serbest kalması sağlanır. EDTA gibi şelatörlerle DNAaz aktivitesi inhibe edilir. Ekstraksiyon aşamasında, fenol: kloroform: izopropil alkol karışımıyla liziz aşamasında elde edilen istenmeyen kontaminantlar santrifüj gibi mekanik bir uygulama sonrası birbirinden ayrışır. Sulu fazda kalan DNA parçaları alkol çöktürmesi yoluyla konsantre edilir ve daha sonra saf su ya da TE tamponu içerisinde resüspanسیون edilir, daha sonra RNAaz A yardımıyla RNAazlar inhibe edilir ve tekrar organik ekstraksiyonla izole edilen DNA kalite kontrol analizleri için uygun hale gelir (Gupta, 2019).

Kalite kontrol analizleri spektrofotometrik ve elektroforetik olarak gerçekleştirilebilir. Elektroforetik analizlerde başarılı bir şekilde ekstrakte edilmiş genomik DNA’lar, 1 kb büyük ve sirküler olmalarından dolayı agaroz porlarından geçemezler ve elektroforezde anoda doğru migrasyon yapamazlar. Bu, jel’e UV lamba altında bakıldığında en üstte keskin ve konsantrasyonlarına orantılı parlaklıkta bir bantların görüntülenmesiyle sonuçlanır. Ekstraksiyonun başarısız olması ise jelde, 1 kb’dan daha küçük bölgelerde bantlar oluşmasına ya da jelde kuyucuk boyunca lekelenme gibi görülen ve “smear” olarak adlandırılan görüntülerin oluşmasına neden olur.

Şekil 4.1’de gösterilen Fo organizmasının genomik DNA’sına ait kuyucuklarda 1 kb’dan daha küçük ve Ca organizmasına ait kuyucukta görülen smear görüntüsü tespit edildi. Bu, bu kuyucuklarda yer alan DNA’ların ekstraksiyon aşamasında degrades oldukları şeklinde yorumlandı. Bunun yanı sıra, Sa, Kp ve Pa organizmalarının genomik DNA’larına ait kuyucuklarda parlak keskin ve 1 kb’dan büyük olan bantlar net bir şekilde gözlemlendi. Agaroz jel elektroforezinden elde edilen sonuçlara göre “Genomic DNA purification kit” kullanılarak gerçekleştirilen DNA saflaştırma tekniği her iki, Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler için olumlu sonuçlandı. Fakat bölüm 3.2.2’de anlatılan

manuel yöntemle izole edilen fungal genomik DNA'ların degrades oldukları ve başarılı bir şekilde izole edilmedikleri belirlendi.



**Şekil 4. 1** Kit ve manuel yöntemle izole edilen genomik DNA'ların jel görüntüsü.

Fungal genomik DNA izolasyon prosedürünün başarısız olması üzerine başarılı bir şekilde izole ettiği bilinen ilgili genomik DNA'lar Salud Carlos II Enstitüsünden Dr. Maria Jose Buitrago tarafından hediye edildi. Elde edilen genomik DNA'lar miktarlarının artırılması amacıyla WGA (bütün genom amplifikasyon kiti) ile çoğaltıldı. Bu işlem sonrasında elde edilen genomik DNA'lar ve bakteriyel genomik DNA'ların TE tamponu içerisindeki solüsyonları Biotech Epoch 2 cihazı kullanılarak analizlendi. Buna göre genomik DNA'ların saflıklarının bir ölçütü olan  $A_{260/280}$  oranları ve  $ng/\mu L$  cinsinden konsantrasyonları aşağıda Tablo 4.2 belirtildiği gibidir.

**Tablo 4. 2** genomik DNAların saflık ve konsantrasyon sonuçları.

Genomik DNA	Konstrasyon ( $ng/\mu L$ )	$A_{260/280}$
<i>S. aureus</i>	35,94	1,76
<i>K. pneumonia</i>	45,38	1,83
<i>P. aeruginosa</i>	102,16	1,76
<i>C. albicans</i>	111,74	1,81
<i>F. oxysporum</i>	88,13	1,95
<i>S. prolificans</i>	58,77	1,88

Deneyde kullanılan tüm kalıp DNA'ların kalitesi,  $A_{260/280} = 1,7-2,0$  olacak şekildedir. Bu, DNA örneklerinin 260 nm ve 280 nm'deki absorbanlarının

oranını temsil etmektedir. Bu oranın ~1,8 olması DNA örneğinin saf olduğu anlamına gelmektedir. 1,6 ve daha küçük değerler numunede protein, fenol, ya da 280 nm de absorblanan diğer kontaminantların olduğu anlamına gelirken 2,0'dan daha yüksek değerler RNA kontaminasyonu olabileceği anlamına gelmektedir. Elde edilen sonuçlara göre PCR reaksiyonu için kullanılacak kalıp DNA'lar saftır. Konsantrasyonu belirlenen DNA örnekleri, çalışmanın diğer aşamalarında uygun konsantrasyonlarda seyreltilerek kullanıldı.

#### 4.2 Primer Homoloji Ve Sekonder Yapı Analizleri

Polimeraz zincir reaksiyonunda primerler, ilgili gen bölgelerine komplementer olarak bağlanacak şekilde dizayn edilen sekanlarıyla, hedef gen bölgesinin spesifik bir şekilde amplifiye edilmesindeki en önemli unsurdur.

Başarılı şekilde dizayn edilen primerler, hedef sekans dışında başka bir sekansla etkileşimde bulunmamalı, kendi içerisinde primer ya da sekonder yapılaşmaya eğilimli olmamalıdır. Söz konusu dizayn edilecek primerin multipleks PCR'da kullanımı olduğunda, yani birden fazla primer seti ve hedef gen bölgesinin olduğu durumlarda primerlerin primer dimeri, hairpin (saç tokası şeklinde bağlanmalar) ya da spesifik olmayan etkileşimlerde bulunma olasılıkları artmaktadır. Bu nedenle multipleks PCR dizayn aşamasında primerlerin diğer kalıp moleküllere bağlanma ve kendi içlerinde ya da aralarında spesifik olmayan bağlanma gösterme eğilimleri araştırılmalıdır.

Bu çalışmada analizlenmek istenen patojenlerin genomlarına korunmuş "house-keeping" genlerine spesifik olan primer dizileri biyoteknolojik bilgiler için ulusal merkez olan <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> veritabanı vasıtasıyla analizlendi. Bu sayede ilgili patojenler için seçilen her bir primer setinin bu patojenin genomuna spesifik olup olmadığı ve seçilen diğer patojen genomlarındaki herhangi bir genoma denk gelip gelmediği araştırıldı. Ayrıca, primerlerin kendi aralarında ya da birbirleri arasında sekonder yapı oluşturma eğilimleri <https://www.idtdna.com/> veritabanı vasıtasıyla analizlendi.

Blast analizi ile *S. aureus* patojeni tespiti için geliştirilecek PCR'da kullanılan SaF ve SaR primerleri %100'lük oranlarla *S. aureus* genomu ile

eşleştiği belirlendi. (Şekil 4.2). Ayrıca, multipleks PCR’da analizlenecek diğer organizmaların genomu ile eşleşme tespit edilmedi.

SaF	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Staphylococcus aureus strain Sta2021027 chromoso...	Staphylo...	48.1	48.1	100%	0.009	100.00%	2732997	gii2276811437 CP075563.1
✓	Staphylococcus aureus strain RMSA24 chromosome...	Staphylo...	48.1	48.1	100%	0.009	100.00%	2811052	gii2269771312 CP100428.1
✓	Staphylococcus aureus strain N09CSA16 chromoso...	Staphylo...	48.1	48.1	100%	0.009	100.00%	2874007	gii2269522540 CP091525.1
✓	Staphylococcus aureus strain JL28 chromosome_co...	Staphylo...	48.1	48.1	100%	0.009	100.00%	2716010	gii2259994062 CP099495.1
✓	Staphylococcus aureus strain JL42 chromosome_co...	Staphylo...	48.1	48.1	100%	0.009	100.00%	2690509	gii2259986292 CP099502.1
✓	Staphylococcus aureus strain S36 chromosome_co...	Staphylo...	48.1	48.1	100%	0.009	100.00%	2866122	gii2259983576 CP099504.1
✓	Staphylococcus aureus strain S82 chromosome_co...	Staphylo...	48.1	48.1	100%	0.009	100.00%	2716742	gii2259978395 CP099508.1
SaR	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Staphylococcus aureus strain Sta2021027 chromoso...	Staphylo...	44.1	44.1	100%	0.089	100.00%	2732997	gii2276811437 CP075563.1
✓	Staphylococcus aureus strain RMSA24 chromosome...	Staphylo...	44.1	44.1	100%	0.089	100.00%	2811052	gii2269771312 CP100428.1
✓	Staphylococcus aureus strain N09CSA16 chromoso...	Staphylo...	44.1	44.1	100%	0.089	100.00%	2874007	gii2269522540 CP091525.1
✓	Staphylococcus aureus strain JL28 chromosome_co...	Staphylo...	44.1	44.1	100%	0.089	100.00%	2716010	gii2259994062 CP099495.1
✓	Staphylococcus aureus strain JL42 chromosome_co...	Staphylo...	44.1	44.1	100%	0.089	100.00%	2690509	gii2259986292 CP099502.1
✓	Staphylococcus aureus strain S36 chromosome_co...	Staphylo...	44.1	44.1	100%	0.089	100.00%	2866122	gii2259983576 CP099504.1
✓	Staphylococcus aureus strain S82 chromosome_co...	Staphylo...	44.1	44.1	100%	0.089	100.00%	2716742	gii2259978395 CP099508.1
✓	Staphylococcus aureus strain SauR3 chromosome...	Staphylo...	44.1	44.1	100%	0.089	100.00%	2800107	gii2257766119 CP098727.1

Şekil 4.2 SaF ve SaR primerlerinin veri tabanı eşleşmeleri.

Blast analizi ile *K. pneumoniae* patojeni tespiti için polimeraz zincir reaksiyonu primer seti olan KpF ve KpR primerli %100 oranında *K. pneumoniae* genomu ile eşleştiği belirlendi (Şekil 4.3). KpR primeri için bir eşleşmede *Enterobacter* türlerini içerse de multipleks PCR’da analizlenecek diğer bakteriyel ve fungal türlerle eşleşme gözlenmediğinden çalışmaya bu primer setleri ile devam edildi.

KpF	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Klebsiella pneumoniae strain KPA1 chromosome_c...	Klebsiell...	44.1	44.1	100%	0.089	100.00%	5270951	gii2280510257 CP101877.1
✓	Klebsiella pneumoniae strain K-28 chromosome_co...	Klebsiell...	44.1	132	100%	0.089	100.00%	5362228	gii2279861257 CP090834.1
✓	Klebsiella pneumoniae strain KPK3 chromosome_c...	Klebsiell...	44.1	132	100%	0.089	100.00%	5422169	gii2279808695 CP090343.1
✓	Klebsiella pneumoniae strain MEI009 chromosome...	Klebsiell...	44.1	44.1	100%	0.089	100.00%	5116988	gii2276919456 CP074677.1
✓	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain K...	Klebsiell...	44.1	132	100%	0.089	100.00%	5442756	gii2276908069 CP101567.1
✓	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain K...	Klebsiell...	44.1	132	100%	0.089	100.00%	5441186	gii2276902748 CP101563.1
✓	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain K...	Klebsiell...	44.1	116	100%	0.089	100.00%	5287345	gii2276892671 CP101560.1
KpR	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Enterobacter sp. Crenshaw chromosome_complete...	Enterob...	48.1	144	100%	0.009	100.00%	4632139	gii2283222897 CP020817.3
✓	Klebsiella pneumoniae strain S270v chromosome_c...	Klebsiell...	48.1	144	100%	0.009	100.00%	5379249	gii2283203019 CP102192.1
✓	Klebsiella pneumoniae strain S234 chromosome_co...	Klebsiell...	48.1	144	100%	0.009	100.00%	5422759	gii2283197312 CP102186.1
✓	Klebsiella pneumoniae strain B1 chromosome_com...	Klebsiell...	48.1	136	100%	0.009	100.00%	5255352	gii2283185872 CP030741.1
✓	Klebsiella pneumoniae strain B2 chromosome_com...	Klebsiell...	48.1	136	100%	0.009	100.00%	5256433	gii2283180082 CP030733.1
✓	Klebsiella pneumoniae strain B3 chromosome_com...	Klebsiell...	48.1	136	100%	0.009	100.00%	5479750	gii2283174383 CP030725.1
✓	Klebsiella pneumoniae strain B4 chromosome_com...	Klebsiell...	48.1	136	100%	0.009	100.00%	5256698	gii2283168594 CP030717.1

Şekil 4.3 KpF ve KpR primerlerinin veri tabanı eşleşmeleri.

Blast analizi ile *P. aeruginosa* patojeni tespiti için geliştirilen PCR primer seti olan PaF ve PaR primerleri %100 orasında *P. aeruginosa* genomu ile eşleştiği belirlendi (Şekil 4.4). Ayrıca multipleks PCR’da analiz edilecek diğer bakteriyel ve fungal türlerin genomu ile eşleşme tespit edilmedi.

PaF	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	<a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain PA5083 chromosome...</a>	<a href="#">Pseudo...</a>	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	6902250	<a href="#">gii2283208647 CP102174.1</a>
✓	<a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain L1a chromosome c...</a>	<a href="#">Pseudo...</a>	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	6216913	<a href="#">gii2282042994 CP101656.1</a>
✓	<a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain ATCC 27853 chrom...</a>	<a href="#">Pseudo...</a>	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	6839761	<a href="#">gii2281317328 CP101912.1</a>
✓	<a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain NWRC-1223 chrom...</a>	<a href="#">Pseudo...</a>	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	6325586	<a href="#">gii2281301949 CP101911.1</a>
✓	<a href="#">Pseudomonas citronellolis strain C12 chromosome...</a>	<a href="#">Pseudo...</a>	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	7203080	<a href="#">gii227935020 CP101752.1</a>
✓	<a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain D-2 chromosome c...</a>	<a href="#">Pseudo...</a>	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	6364446	<a href="#">gii2276913680 CP101540.1</a>
✓	<a href="#">Pseudomonas benzenivorans strain D13-4 chromos...</a>	<a href="#">Pseudo...</a>	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	4755298	<a href="#">gii227678776 CP073346.1</a>
PaR	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	<a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain PA5083 chromosome...</a>	<a href="#">Pseudo...</a>	42.1	106	100%	0.35	100.00%	6902250	<a href="#">gii2283208647 CP102174.1</a>
✓	<a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain L1a chromosome c...</a>	<a href="#">Pseudo...</a>	42.1	74.3	100%	0.35	100.00%	6216913	<a href="#">gii2282042994 CP101656.1</a>
✓	<a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain ATCC 27853 chrom...</a>	<a href="#">Pseudo...</a>	42.1	74.3	100%	0.35	100.00%	6839761	<a href="#">gii2281317328 CP101912.1</a>
✓	<a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain NWRC-1223 chrom...</a>	<a href="#">Pseudo...</a>	42.1	74.3	100%	0.35	100.00%	6325586	<a href="#">gii2281301949 CP101911.1</a>
✓	<a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain D-2 chromosome c...</a>	<a href="#">Pseudo...</a>	42.1	74.3	100%	0.35	100.00%	6364446	<a href="#">gii2276913680 CP101540.1</a>
✓	<a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain R20-14 chromosom...</a>	<a href="#">Pseudo...</a>	42.1	74.3	100%	0.35	100.00%	6351172	<a href="#">gii2273714390 CP094851.1</a>
✓	<a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain AX0001 chromosome</a>	<a href="#">Pseudo...</a>	42.1	106	100%	0.35	100.00%	6485399	<a href="#">gii2273149692 CP100760.1</a>
✓	<a href="#">Pseudomonas aeruginosa strain PA0011 chromosome</a>	<a href="#">Pseudo...</a>	42.1	106	100%	0.35	100.00%	6485397	<a href="#">gii2273145244 CP100761.1</a>

Şekil 4.4 PaF ve PaR primerlerinin veri tabanı eşleşmeleri.

Yapılan “blast” analizi sonucunda *C. albicans* patojeni tespiti için polimeraz zincir reaksiyonu primer seti olan CaF ve CaR primerleri %100 oranında *C. albicans* genomu ile eşleştiği belirlendi (Şekil 4.5). Ayrıca, multipleks PCR’da analiz edilecek diğer bakteriyel ve fungal türlerin genomu ile eşleşme tespit edilmedi.

CaF	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	<a href="#">Candida albicans strain TIMM 1768 chromosome...</a>	<a href="#">Candida...</a>	48.1	48.1	100%	0.009	100.00%	1788788	<a href="#">gii1469258525 CP032018.1</a>
✓	<a href="#">Candida albicans strain SC5314-P0 chromoso...</a>	<a href="#">Candida...</a>	48.1	48.1	100%	0.009	100.00%	1799405	<a href="#">gii1307445969 CP025160.1</a>
✓	<a href="#">Candida albicans strain SC5314-P0 chromoso...</a>	<a href="#">Candida...</a>	48.1	48.1	100%	0.009	100.00%	1799323	<a href="#">gii1307445961 CP025152.1</a>
✓	<a href="#">Candida albicans strain SC5314-GTH12 chro...</a>	<a href="#">Candida...</a>	48.1	48.1	100%	0.009	100.00%	1798977	<a href="#">gii1305241453 CP025177.1</a>
✓	<a href="#">Candida albicans strain SC5314-GTH12 chro...</a>	<a href="#">Candida...</a>	48.1	48.1	100%	0.009	100.00%	1799051	<a href="#">gii1305241068 CP025169.1</a>
✓	<a href="#">Candida albicans SC5314 chromosome 3</a>	<a href="#">Candida...</a>	48.1	48.1	100%	0.009	100.00%	1799298	<a href="#">gii1078721495 CP017625.1</a>
✓	<a href="#">Candida albicans yst1 gene for YST1 protein...</a>	<a href="#">Candida...</a>	48.1	48.1	100%	0.009	100.00%	2549	<a href="#">gii7270972 AJ251858.1</a>
CaR	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	<a href="#">Candida albicans yst1 gene for YST1 protein...</a>	<a href="#">Candida...</a>	48.1	48.1	100%	0.009	100.00%	2549	<a href="#">gii7270972 AJ251858.1</a>
✓	<a href="#">Candida albicans strain TIMM 1768 chromosome...</a>	<a href="#">Candida...</a>	48.1	48.1	100%	0.009	100.00%	1788788	<a href="#">gii1469258525 CP032018.1</a>
✓	<a href="#">Candida albicans strain SC5314-P0 chromoso...</a>	<a href="#">Candida...</a>	48.1	48.1	100%	0.009	100.00%	1799405	<a href="#">gii1307445969 CP025160.1</a>
✓	<a href="#">Candida albicans strain SC5314-P0 chromoso...</a>	<a href="#">Candida...</a>	48.1	48.1	100%	0.009	100.00%	1799323	<a href="#">gii1307445961 CP025152.1</a>
✓	<a href="#">Candida albicans strain SC5314-GTH12 chro...</a>	<a href="#">Candida...</a>	48.1	48.1	100%	0.009	100.00%	1798977	<a href="#">gii1305241453 CP025177.1</a>
✓	<a href="#">Candida albicans strain SC5314-GTH12 chro...</a>	<a href="#">Candida...</a>	48.1	48.1	100%	0.009	100.00%	1799051	<a href="#">gii1305241068 CP025169.1</a>
✓	<a href="#">Candida albicans SC5314 chromosome 3</a>	<a href="#">Candida...</a>	48.1	48.1	100%	0.009	100.00%	1799298	<a href="#">gii1078721495 CP017625.1</a>

Şekil 4.5 CaF ve CaR primerlerinin veritabanı eşleşmeleri.

FoF ve FoR primerleri ile yapılan blast analizi sonucunda, bu primerlerin %100 oranında *F. oxysporum* genomuna spesifik olduğu belirlendi (Şekil 4.6). Ek olarak, multipleks PCR ile tayin edilecek diğer patojenlerin genomu ile herhangi bir eşleşme saptanmadı.

FoF	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	PREDICTED_Canis lupus dingoo uncharacterize...	Canis lu...	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	3095	gii2272565929 XR_00481132
✓	Fusarium oxysporum isolate 1378 small subunit...	Fusariu...	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	538	gii2282360611 OP157539.1
✓	Fusarium oxysporum strain ZCM504-18 internal transcrib...	Fusariu...	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	456	gii2281638051 OP142498.1
✓	Fusarium oxysporum isolate AUC-TZ-9 internal transcrib...	Fusariu...	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	540	gii2280732063 OP128055.1
✓	Fusarium sp. isolate AUC-TZ-7 internal transcrib...	Fusariu...	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	542	gii2280731055 OP125840.1
✓	Fusarium oxysporum isolate AUC-TZ-3 internal transcrib...	Fusariu...	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	540	gii2280724900 OP125837.1
✓	Fusarium sp. isolate AUC-TZ-2 internal transcrib...	Fusariu...	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	543	gii2280714530 OP125754.1
✓	Fusarium sp. strain AM470 internal transcribed s...	Fusariu...	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	457	gii2279970020 OP113904.1
✓	Fusarium oxysporum strain AM213 internal trans...	Fusariu...	40.1	40.1	100%	1.4	100.00%	456	gii2279969988 OP113872.1

FoR	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Fusarium oxysporum strain ZCM504-18 internal transcrib...	Fusariu...	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	456	gii2281638051 OP142498.1
✓	Fusarium oxysporum isolate AUC-TZ-9 internal transcribe...	Fusariu...	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	540	gii2280732063 OP128055.1
✓	Fusarium sp. isolate AUC-TZ-7 internal transcribed space...	Fusariu...	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	542	gii2280731055 OP125840.1
✓	Fusarium oxysporum isolate AUC-TZ-3 internal transcribe...	Fusariu...	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	540	gii2280724900 OP125837.1
✓	Fusarium sp. isolate AUC-TZ-2 internal transcribed space...	Fusariu...	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	543	gii2280714530 OP125754.1
✓	Fusarium sp. strain AM470 internal transcribed spacer 1...	Fusariu...	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	457	gii2279970020 OP113904.1
✓	Fusarium oxysporum strain AM213 internal transcribed sp...	Fusariu...	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	456	gii2279969988 OP113872.1
✓	Fusarium sp. strain AM92 internal transcribed spacer 1_p...	Fusariu...	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	457	gii2279969977 OP113867.1

Şekil 4.6 FoF ve FoR primerleri veri tabanı eşleşmeleri.

SpF ve SpR primerleri ile yapılan blast analizi sonucunda, bu primerlerin %100 oranında *S. prolificans* (*L. prolificans*) mikroorganizmasının genomu ile eşleştiği belirlendi (Şekil 4.7). Ek olarak, multipleks PCR'da tayin edilecek diğer mikroorganizmaların genomu ile herhangi bir eşleşme tespit edilmedi.

SpF	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Lomentospora prolificans strain DTO 402-E9 small subun...	Lomento...	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	868	gii1829650352 MT316371.1
✓	Microascaceae sp. strain OTU_861 internal transcribed s...	Microasc...	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	200	gii1465459630 MH811222.1
✓	Lomentospora prolificans isolate BMU03234 small subun...	Lomento...	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	563	gii1708260661 MN216246.1
✓	Lomentospora prolificans isolate FF128 internal transcrib...	Lomento...	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	467	gii1675520362 MN004752.1
✓	Lomentospora prolificans isolate FF98 internal transcribe...	Lomento...	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	561	gii1675520361 MN004751.1
✓	Lomentospora prolificans culture CBS_116908 strain CBS...	Lomento...	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	587	gii1473250062 MH863006.1
✓	Lomentospora prolificans culture CBS_114_90 strain CBS...	Lomento...	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	509	gii1473249254 MH862198.1
✓	Petriella musispora strain 42514DRJ 18S ribosomal RNA...	Petriella...	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	1175	gii1433417771 MF782720.1
✓	Petriella musispora strain 41414DRJ 18S ribosomal RNA...	Petriella...	42.1	42.1	100%	0.35	100.00%	1170	gii1433417769 MF782718.1

SpR	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Colletotrichum gigasporum strain JS-0367 chrom...	Colletotr...	44.1	252	100%	0.089	100.00%	7301892	gii2283019301 CP077954.1
✓	Aspergillus salinarum isolate H210908-020_K05...	Aspergill...	44.1	44.1	100%	0.089	100.00%	1095	gii2270125071 ON970493.1
✓	Colletotrichum lupini 18S ribosomal RNA/CLUP0...	Colletotr...	44.1	44.1	100%	0.089	100.00%	1796	gii2273254533 XR_007414318
✓	Colletotrichum lupini 18S ribosomal RNA/CLUP0...	Colletotr...	44.1	44.1	100%	0.089	100.00%	1796	gii2273254530 XR_007414315
✓	Colletotrichum lupini 18S ribosomal RNA/CLUP0...	Colletotr...	44.1	44.1	100%	0.089	100.00%	1796	gii2273254527 XR_007414312
✓	Colletotrichum lupini 18S ribosomal RNA/CLUP0...	Colletotr...	44.1	44.1	100%	0.089	100.00%	1796	gii2273254524 XR_007414309
✓	Colletotrichum lupini 18S ribosomal RNA/CLUP0...	Colletotr...	44.1	44.1	100%	0.089	100.00%	1793	gii2273254521 XR_007414306
✓	Colletotrichum lupini 18S ribosomal RNA/CLUP0...	Colletotr...	44.1	44.1	100%	0.089	100.00%	1795	gii2273254518 XR_007414303

Şekil 4.7 SpF ve SpR primerlerinin veri tabanı analizleri.

Primerler gibi tek zincirli nükleik asit sekansları yeterince stabil değildir ve sekonder yapılaşma eğilimindedirler. Primerlerin kendi arasında ya da primerlerle sekonder yapı oluşturmaları PCR'in etkinliğini etkileyen önemli etkenlerdendir. Birbirleriyle heterodimer ya da oluşturma eğilimi içerisinde olan primerler, PCR'in düşük verimle gerçekleşmesine, primer dimerleri ya da spesifik olmayan bağlanmalar gözlenmesine neden olabilirler. Bu çalışmada primerlerin birbiri arasında heterodimer ve kendi aralarında homodimer oluşturma eğilimleri <https://eu.idtdna.com/> veritabanı vasıtasıyla analizlendi.

**Tablo 4.3** Primer setlerinin heterodimer ve homodimer oluşturma eğilimleri.

$\Delta G$ Kcal/mole	SaF	KpF	PaF'	CaF	FoF	SpF	SaR	KpR	PaR'	CaR	FoR	SpR	Hairpin	$\Delta G$ Kcal/mole
SaF	-4,41	-5,09	-8,65	-5,02	-5,09	-6,68	-6,69	-3,55	-4,74	-5,02	-3,61	-6,69	SaF	-0,40
KpF	-5,09	-10,94	-8,98	-5,84	-7,04	-4,41	-6,53	-5,47	-8,65	-5,36	-5,84	-7,18	KpF	-0,07
PaF'	-8,65	-8,98	-9,44	-7,32	-10,1	-8,26	-6,6	-5,47	-10,2	-8,51	-9,26	-5,84	PaF'	-2,35
CaF	-5,02	-5,84	-7,32	-3,89	-5,02	-3,9	-9,76	-5,46	-6,72	-5,36	-6,97	-4,38	CaF	1,25
FoF	-5,09	-7,04	-10,1	-5,02	-3,61	-6,24	-6,37	-4,88	-5,19	-8,16	-6,24	-6,24	FoF	0,37
SpF	-6,68	-4,41	-8,26	-3,90	-6,21	-3,61	-5,7	-5,47	-8,02	-6,31	-8,16	6,68	SpF	0,24
SaR	-6,91	-6,53	-6,6	-9,76	-6,37	-5,7	-6,6	-3,55	-6,53	-5,02	-6,31	-4,95	SaR	-0,40
KpR	-3,55	-5,47	-5,47	-5,46	-4,88	-5,47	-3,55	-5,47	-8,67	-7,41	-7,41	-4,77	KpR	-1,10
PaR'	-4,74	-8,65	-10,2	-6,72	-5,19	-8,02	-6,53	-8,67	-10,4	-6,31	-6,31	-6,99	PaR'	-1,04
CaR	-5,02	-5,36	-8,51	-5,36	-8,16	-6,31	-5,02	-7,41	-6,31	-5,37	-6,21	-4,74	CaR	-0,07
FoR	-3,61	-5,84	-9,26	-6,97	-6,24	-8,16	-5,02	-3,9	-6,75	-6,21	-5,47	-6,21	FoR	-0,95
SpR	-6,69	-7,18	-5,84	-4,38	-6,24	-6,68	-4,95	-4,77	-6,69	-4,74	-6,21	-3,61	SpR	1,04

Sekonder yapı oluşturma eğilimleri, serbest Gibbs enerjisi üzerinden tahmin edildi. Burada serbest Gibbs enerjisi, primerler arasında oluşabilecek sekonder yapının kırılması için gereken serbest enerjiyi ifade etmektedir. Bu değer, -9 kcal/mol'den daha küçük olması sekonder yapının stabil olabileceği anlamına gelmektedir (<https://www.idtdna.com/>). Tablo 4.3 incelendiğinde, primerlerin birbirleri arasındaki Gibbs enerjisi büyük çoğunlukla - 9 kcal/mol'den daha büyüktür yani daha pozitifdir. Bu primerlerin, heterodimer ve homodimer oluşturma eğilimlerinin düşük olduğu anlamına gelmektedir. Tablo 4.3'te azda

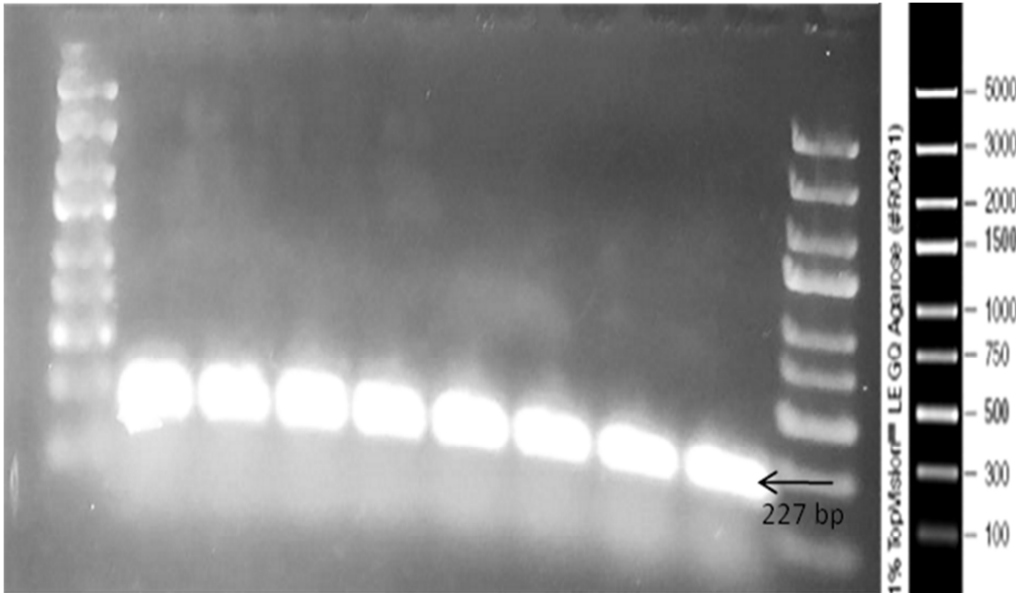
olsa PaF'- PaR', PaF-FoR, PaR-PaR' gibi Gibbs enerjisinin -9 kcal/mol'den daha negatif değerler aldığı primer etkileşimleri vardır. Fakat bu etkileşimlerin olması, olası non-spesifik bağlanmalar ile nanopartiküllerin PCR üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla bilinçli olarak ihmal edildi.

### 4.3 Tekli PCR ile Primer Yeterlilik Testleri

Bu kısımda tayin edilmesi istenen patojenlere spesifik dizayn edilen ve edildiği belirlenen primerlerin, kalıp DNA'ları amplifiye etme kabiliyetlerinin tespit edilmesi amacıyla her bir primer setinin ayrı olarak değerlendirilebileceği reaksiyonlar hazırlandı.

Başlangıç olarak reaksiyonlarda, reaksiyon bileşen konsantrasyonları sabit tutulup, değişen primer bağlanma sıcaklıklarında reaksiyonlar hazırlandı. Termal döngü koşulları belirlenirken ThermoTaq polimeraz enzim reçetesi referans alındı.

SaF ve SaR primerlerinin etkinliğinin incelenmesi amacıyla, Tablo 3.2'de belirtildiği gibi polimeraz zincir reaksiyonu kuruldu. Amplikonlar, inkübasyon sonrası agaroz jel elektroforezinde, generuler expression markeri varlığında UV ışık altında analizlendi (Şekil 4.8).

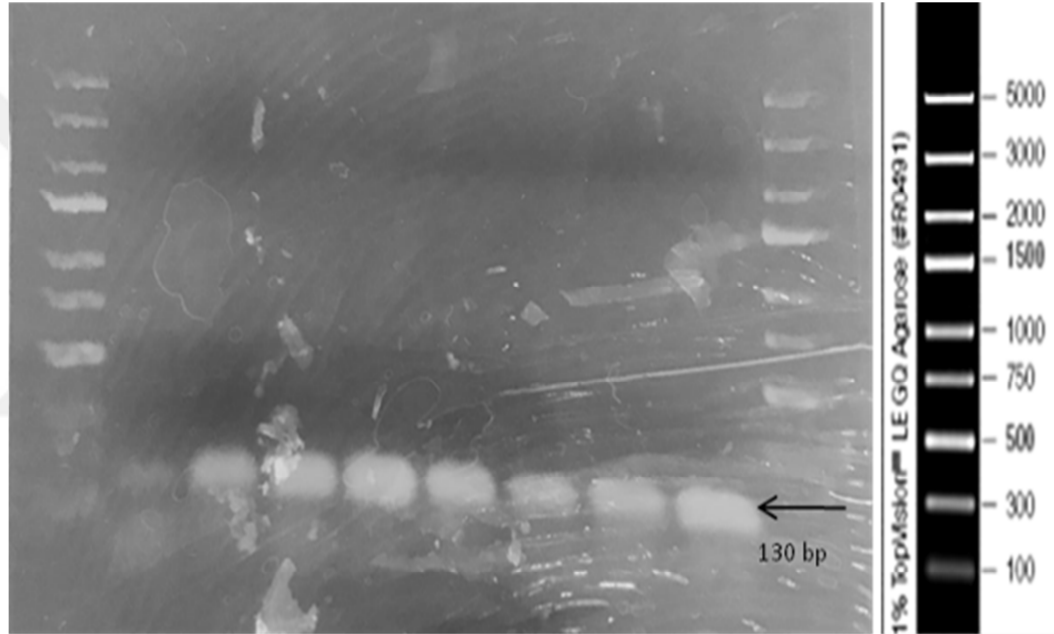


Şekil 4.8 *Staphylococcus aureus* spesifik PCR ürünü jel görüntüsü.

SaF ve SaR primer seti ile *S. aureus* genomunda virülans faktörler ve antimikrobiyal direnç için oldukça önemli olan izolösil-t-RNA sentaz enzimini

kodlayan gen bölgesi hedeflendi. 227 bp uzunluğunda olan *IleS* gen sekansına spesifik tasarlanan primer çiftleri ile, *S. aureus* türlerinin moleküler tayinleri yapılabilmektedir (Kim et al., 2014). Bu bilgidan yola çıkılarak kurulan PCR ürünü agaroz jel elektroforezinde incelendiğinde 227 bp uzunluğundaki *IleS* geninin amplifiye edildiği tespit edildi.

KpF ve KpR primerlerinin etkinliğinin incelenmesi amacıyla, Tablo 3.2’de belirtildiği gibi polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. Amplikonlar, inkübasyon sonrası agaroz jel elektroforezinde, generuler expression markeri varlığında UV ışık altında görüntülendi.

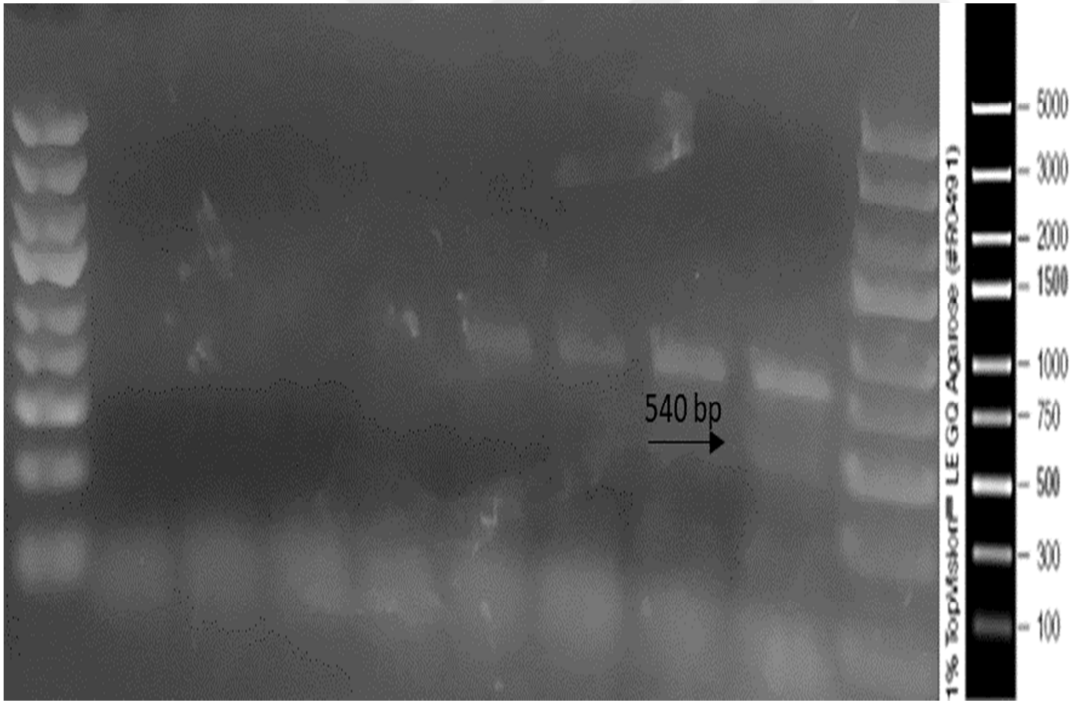


**Şekil 4.9** *Klebsiella pneumoniae* spesifik PCR ürünü jel görüntüsü.

Bakteriyel türlerde karakterizasyon ve tanımlama için kullanılacak niteliklerde bilgiyi barındıran 16S rRNA sekansı organizmaların genomlarında oldukça korunmuş bölgelerdir. Bu bilgidan yola çıkılarak dizayn edilen (Al-Jailawi & Zedan, 2014). KpF ve KpR primerleri PCR’da kullanılarak *K. pneumoniae*’ya ait olan 16s rRNA geninin amplifiye edildiği tespit edildi. 130 bp uzunluğundaki PCR ürünü Şekil 4.9’da gösterilmektedir.

PaF ve PaR primerlerinin etkinliğinin incelenmesi amacıyla, Tablo 3.2’de belirtildiği gibi polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. Amplikonlar inkübasyon sonrası agaroz jel elektroforezinde, generuler expression markeri varlığında UV ışık altında analizlendi.

*P. aeruginosa* türlerinin tanımlanması için filogenetik bir biomarker olan *OprL* geni dış hücre membranında yer alan peptidoglikan ilişkili proteininin kodlanmasında görevlidir. *P. aeruginosa* genomunda korunmuş olan bu gen sekansına spesifik tasarlanan PaF ve PaR primerleri ile amplifiye edilmesi beklenen PCR ürünü uzunluğu 540 bp uzunluğundadır (Biomedicine, 2011). Bu bilgidan yola çıkılarak elde edilen PCR ürünü incelendiğinde, amplifikasyonun gerçekleşmediği tespit edildi. Bunun yanı sıra, reaksiyonda spesifik olmayan etkileşimlerle 1300 bp dolaylarında istenmeyen bir gen bölgesinin amplifiye edildiği tespit edildi. Bunun üzerine, PaR ve PaR primerlerinin spesifiklikliğinin artırılması amacıyla sekansları uzatılıp guanin ve sitozin bazlarınca zenginleştirildi. PaF' ve PaR' primerleri ile primer spesifiklik analizleri tekrarlandı ve sonuçlar UV lamba altında incelendiğinde 1300 bp uzunluğundaki non-spesifik ürün amplifikasyonu devam etmesine rağmen 540 bp uzunluğundaki *oprL* geni düşük verimle de olsa amplifiye edildi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 *Pseudomonas aeruginosa* spesifik PCR ürünü jel görüntüsü.

CaF ve CaR primerlerinin etkinliğinin incelenmesi amacıyla, Tablo 3.2'de belirtildiği gibi polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. Amplikonlar, inkübasyon sonrası agaroz jel elektroforezinde, generuler expression markeri varlığında UV ışık altında görüntülendi.

CaF ve CaR primerleri, *C. albicans* türleri genomunda hücre membranı ve ribozom fraksiyonlarında bulunan YST1 proteinini kodlayan *CaYST1* geni sekansını hedeflemek için dizayn edilen primer setleridir (Baquero et al., 2002). Bu protein, translasyonel prosesin bir parçasıdır ve türler arasında oldukça korunmuş olmasıyla bilinmektedir. 310 bp uzunluğunda olan bu proteini kodlayan sekans sayesinde *C. albicans* türlerinin analizleri yapılabilmektedir. Bu bilgiden yola kurulan PCR ürünü agaroz jel elektroforezinde incelendiğinde 310 bp uzunluğundaki *CaYST1* geni başarı ile amplifiye edildi (Şekil 4.11).

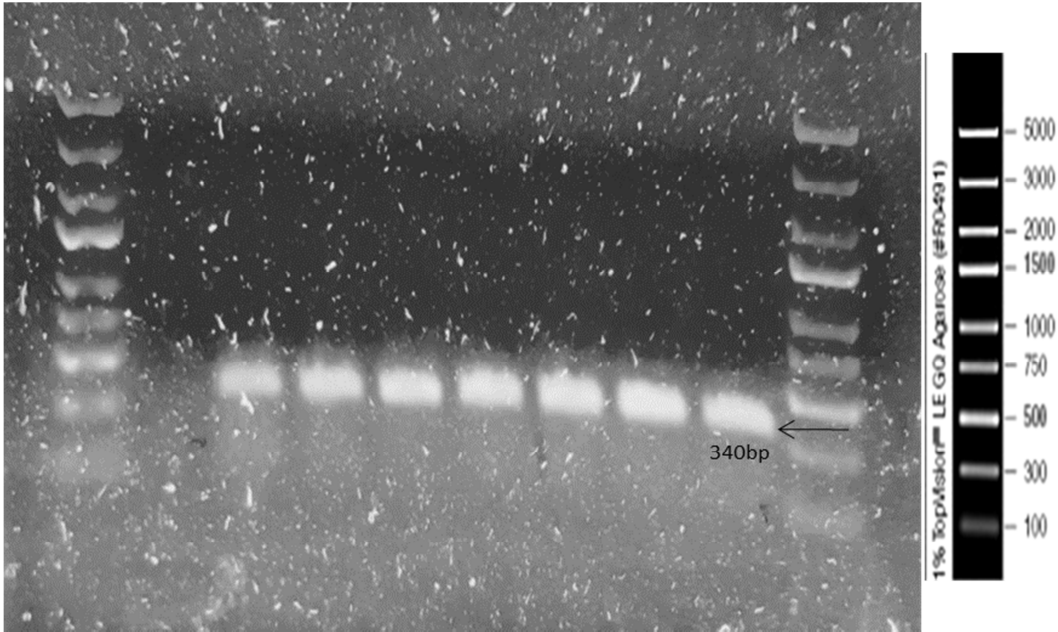


Şekil 4. 11 *Candida albicans* spesifik PCR ürünü jel görüntüsü.

FoF ve FoR primerlerinin etkinliğinin incelenmesi amacıyla, Tablo 3.2’de belirtildiği gibi polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. Amplikonlar, inkübasyon sonrası agaroz jel elektroforezinde, Generuler expression markeri varlığında UV ışık altında analizlendi.

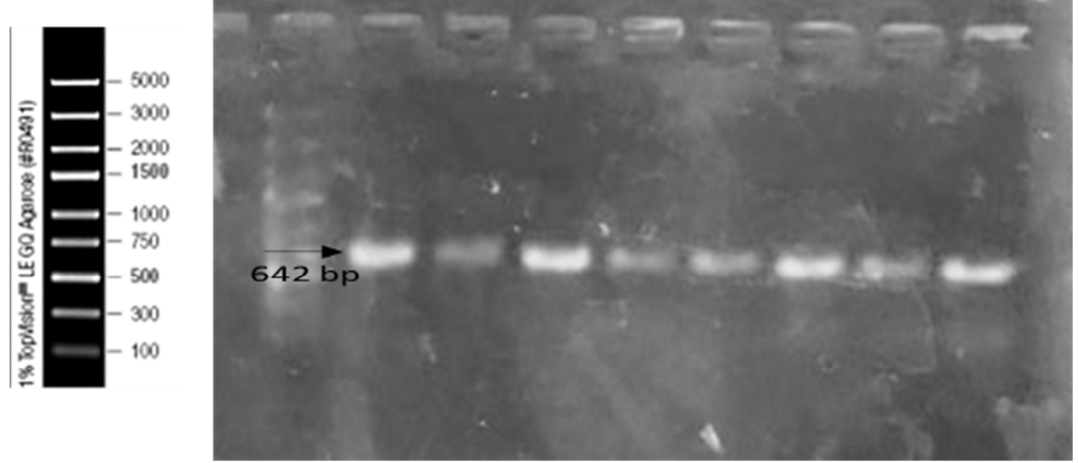
FoF ve FoR primerleri ile *F. oxysporum* genomu rRNA’da yer alan Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgeleri hedeflendi. Fungal barkodlamada oldukça kullanışlı olan rRNA’daki bu ITS bölgeleri, moleküler fungal türanalizlerinde sıklıkla tercih edilmektedir. FoF ve FoR primerleri ile dizayn edilen PCR ürünü 340 bp uzunluğundadır (Å et al., 2003). Bu bilgiden yola

çıkılarak elde edilen PCR ürününe ait agaroz jel elektroforezi incelendiğinde, 340 bp uzunluğundaki ITS4 & ITS5 bölgeleri başarıyla amplifiye edildi (Şekil 4.12).



Şekil 4. 12 *Fusarium oxysporum* spesifik PCR ürünü jel görüntüsü.

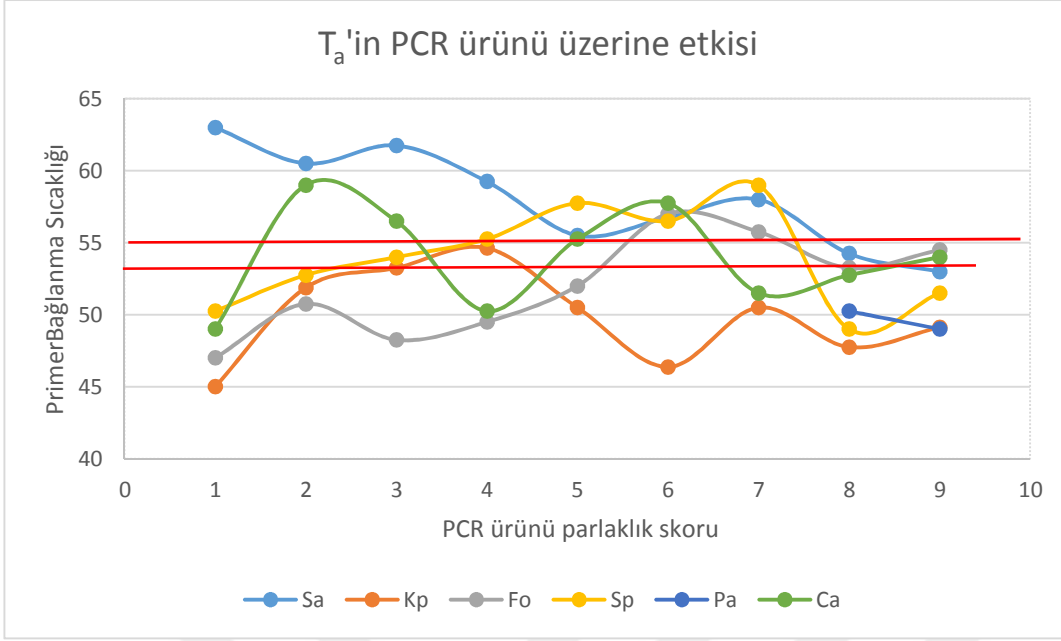
SpF ve SpR primerlerinin etkinliğinin incelenmesi amacıyla, Tablo 3.2’de belirtildiği gibi polimeraz zincir reaksiyonu hazırlandı. Amplikonlar, inkübasyon sonrası agaroz jel elektroforezinde, generuler expression markeri varlığında UV ışık altında analizlendi. *S. prolificans* mikroorganizmasının PCR ile tayini için genomunda fungal barcod görevi gören rRNA ITS2 bölgesi hedeflendi. Bu bölgenin amplifiye edilmesiyle elde edilecek gen bölgesinin uzunluğu 642 bp uzunluğundadır. Bu bilgiden yola çıkılarak SpF ve SpR primerlerinin kullanıldığı PCR ürünü agaroz jel elektroforezinde incelendiğinde 642 bp uzunluğunda olan bu gen bölgesinin başarı ile amplifiye edildiği tespit edildi (Şekil 4.13).



**Şekil 4. 13** CaF ve CaR primerlerinin veritabanı eşleşmeleri.

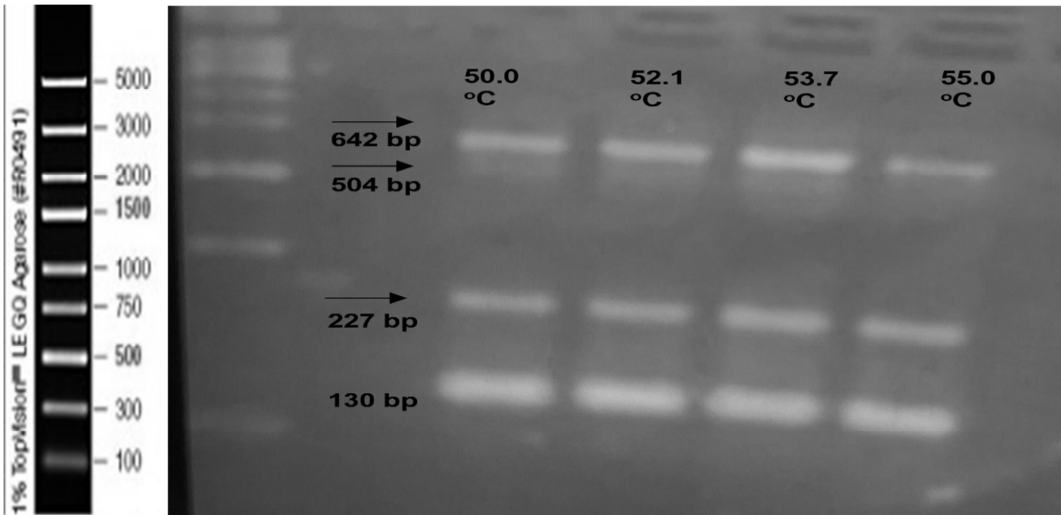
Multipleks PCR, tek bir reaksiyon içerisinde birden fazla primer seti vasıtasıyla birden fazla gen bölgesinin amplifikasyonun gerçekleştiği polimeraz zincir reaksiyonudur. Bu aynı zamanda, aynı termal döngü koşullarıyla amplifiye edilecek DNA parçaları demektir. Başka bir deyişle, multipleks PCR’da kalıp DNA zincirlerinin birbirinden ayrılması, primerlerin bu kalıplara bağlanması ve kalıp zincirlerini uzaması için ortak termal döngü koşullarının uygulanması şarttır. Özellikle, primer sekansı ve primerlerin kalıp DNA ile etkileşiminin belirlediği optimum primer bağlanma sıcaklığının ( $T_a$ ) tüm hedef DNA’lar için ortak bir sıcaklık değerinde ayarlanması oldukça önemlidir.

Bu çalışmada, her bir tür için tasarlanan primer setlerinin erime sıcaklıklarının (primer reçetesinde belirlenen) ortalamaları alınıp, primer bağlanma sıcaklıkları bu ortalamaların  $\pm 5^\circ\text{C}$  aralığında olacak şekilde gradient PCR hazırlandı (Bölüm 3.5). Bu sıcaklıklar; SaF ve SaR primeri için  $53^\circ\text{C}$ - $63^\circ\text{C}$ , KpF ve KpR primer seti için  $45^\circ\text{C}$  ve  $55^\circ\text{C}$ , PaF ve PaR primer seti için  $49^\circ\text{C}$  ve  $59^\circ\text{C}$ , CaF ve CaR primer seti için  $49^\circ\text{C}$  ve  $59^\circ\text{C}$ , FoF ve FoR primer seti için  $47^\circ\text{C}$ - $57^\circ\text{C}$  ve SpF ve SpR primer seti için  $49^\circ\text{C}$  ve  $59^\circ\text{C}$ ’dir. Belirtilen sıcaklıklarda gerçekleşen PCR’lardan elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntülerinde bant parlaklıkları 1 ile 8 arasında; 1 en az ve 8 en fazla olmak üzere skor verildi. Bu skordardan yola çıkılarak, elde edilen sıcaklık verileri grafikleştirildi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 T<sub>a</sub>'nın PCR ürünleri üzerinde etkisi.

Şekil 4.14 incelendiğinde altı primer seti ile kurulan 8'er reaksiyonun %40'ında 50°C-55°C aralığında amplifikasyonun gerçekleştiği belirlendi. Ek olarak, en düşük amplifikasyon veriminin gözlemlendiği ve *P. aeruginosa oprL* geni de bu sıcaklık aralığında amplifiye edildi.



Şekil 4.15 Farklı sıcaklıklarda multipleks amplifikasyon.

Daha sonra primer bağlanma sıcaklığı 50°C-52,1 °C-53,7 °C ve 55°C'de programlanarak dört farklı multipleks reaksiyon hazırlandı (Tablo 3.4) ve termal

döngüde inkübasyona bırakıldı. 53,7 °C, multipleks PCR'nin primer bağlanma sıcaklığı olarak belirlendi, çünkü bu sıcaklıkta daha yüksek verimler elde edildi, ancak *F. oxysporum*'un *ITS4-ITS5* bölgesinin ve *C. albicans*'ın *CaYST-1* geninin amplifikasyonu tespit edilemedi (Şekil 4.15).

#### 4.4 Multipleks PCR Optimizasyonu

Multipleks PCR, tekli PCR gibi reaksiyon bileşenleri, döngü parametreleri gibi faktörlerden etkilenmekle birlikte birden çok kalıp ve primer setini içermesi ile karşılaşılan problemlere çözüm bulmayı zorlaştırır. Bu aşamada, reaksiyon verimi üzerinde etkili olan parametrelerin gözlemlenebilir olması için kontrollü optimizasyon çalışmaları esansiyeldir. Multipleks PCR'ı optimize ederken tüm primerler için ortak olan primer bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra PCR'da spesifikliğı sağlayan en önemli parametrelerden biri olan primer konsantrasyonu ayarlanmalıdır. Ardından, polimerizasyon reaksiyonu substratı olan dNTP ve polimeraz enzimi kofaktörü MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu sırasıyla optimize edilmelidir (Markoulatos et al., 2002). Fakat bundan sonraki aşamalarda atılacak adımları belirleyen ürünlerin amplifikasyon düzeyleridir.

Ökaryotik genomik DNA, prokaryotik genomik DNA'dan daha büyük olduğundan, numunelerdeki çift sarmallı DNA sayısı ve bu kalıplara primer erişimi farklılık gösterecektir, bu nedenle bu çalışmada multipleks PCR'a başlarken reaksiyonlar, bakteriyel multipleks-PCR ve fungal multipleks PCR olarak iki aşamada gerçekleştirildi.

SaF-SaR, KpF-KpR ve PaF' ve PaR' primerleri ile *S. aureus*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* patojenleri tayini için bu organizmaların genomlarında korunmuş bölgeler hedeflenerek PCR dizayn edildi. Aynı zamanda bu gen bölgelerinin birbiri yanında analize olanak sağlamaları için farklı uzunluklarda olması sağlandı.

Bakteriyel-multipleks PCR için başlangıç olarak 10 ng kalıp molekül varlığında tablo 3.4'teki gibi reaksiyon setleri kuruldu. Amplikonlar, inkübasyon sonrası agaroz jel elektroforezinde, NEB markeri varlığında UV ışık altında analizlendi. Elde edilen sonuçlara göre *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *K. pneumoniae*'ya ait tür-spesifik gen bölgelerinin aynı reaksiyon koşullarında başarı

ile amplifiye edildiği tespit edildi. Fakat, 1300 bp dolaylarında spesifik olmayan bant gözlemlendi.

Fungal-multipleks PCR için başlangıç olarak 10 ng kalıp molekül varlığında tablo 3.4'teki gibi reaksiyon hazırlandı. Amplikonlar, inkübasyon sonrası agaroz jel elektroforezinde, NEB markeri varlığında UV ışık altında analizlendi.

Elde edilen sonuçlara göre *F. oxysporum* ve *S. prolificans* organizmalarına ait gen bölgeleri başarı ile amplifiye edilirken *C. albicans* organizmasına ait 310 bp uzunluğundaki gen bölgesi amplifiye edilemedi.

Primer bağlanma sıcaklığı belirlenmesinden sonra PCR verimini etkileyen en önemli faktörlerden birisi multipleks PCR'da primer konsantrasyonu PCR'ın geç evrelerinde bile amplifikasyona yetecek düzeyde olmalıdır. Molekül sayısı olarak primer-kalıp oranının en az  $10^8$  :1 olarak ayarlanması gerekmektedir (Markoulatos et al., 2002). Bu da primerin kalıptan en az 10 kat daha fazla olması gerektiği anlamına gelmektedir. *CaYST-1* gen bölgesinin amplifiye edilebilmesi için CaF ve CaR primerlerinin konsantrasyonları 25 pmole çıkarılırken, amplifikasyonu iyi gerçekleştiren diğer fungal genlere özgü primer setlerinin konsantrasyonu 10 pmole düşürüldü. Böylece primer yarışı gibi amplifikasyon verimini etkileyen durumların minimuma indirilmesi hedeflendi. Fungal-multipleks PCR bu şartlar altında yeniden kuruldu ve üç fungal türe özgü 642 bp, 340 bp ve 310 bp bantları gen bölgesi de başarıyla amplifiye edildi.

Tripleks PCR ile amplifikasyonları gerçekleştiren bakteriyel ve fungal türler için heksapleks olarak tablo 3.4'teki gibi reaksiyon kuruldu ve inkübasyon sonrası amplikonlar agaroz jel elektroforezi ile analizlendi. Elde edilen sonuçlara göre ilk multipleks PCR denemesinde *C. albicans* ve *F. oxysporum*, patojenine ait bantlar gözlenemezken, *S. prolificans*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia* ve *S. aureus* patojenine ait gen bölgeleri başarı ile tetrapleks olarak amplifiye edildi.

Magnezyum klorür, kalıp DNA ve dNTP'ler gibi PCR bileşenleri ile etkileşime giren, DNA stabilitesini artırarak erime sıcaklığını artıran ve aynı zamanda *Taq* polimerazın bir kofaktörü olarak iyi bilinen iki değerli bir katyondur (Edwards & Gibbs, 1994.; Markoulatos et al., 2002). Yetersiz magnezyum klorür konsantrasyonu, PCR reaksiyonunun başarısız olmasına veya yetersiz

amplifikasyona neden olabilir. *C. albicans* ve *F. oxysporum* için PCR başarısızlığının üstesinden gelmek için, aynı döngü koşulları ile magnezyum klorür gradient PCR (1,5 mM-3,0 mM) hazırlandı. Sonuç olarak, korunmuş altı bölgenin multipleks amplifikasyonunun, 3 mM magnezyum klorür konsantrasyonunda gerçekleştiği tespit edildi. Ek olarak, *IleS* bölgesinin amplifikasyonu nispeten verimli olarak gerçekleştiği belirlendi. 1300 bp civarında spesifik olmayan yine de tespit edilmiş olup altın nanopartiküllerin PCR verimliliği üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla bu minör problem ihmal edildi.

#### 4.5 Nano-multipleks PCR

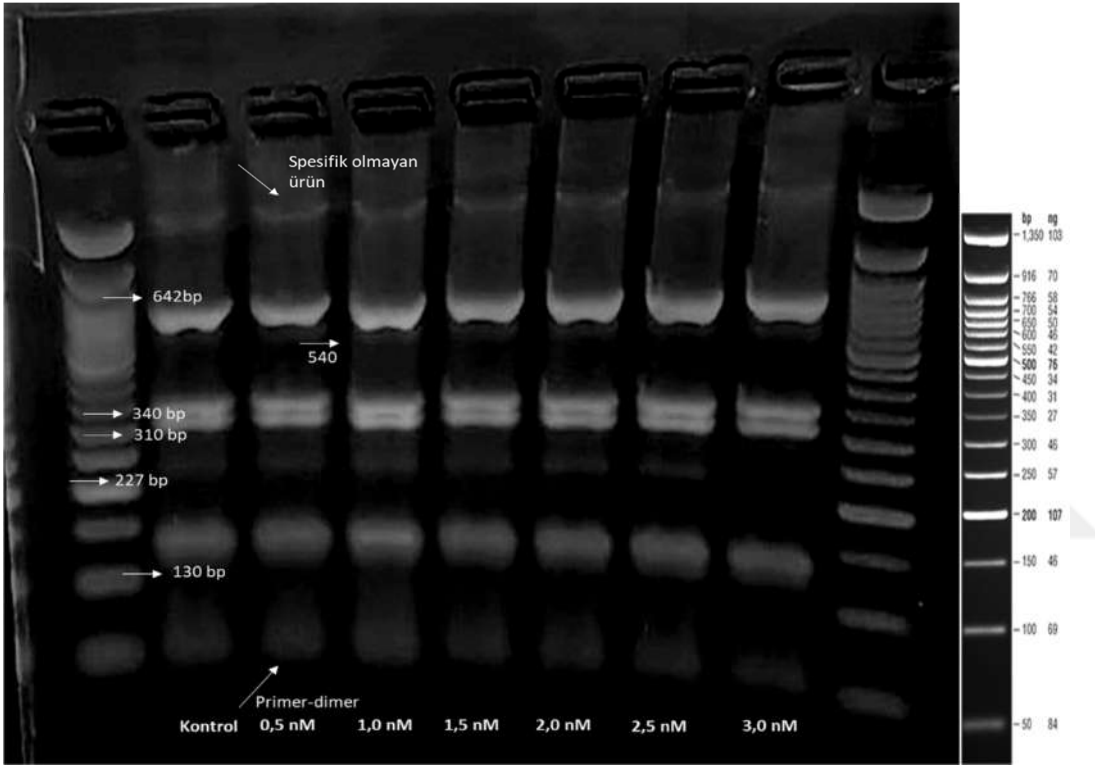
Nanomalzemelerin geliştirilen multipleks PCR reaksiyonu üzerine etkileri araştırılması amacıyla nanopartiküllerin altı patojene tür-spesifik olarak tasarlanan, non-spesifik bantlar ve primer-dimerleri gibi oluşumlara eğilimli PCR reaksiyonunun etkinliği üzerine etkisi belirlendi.

#### 4.6 Altın Nano-multipleks PCR

Altın nanopartiküller, eşsiz optik özellikleri, stabil olmaları, biyoyumlu olmaları, sentezlerinin ve yüzey modifikasyonlarının kolay oluşu gibi nedenlerle biyoanalitik alanlarda en yaygın olarak kullanılan nanomalzemelerdir. Literatürde, altın nanopartiküllerin PCR bileşenlerini yüzeyinde adsorblayarak *Taq* DNA polimerazın etkinliğini düzenlediği, termal iletkenliği artırarak reaksiyonun ısınma ve soğuma aşamalarını hızlandırdığı ya da katalitik aktivite gösterip böylece PCR'ın etkinliğini artırdığı rapor edilmektedir. Nanomolar konsantrasyonlarda altın nanopartiküllerin reaksiyona eklenmesi ile PCR hassasiyeti ve spesifikliğin artırılarak PCR verimine katkı sağlandığı bildirilmiştir (Ali et al., 2018; H. Li et al., 2005; Yang et al., 2022).

Bu kısımda altın nanopartiküllerin bölüm 4.4'te geliştirilen multipleks PCR reaksiyonuna etkisinin belirlenmesi ve araştırılması amaçlandı. Bu sistem, çoklu primer ve kalıp içermesi, patojen tayin yöntemi gereksinimleri, farklı ürün oluşturma özellikleri, farklı kalıp türleri içermesi, hatalı sonuç verme eğilimi gibi nedenlerden dolayı altın nanopartiküllerin PCR üzerindeki etkilerini araştırmak için ideal bir sistemdir. Bu doğrultuda 0,5-3,0 nM aralığında değişen

konsantrasyonlarda 10 nm altın nanopartiküller PCR reaksiyonuna eklendi. Termal döngü koşulları 95 °C’de 3 dk başlangıç denatürasyonu, 95 °C’de 30 sn denatürasyon, 53 °C’de 30 sn primer bağlanması, 72 °C’de 1 dk uzama ve 72 °C’de 5 dk final uzaması şeklinde ayarlanarak sabit tutuldu. 30 döngülük PCR sonrası ürünler, EtBr içeren %2’lik agaroz jel elektroforezinde 100-120 dk yürütüldü. Amplikonlar, inkübasyon sonrası agaroz jel elektroforezinde, NEB markeri varlığında UV ışık altında görüntülendi.

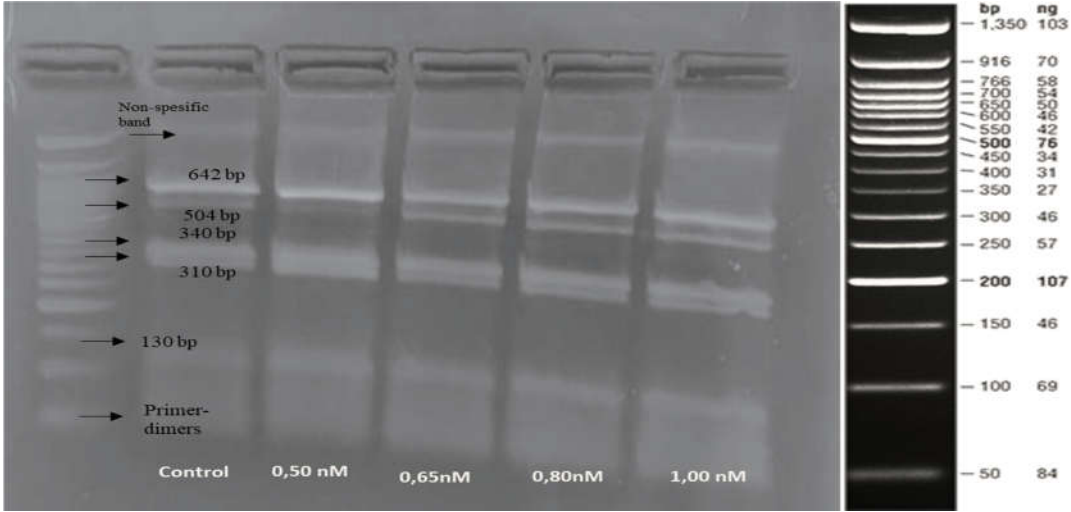


**Şekil 4. 16** Nanopartikül konsantrasyonlarının PCR üzerine etkisi.

Şekil 4.16 ‘de verilen PCR ürünlerinin olduğu agaroz jel incelendiğinde, 0,5 nM ve 1,0 nM altın nanopartiküllerin eklendiği reaksiyonların yüklendikleri kuyucuklardan görüntülenen PCR bantlarının daha parlak, dolayısıyla bu konsantrasyonlarda AuNP kullanıldığında PCR’ın daha verimli olduğu tespit edildi. 1,0 nM AuNP kullanıldığında tüm gen bölgelerinin amplifikasyonu daha yüksek verimle gerçekleşirken, bu konsantrasyonda primer-dimeri ve spesifik olmayan ürün amplifikasyonu değişmediği gözlemlendi. Ayrıca, 3,0 nM AuNP kullanıldığında *S. aureus* patojenine özgü gen bölgesinin amplifiye edilemediği, böylece bu kuyucukta yer alan PCR reaksiyonunun inhibe olduğu

sonucuna varıldı. Literatürde, nanopartikül boyutundan bağımsız optimum altın nanopartikül konsantrasyonu olarak, 0,02 nM, 0,6 nM, 0,7 nM, 1,6 nM, 3,2 nM gibi değerler rapor edilmiştir (S. H. Huang et al., 2008; H. Li et al., 2005; M. Li et al., 2005; Lin et al., 2009; Vu et al., 2008; Yang et al., 2022). Altın nanopartikülleri PCR'da ilk kez kullanan ve Li ve arkadaşları için, 10 nm boyutta 0,4 nM AuNP kullanıldığında PCR'ın spesifikliğı artmakta, 1,0 nM AuNP kullanıldığında ise PCR inhibe olmaktadır (H. Li et al., 2005). Bu çalışmada elde edilen ve optimum değer olarak kabul edilen 0,1 nM AuNP, Li ve arkadaşlarının rapor ettiği sonuçla örtüşmemektedir. Li ve arkadaşları, sitrat stabilize altın nanopartikül kullanılmışlardır, ki bu altın nanopartikül yüzeylerinin negatif olarak yüklenmesine, nanopartiküllerin PCR bileşenleriyle etkileşiminin değışmesine ve nükleik asitler ile arasında itme kuvvetinin oluşmuna sebebiyet verebileceğı düşölmektedir. Bu çalışmada ise altın nanopartiküller PBS içerisinde stabilize edilmiş formadır. Yani, altın nanopartiküllerin yüzey adsorban özelliklerini olumsuz etkileyecek bir yüzey yüklenmesi söz konusu değıldir. Sonuçlardaki farklıların sebebinin, altın nanopartiküllerin stabilize edildiğı çözeltinin yük durumu ile ilişkili olduğı düşünölmektedir.

Genellikle AuNP etkinliklerinin araştırıldığı çalışmalarda kullanılan altın nanopartiküllerin boyut farklılıklarına ek olarak, sentez yöntemleri, içerisinde disperse oldukları solüsyon ve pH'ı gibi nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerini anlamlı ölçüde değıştirecek parametreler de farklıdır. Örneğın; Huang ve Arkadaşları 2008'de farklı boyutlardaki altın nanopartiküllerin PCR etkinliğı üzerini etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla, sentezledikleri altın nanopartikülleri PCR'a eklemişlerdir. Çalışmadan elde edilen sonuca göre; 5.02, 10.28, 21.32, 44.41 ve 57.02 nm boyutlarda altın nanopartiküllerin sırası ile 0.25, 0.35, 0.063, 0.022 ve 0.014 nM konsantrasyonlarda PCR'a eklenmesiyle PCR ürünün daha verimli olduğunu belirtmişlerdir (J. Huang et al., 2008). Lin ve Arkadaşları (2009), altın nanopartikül konsantrasyonunu belirli bir değerde sabit tuttuklarında nanopartikül boyutu azaldıkça yani yüzey/hacim oranı arttığında PCR'ın 5.33 kat daha verimli gerçekleştiğini rapor etmişlerdir (Lin et al., 2009).



**Şekil 4. 17** 0,5-1,0 nM Altın nanopartiküllerin multipleks PCR'a etkisi (5 ng kalıp).

Vu ve arkadaşları (2008)'de yaptıkları ve altın nanopartiküllerin PCR'a olan etkisini inceledikleri çalışmada AuNP'lerin PCR spesifikliğı üzerine bir etkisi olmadığını fakat kısa ürünlerin amplifikasyonlarını uzun ürünlere kıyasla daha çok desteklediğini rapor etmiştir (Vu et al., 2008). Bu çalışmada geliştirilen sistem 120 bp-642 bp aralığında ürün içerdiğinden bu görüşü test etmek için uygun bir platformdur. Altın nanopartikül konsantrasyonlarının etkin olduğu skalayı belirlemek amacıyla 0,50-1,00 nM AuNP aralığında nano-multipleks PCR yeniden hazırlandı ve amplikonlar agaroz jel ile yeniden analizlendi (Şekil 4.18). Buradan elde edilen sonuçlara göre, Vu ve arkadaşlarının (2008) öne sürdüğünün aksine altın nanopartiküllerin PCR'a etkisinin ürün boyutuyla bir ilgisi saptanmadı. Fakat, 0,5 nM AuNP kullanıldığında fungal türlere özgü gen bölgelerinin amplifikasyonunun daha verimli gerçekleştiğı tespit edildi (Şekil 4.17). Ek olarak, primer-dimer oluşumunda azalış gözlenirken spesifik olmayan üründe bir değişim gözlenmedi. Lou ve Zhang (2013), 0,02 nM sitrat stabilize Altın nanopartikül kullanarak Amilogenin genlerini daha etkin bir şekilde amplifiye ettiklerini rapor etmişlerdir. Lou ve Zhang'a göre 0,02 nM AuNP kullanıldığında primer-dimer oluşumları azalmakta, PCR ürünü daha yüksek verimle amplifiye edilmektedir (Lou & Zhang, 2013). Nanopartiküllerin PCR üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda hedeflenen gen bölgeleri farklılık gösterdiği gibi kalıp DNA'ların da farklı büyüklükte ve özellikte olduğu unutulmamalıdır. Gabriel ve arkadaşlarının (2018) çalışmasında, beyin yiyen amipler için nano-PCR geliştirilmiş ve her bir mikrobiyal tür için farklı türde ve

farklı konsantrasyonda nanopartikülün optimum olduğunu rapor etmişlerdir. (Gabriel et al., 2018). Bu çalışmadan elde edilen bulgular, 0,5 nM konsantrasyonlarda AuNP kullanıldığında fungal türlere özgü daha kompleks yapıda olan genomun daha etkin bir şekilde amplifiye edildiği kaydedildi. Havadaki biyolojik (bakteri ve virüs) partikülleri, domuz parvovirüsü, domuz bocavirüsü, ensefalomiyokardit virüsü, vizon enterit virüsü (MEV), japon ensefalit virüsü, domuz salgını ishal virüsü dahil olmak üzere nanopartiküllerin tanısal PCR'a olan etkilerini araştırmak için çeşitli araştırma çalışmaları yapılmıştır (Bkz.Tablo 1.3). Bilgimiz dahilinde bu çalışma, fungal PCR'da nanopartiküllerin etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

Bu çalışmada elde edilen veriler ışığında 10 nm boyutta 0,5-1,0 nM aralığında AuNP kullanıldığında AuNP'lerin amplifikasyon düzeyini artırarak PCR verimini anlamlı ölçüde arttığı tespit edildi. Ek olarak, primer-dimeri oluşumunun azalttığı belirlendi. Bu sonucun, AuNP'lerin termal iletkenlik özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Özellikle, AuNP eklendiğinde *P. aeruginosa* organizmasına ait *oprL* geninin amplifikasyonun kontrol reaksiyona göre iyi bir şekilde amplifiye edilmesi bu görüşü desteklemektedir. *P. aeruginosa* genomik DNA'sı reaksiyondaki diğer patojenler arasında %GC içeriği %67,2 ile en olan mikroorganizmadır. Termal iletkenlikteki artış sayesinde döngü esnasında ısınma ve soğuma adımlarının daha hızlı gerçekleşmesi, böylelikle çift iplikli DNA'nın ayrılmasının kolaylaşması ve primer bağlanmalarının daha etkin olması, dolayısıyla PCR veriminin artması şeklinde etkilediği tahmin edilmektedir. Fakat verimdeki bu artışın yalnızca termal iletkenlikten kaynaklandığı söylemek bu aşamada yetersizdir, çünkü bu çalışmada 0,5 nM AuNP kullanıldığında fungal türlere özgü genomik DNA'ların seçici bir şekilde daha iyi amplifiye olduğu sonucuna varıldı. Daha kompleks yapıda olan fungal genomik DNA ile AuNP arasında seçici bir etkileşim olduğu açıktır. Nanopartiküllerin içerisinde disperse olduğu çözeltilerin yük farklılığından yola çıkılarak nanopartiküllerin yüzey etkileşimlerinin de reaksiyon verimi üzerine etkili olduğu sonucu çıkarıldı. Fakat, spesifik olmayan bantlarda herhangi bir değişme gözlenmemesiyle AuNP'lerin reaksiyon spesifikliğine herhangi bir etkisinin olmadığı sonucuna varıldı.

## 5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Hastane kaynaklı enfeksiyonların %50'sinin önlenmesi, etkin ve uygulanabilir yöntemlerle bu hastalıkların neden olduğu hasta mağduriyetinin, kronik rahatsızlıkların, hastaya ve hastaneye yüklenen ekstra finansal yüklerin ve ölümlerin önüne geçilebileceği anlamına gelmektedir. Hasta bakımı ve tedavisi için sağlık kuruluşlarında geliştirilebilecek hijyenik uygulamalar, hastane havalandırma sistemlerinin geliştirilmesi, sterilizasyon ve dezenfeksiyon uygulamalarının etkinleştirilmesi ve geliştirilmesi, antimikrobiyal terapi gibi önlemler, hastane kaynaklı enfeksiyonlarla mücadele yöntemlerinden bazılarıdır.

El hijyeni, çevresel temizlik ve sanitasyon, medikal ekipmanların sterilizasyonu gibi önlemlerin etkin bir şekilde uygulanabilmesi ve uygun yöntemlerin seçimi için baskın veya çekinik mikrobiyal floranın belirlenmesi önemlidir. Bu flora göre kullanılacak hijyenik deterjanlar ve sabunlar, dezenfektanlar ve antimikrobiyal ajanların belirlenmesi gerekmektedir. Buna ek olarak, enfeksiyona neden olan patojen tespitinden önce geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının antimikrobiyal direnç katkısına neden olduğu bilinmektedir.

Sağlık kuruluşlarında kateter, ventilatör, şırınga gibi tedavi ekipmanları ve gereçleri, hava, yüzey gibi floralar gram negatif ve gram pozitif bakteriler, virüsler, genellikle hifleriyle yüzeylerde tutunabilen maya ve funguslar gibi organizmalarca kontamine olabilmektedir. Bu floranın uygun mikrobiyal tanı yöntemleriyle mümkün olan en kısa sürede tespit edilmesi gerekli enfeksiyon kontrol adımlarının belirlenebilmesi ve zamanında uygulanabilmesi için esansiyeldir.

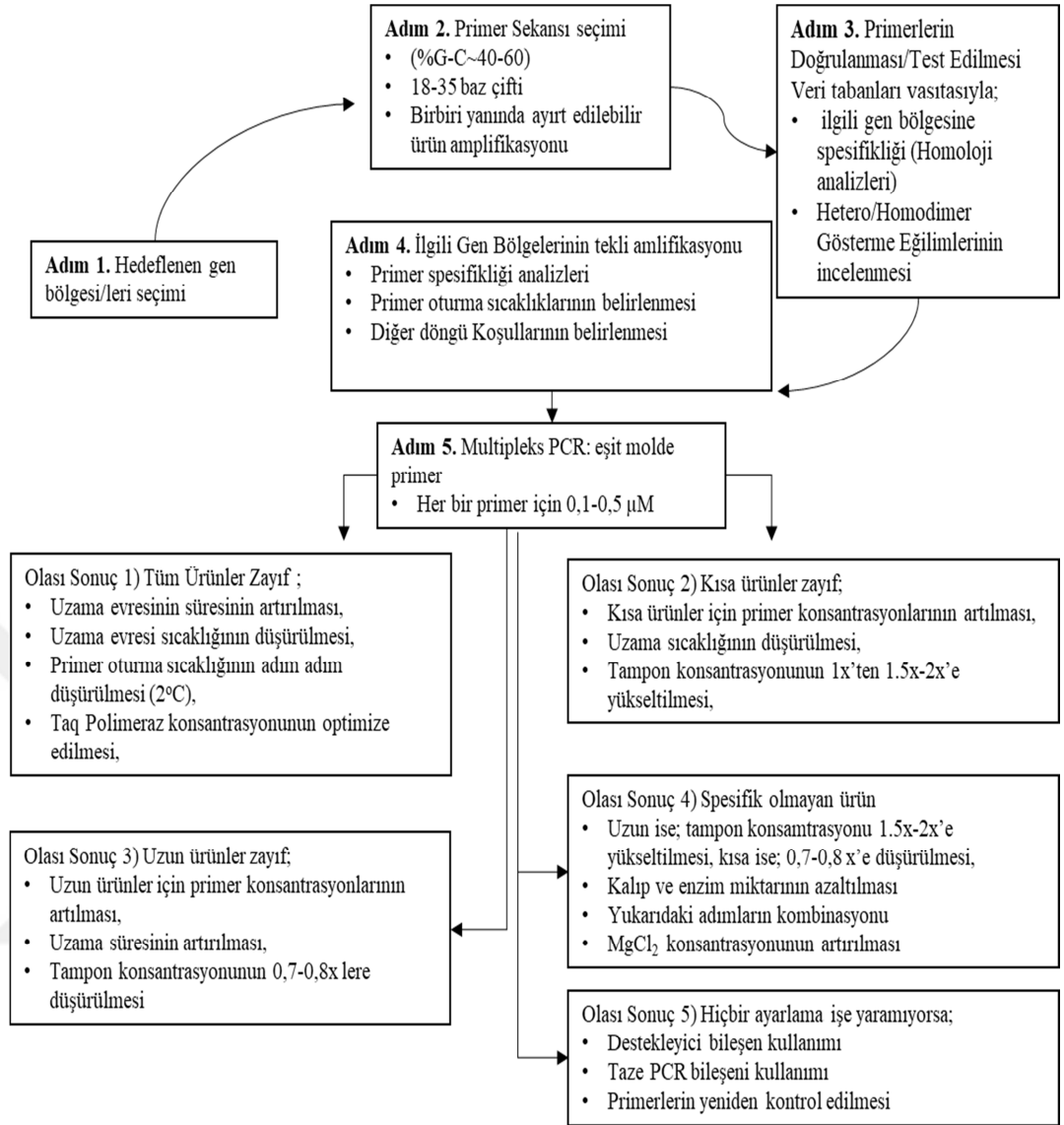
Nükleik asit temelli, organizmaların değişmeyen genetik özelliklerini kullanan tanı yöntemleri rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında en sık kullanılan ve değişen geleneksel kültür koloni temelli yöntemlere kıyasla hassas, hızlı ve spesifik oluşlarıyla iyi bir alternatif olma konumundadır. Bunun yanı sıra bu yöntemler, enfeksiyon kontrol stratejilerinin belirlenmesinde ve buna bağlı hastalıkların önlenmesi açısından kritik avantajlara sahiptir. Ayrıca, birden

fazla patojenin aynı anda tanımlanmasına yönelik uygulamalara da adapte edilebilirler. Böylece, finansal açıdan yük azaltılabilir, ölümler önlenir ve antimikrobiyal direncin önüne geçilebilir.

Mikrobiyal tanıda PCR yöntemi, genellikle 'end-point' yani 'var-yok' testi amacıyla hızın, spesifikliğin, hassasiyetin ve doğruluğun esansiyel olduğu alanlarda kullanılabilir en uygun yöntemdir. Bu yöntemlerin çoklu analize elverişli oluşları ve aynı anda birden çok patojeni araştırma imkanı tanınması yöntemi daha avantajlı konuma getiren özelliklerindedir. Bu şekilde, maliyetler de tekli analizlere göre düşük olur ve bu yöntemlerin rutin tanıya adapte edilebilmesini kolaylaştırır. Multipleks PCR'ın rutin tanıda kullanılma potansiyeli birden fazla patojeni aynı anda test edebilmeye olanak tanınmasıyla oldukça yüksektir. Ayrıca multipleks PCR, birkaç önemli dizayn adımlarının uygulanmasıyla her patojen tipi ya da grubu için uygulanabilir bir yöntemdir. Dizayn aşamasında kaynak olarak kullanılacak veritabanları halk kullanımına açık ve yorumlamaları oldukça basittir. Multipleks PCR yöntemini zor kılan unsur, optimizasyon gereksinimidir. Çoğunlukla karşılaşılan problemlere çözüm üretmek deneyim ve alanda uzmanlık gerektirir. Bu problemlerin çözümü için PCR'ın keşfinden günümüze kadar çeşitli stratejiler geliştirilmektedir ve yöntemin kullanımının artırılması ve yaygınlaşması için çalışmalar devam etmektedir.

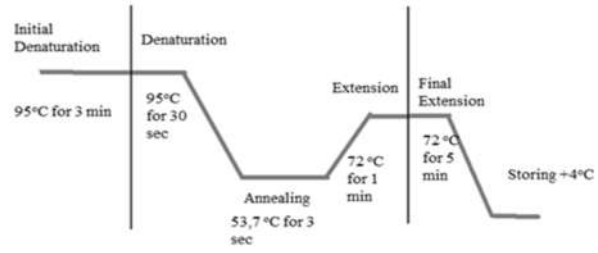
Bu tez çalışmasında ülkelerin gelişmişlik düzeyi farketmeksizin ölümlere, finansal yüklerle ve hasta mağduriyetine yol açan hastane kaynaklı enfeksiyonlarda sıklıkla karşılaşılan bakteriyel ve fungal türler olan *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *F. oxysporum* ve *S. prolificans* organizmalarını aynı anda hassas, spesifik ve hızlı bir şekilde tayin etmeye yarayacak multipleks PCR koşulları belirlendi (Şekil 5.2). Bu amaçla, patojen mikroorganizmalar, referans stok kültürlerinden genel içerik açısından zengin besiyerlerinde önce metabolik olarak aktive etmek daha sonra da sayılarını artırmak amacıyla kültive edildi. Burada amaç, PCR'da kalıp materyal olarak kullanılacak genomik DNA'ların izole edileceği başlangıç materyali elde etmektir. Kalıp DNA, hücre bileşenlerinin mekanik ve kimyasal yöntemlerle parçalanarak genomik DNA'nın izole edilmesiyle elde edildi. Ardından yukarıda türleri belirtilen patojenlerin genomlarında korunmuş 'house-keeping' genleri, tür

spesifik primer setleriyle hedeflenerek bu gen bölgelerinin amplifikasyonları sağlandı ve agaroz jel elektroforezi ile bu amplifikasyonlar analiz edildi. Primer setlerinin multipleks PCR için uygunluğu, deneysel aşama öncesi veritabanları vasıtasıyla incelendi, oluşan amplikonların birlikte analizlenebilirliği boyut gradienti oluşturularak sağlandı. Deneysel aşamada karşılaşılan problemlerin çözümüne yönelik PCR koşulları optimize edildi. Spesifik olmayan amplifikasyonlar ve düşük PCR verimi gibi istenmeyen durumlara eğilimli olan multipleks PCR yöntemine, güçlü adsorban ve termal iletkenlik gibi özellikleriyle daha etkin PCR gerçekleştirmeye yaradığı rapor edilen altın nanopartiküllerin etkisi araştırıldı. Sonuç olarak, reaksiyon karışımlarına nanomolar konsantrasyonlarında direkt eklenerek etkinliği araştırılan AuNP'lerin PCR etkinliğini artırdığı tespit edildi. Ek olarak, bir multipleks PCR yöntemi geliştirebilmek için deneysel çalışmalar öncesi göz önüne alınması gereken unsurlar ortaya koyulup, adım adım geliştirilmesi gereken parametreler belirlendi. Bu çalışmada elde edilen deneyimler ve literatürde en sık karşılaşılan çözüm yöntemleri özetlenip adım adım multipleks PCR geliştirme basamakları Şekil 5.1'de gösterildiği gibidir (Edwards & Gibbs, 1994.; Markoulatos et al., 2002).



**Şekil 5. 1** Adım adım multipleks PCR geliştirme basamakları ( Edwards & Gibbs, 1994.; Markoulatos et al., 2002; modifiye edilmiştir)

Component	Final Concentration
10x Taq Buffer	X (20 mM)
MgCl <sub>2</sub>	3,0 mM
dNTP set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	100 µM
Forward primer (KpF, PaF', FoF', SaF, ProF)	10 pmol
Forward Primer (CaF)	25 pmol
Reverse Primer (KpR, PaR', FoR, SaR, ProR)	10 pmol
Reverse Primer (CaR)	25 pmol
Template DNA	10 ng
Taq DNA Polymerase	2,5 Unit
Gold Nanoparticles	1,0 nM
Total Volume	50 ml



**Şekil 5. 2** HKE tespitinde kullanılabilir tanı yöntemi için multipleks PCR koşulları.

Bu tez çalışmasında geliştirilen tayin platformu, CAUTI, CLABSI, VAP veya SSI gibi hastane kaynaklı enfeksiyonların tespitinde kullanılabilir hızlı, hassas ve spesifik bir yöntem olarak erken teşhis, verimli tedavi ve enfeksiyon kontrol stratejilerini geliştirmek için çok yönlü bir araç olma potansiyeli taşımaktadır. İleriye yönelik çalışmalarda, moleküler tanı kitine dönüştürülebilir potansiyelinin değerlendirilmesi ve farklı tip enfeksiyonların tanısında kullanılmak üzere yeni moleküler tanı sistemlerinin geliştirilmesi hedeflenmektedir.

## 6.KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ã, P. K. M., Fox, R. T. V, and Culham, A.,** 2003, Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identi ç cation of pathogenic Fusaria, *FEMS Microbiology Letters*, 218 329–332 pp.
- Aamir, S.,** 2015, A rapid and efficient method of fungal genomic DNA extraction, suitable for PCR based molecular methods, *Plant Pathology & Quarantine*, 5(2), 74–81 pp.
- Abdul Khaliq, R., Sonawane, P. J., Sasi, B. K., Sahu, B. S., Pradeep, T., Das, S. K., and Mahapatra, N. R,** 2010, Enhancement in the efficiency of polymerase chain reaction by TiO<sub>2</sub> nanoparticles: crucial role of enhanced thermal conductivity, *Nanotechnology*, 21(25), 255704 (11p).
- Agne, M., Valones, A., Rafael., Guimarães, L., Lucas., Cavalcanti Brandão, A., Paulo., Eleutério De Souza, R., De Albuquerque, A., Carvalho, T., and Crovela, S.,** 2009, principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review, *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 1–11 pp.
- Ali, Z., Jin, G., Hu, Z., Wang, Z., Khan, M. A., Dai, J., and Tang, Y.,** 2018, A Review on NanoPCR: History, Mechanism and Applications, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 18(12), 8029–8046 pp.
- Al-Jailawi, M., and Zedan, T.,** 2014, Multiplex-PCR assay for identification of *Klebsiella pneumoniae*, In *Article in International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* (Vol. 26, Issue 1) Article No. 18, 112-117 pp.
- Baquero, C., Montero, M., and Sentandreu, R,** 2002, Identification of *Candida albicans* by polymerase chain reaction amplification of a *CaYST1* gene intron fragment, *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 80-83 pp.
- Bittar, E. Edward., and Bittar, Neville,** 1996, Molecular and cellular genetics, *Principles of Medical Biology*, Volume 5, 271-288 pp.
- Center for Disease Control and Prevention,** 1971, <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=2804> , (Erişim Tarihi: 09 Mayıs 2023)
- Center for Disease Control and Prevention,** 2014, “Types of Healthcare-associated Infections”, <https://www.cdc.gov/hai/infectiontypes.html> , (Erişim Tarihi:13 Nisan 2023)
- Center for Disease Control and Prevention,** 2022, “CDC’s Core Infection Prevention and Control Practices for Safe Healthcare Delivery in All Settings”, <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/core-practices/index.html> , (Erişim Tarihi: 13 Nisan 2023)

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Champney, W. S.**, 2020, Antibiotics targeting bacterial ribosomal subunit biogenesis, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 75, Issue 4, 787–806 pp,
- Chandler, L. J., Rocco Lasala, P., and Whittier, S.**, 2016, Rapid Devices and Instruments for the Identification of Aerobic Bacteria, *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology*, International edition, second edition 21-50 pp.
- Chevet, E., Lematitre, G., and Doron Katinka, M.**, 1995, Low concentrations of tetramethylammonium chloride increase yield and specificity of PCR, In *Nucleic Acids Research* Vol. 23, Issue 16, 3343-3344 pp.
- Cižman, M., and Srovin, T. P.**, 2018, Antibiotic consumption and resistance of gram-negative pathogens (collateral damage), *GMS Infectious Diseases*, Vol. 6, ISSN 2195-8831, 9 p.
- Cole, L., and Kramer, P. R.**, 2016, Bacteria, Virus, Fungi, and Infectious Diseases, In *Human Physiology, Biochemistry and Basic Medicine*, 193–196 pp
- Cui, D., Tian, F., Kong, Y., Titushikin, I., and Gao, H.**, 2004, Effects of single-walled carbon nanotubes on the polymerase chain reaction, *Nanotechnology*, 15(1), 154–157 pp.
- Cui, Y., Wang, Z., Ma, X., Liu, J., and Cui, S.**, 2014., A sensitive and specific nanoparticle-assisted PCR assay for rapid detection of porcine parvovirus, *Letters in Applied Microbiology*, 58(2), 163–167 pp.
- Cutuli, M. T., Gibello, A., Rodriguez-Bertos, A., Blanco, M. M., Villarroel, M., Giraldo, A., and Guarro, J.**, 2015, Skin and subcutaneous mycoses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) caused by *Fusarium oxysporum* in coinfection with *Aeromonas hydrophila*, *Medical Mycology Case Reports*, 9, 7–11 pp.
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M. J., and Dveksler, G. S.**, 1993, *PCR methods and applications* 3(3), 30–37 pp.
- Drummond, R. A., Desai, J. V., Ricotta, E. E., Swamydas, M., Deming, C., Conlan, S., Quinones, M., Matei-Rascu, V., Sherif, L., Lecky, D., Lee, C. C. R., Green, N. M., Collins, N., Zelazny, A. M., Prevots, D. R., Bending, D., Withers, D., Belkaid, Y., Segre, J. A., and Lionakis, M. S.**, 2022, Long-term antibiotic exposure promotes mortality after systemic fungal infection by driving lymphocyte dysfunction and systemic escape of commensal bacteria. *Cell Host and Microbe*, 30(7), 1020-1033 pp

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Edwards, M. C., and Gibbs, R. A.,** 1994, Multiplex PCR : Advantages , Development , and Applications, *PCR methods and applications*, 3(4), 65–75 pp.
- Exner, M., & Bhattacharya, S.,** 2020, Chemical disinfection in healthcare settings: critical aspects for the development of global strategies *GMS Hygiene and Infection Control* 2020, Vol. 15, ISSN 2196-5226
- Farell, E. M., and Alexandre, G.,** 2012, Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates, *BMC Research Notes*, 5:257 pp.
- Gabriel, S., Rasheed, A. K., Siddiqui, R., Appaturi, J. N., Fen, L. B., and Khan, N. A.,** 2018, Development of nanoparticle-assisted PCR assay in the rapid detection of brain-eating amoebae, *Parasitology Research*, 117(6), 1801–1811 pp.
- Green, M. R., and Sambrook, J.,** 2019, Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor protocols*, 2019(2)
- Gupta, N.,** 2019, DNA extraction and polymerase chain reaction, *Journal of Cytology*, 36(2), 116–117 pp.
- Hardjasa, A., Ling, M., Ma, K., and Yu, H.,** 2010, Investigating the Effects of DMSO on PCR Fidelity Using a Restriction Digest-Based Method, *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI) Vol. 14:* 161-164 pp.
- Hecker, K. H., and Roux, K. H.,** 1996, High and Low Annealing Temperatures Increase Both Specificity and Yield in Touchdown and Stepdown peR, In *BioTechniques*, Vol. 20 (3):478-485 pp.
- Huang, J., Zhang, X., Wang, C., Wang, L., Li, H., Cao, X., Zhang, A., Li, X., Fan, C., and Hu, J.,** 2008, Size and surface effect of gold nanoparticles (AuNPs) in nanogold-assisted PCR. *Surface Review and Letters*, 15(6), 757–762 pp.
- Huang, S. H., Yang, T. C., Tsai, M. H., Tsai, I. S., Lu, H. C., Chuang, P. H., Wan, L., Lin, Y. J., Lai, C. H., and Lin, C. W.,** 2008., Gold nanoparticle-based RT-PCR and real-time quantitative RT-PCR assays for detection of Japanese encephalitis virus, *Nanotechnology*, 19(40):405101
- Kadri, K.,** 2020, “Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications”, *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*,

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- <https://www.intechopen.com/chapters/67558> , (Erişim tarihi: 14 Nisan 2023)
- Kambli, P., and Kelkar-Mane, V.**, 2016a, Nanosized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> an efficient PCR yield enhancer-Comparative study with Au, Ag nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 141, 546–552 pp.
- Kambli, P., and Kelkar-Mane, V.**, 2016b, Nanosized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> an efficient PCR yield enhancer-Comparative study with Au, Ag nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 141, 546–552 pp.
- Kamel, F. H.** , 2021, “Essentials of Bacteriology and Immunology”, [https://www.researchgate.net/publication/290911856\\_Essentials\\_of\\_Bacteriology\\_and\\_Immunology/citation/download](https://www.researchgate.net/publication/290911856_Essentials_of_Bacteriology_and_Immunology/citation/download), (Erişim Tarihi: 14 Nisan 2023).
- Khan Academy**, 2016 “Polymerase Chain Reaction”, <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr> , (Erişim Tarihi: 13 Nisan 2023)
- Kim, J. H., Rhim, S. R., Kim, K. T., Paik, H. D., and Lee, J. Y.**, 2014, Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus* in low-fatted milk by multiplex PCR, *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 34(5), 717–723 pp.
- Krom, B. P.**, 2017, *Candida albicans* alters the bacterial microbiome of early in vitro oral biofilms. *Journal of Oral Microbiology*, 9(1), 0–10 pp.
- Lebedev, A. V., Paul, N., Yee, J., Timoshchuk, V. A., Shum, J., Miyagi, K., Kellum, J., Hogrefe, R. I., and Zon, G.**, 2008, Hot Start PCR with heat-activatable primers: A novel approach for improved PCR performance, *Nucleic Acids Research*, 36(20) e131.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., and Kim, Y. H.**, 2012, Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments, *Journal of Visualized Experiments*, (62), 3923, 5 p.
- Li, H., Huang, J., Lv, J., An, H., Zhang, X., Zhang, Z., Fan, C., and Hu, J.**, 2005, Nanoparticle PCR: Nanogold-Assisted PCR with Enhanced Specificity, *Angewandte Chemie*, 117(32), 5230–5233 pp.
- Li, M., Lin, Y. C., Wu, C. C., and Liu, H. S.**, 2005, Enhancing the efficiency of a PCR using gold nanoparticle, *Nucleic Acids Research*, 33(21) e184.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lin, Y. C., Su, C. C., and Wu, H. L.,** 2009, Nanoparticle size effect on the amplification efficiency of Nano-PCR, *Institute of Basic Medical Sciences, National Cheng Kung University , Tainan , Taiwan Department of Engineering Science*,1798–1801 pp.
- Liu, Z., Li, J., Liu, Z., Li, J., Li, Z., Wang, C., Wang, J., and Guo, L.,** 2019, Development of a nanoparticle-assisted PCR assay for detection of bovine respiratory syncytial virus. *BMC Veterinary Research*, 15:110, 6 p.
- Lou, X., and Zhang, Y.,** 2013, Mechanism studies on nanoPCR and applications of gold nanoparticles in genetic analysis, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 5(13), 6276–6284 pp.
- Markoulatos, P., Sifakas, N., and Moncany, M.,** 2002, Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16(1), 47–51 pp.
- Markwart, R., Willrich, N., Haller, S., Noll, I., Koppe, U., Werner, G., Eckmanns, T., and Reuss, A.,** 2019, The rise in vancomycin-resistant enterococcus faecium in germany: Data from the german antimicrobial resistance surveillance (ars), *Antimicrobial resistance and infection control* 147 (8), 11p.
- Mothershed, E. A., and Whitney, A. M.,** 2006, Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: Present and future considerations for the clinical laboratory, *Clinica Chimica Acta*, Vol. 363, Issues 1–2, 206–220 pp
- Mullis, KB.,** 1990, The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction, *Sci Am.* 1990;262(4):56-65 pp.
- Musso, D., and Raoult, D.,** 1997, Serological cross-reactions between *Coxiella burnetii* and *Legionella micdadei*, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 4(2), 208–212 pp.
- Musso, D., and Raoult, D.,** 1997, Serological cross-reactions between *Coxiella burnetii* and *Legionella micdadei*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 4(2), 208–212 pp.
- Musso, M., Bocciardi, R., Parodi, S., Ravazzolo, R., and Ceccherini, I.,** 2006, Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences. *The Journal of Molecular Diagnostics :JMD*, 8(5), 544–550 pp.
- Nikiforova, M. N., LaFramboise, W. A., and Nikiforov, Y. E.,** 2015,. Amplification-Based Methods. *Clinical Genomics*, 57–67pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Otašević, S., Momčilović, S., Stojanović, N. M., Skvarč, M., Rajković, K., and Arsić-Arsenijević, V.**, 2018, Non-culture based assays for the detection of fungal pathogens, *Journal de Mycologie Medicale*, 28(2), 236–248 pp.
- Perales, C., Cava, F., Meijer, W. J. J., and Berenguer, J.**, 2003, Enhancement of DNA, cDNA synthesis and fidelity at high temperatures by a dimeric single-stranded DNA-binding protein, *Nucleic Acids Research*, 31(22), 6473–6480 pp
- Qin, T., Wang, J., and Cui, S. J.**, 2021, Development of a nanoparticle-assisted PCR assay to distinguish canine coronaviruses I and II, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 33(1), 104–107 pp.
- R, A. K., Kafafy, R., Salleh, H. M., and Faris, W. F.**, 2012, Enhancing the efficiency of polymerase chain reaction using graphene nanoflakes, *Nanotechnology*, 23(45), 455106, 8 p.
- Ravea, A. F. G., Kussb, A. V., Peila, G. H. S., Ladeirac, S. R., Villarreal, J. P. V., and Nascentee, P. S.**, 2019, Biochemical identification techniques and antibiotic susceptibility profile of lipolytic ambient bacteria from effluents. *Brazilian Journal of Biology*, 79(4), 555–565 pp.
- Rutala, W. A., and Weber, D. J.**, 2008, Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities, <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/> (Erişim Tarihi: 23.03.2023)
- Saiki, R. K., and Mcconlogue, L.**, 1988, Formamide can dramatically improve the specificity of PCR, *Nucleic Acids Research* Vol. (18), Issue 24 7465 pp.
- Shaik, G. M., Dráberová, L., Dráber, P., Boubelík, M., and Dréber, P.**, 2008, Tetraalkylammonium derivatives as real-time PCR enhancers and stabilizers of the qPCR mixtures containing SYBR Green I, *Nucleic Acids Research*, 36(15),
- Sigma Aldrich**, 2000, “PCR Product Analysis” [www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/126/112/pcr-product-analysis-guidebook.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/126/112/pcr-product-analysis-guidebook.pdf), (Erişim Tarihi: 13 Nisan 2023)
- Smith, A. and Smethley, A.**, 2011, “*Fusarium oxysporum*” [Fusarium oxysporum - microbewiki \(kenyon.edu\)](http://Fusarium.oxysporum-microbewiki(kenyon.edu)) (Erişim tarihi:13 Nisan 2023)

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- SMOBIO Technology, Inc**, <https://www.smobio.com/shop/product/tp5000-tp5000-exceltaqtm-hot-start-ii-dna-polymerase-5-u-1-500-u-309?category=1>, (Erişim Tarihi: 09.05.2023)
- Sousa, M., and Pereira, M. O.**, 2013, A prospect of current microbial diagnosis methods. *Formatex*, 1429–1438 pp.
- Stevens, A. J., Appleby, S., and Kennedy, M. A.**, 2016, Many commercial hot-start polymerases demonstrate activity prior to thermal activation, In *BioTechniques* (Vol. 61, Issue 6, 293–296 pp.
- Szabó, S., Feier, B., Capatina, D., Tertis, M., Cristea, C., and Popa, A.**, 2022, An Overview of Healthcare Associated Infections and Their Detection Methods Caused by Pathogen Bacteria in Romania and Europe, *Journal of clinical medicine*, 11(11), 3204.
- TC Sağlık Bakanlığı**, 2021, “Ulusal sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlar surveyansı ağı (USHİESA)”, [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Bulasici-hastaliklar-db/hastaliklar/SHIE/Raporlar/USHİESA\\_OZET\\_RAPOR\\_2021.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Bulasici-hastaliklar-db/hastaliklar/SHIE/Raporlar/USHİESA_OZET_RAPOR_2021.pdf), (Erişim Tarihi: 14 Nisan 2023)
- Thong KL, Lai MY, Teh C SJ, Chua KH**, 2011, Simultaneous detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* , *Acinetobacter baumannii* , *Escherichia coli* , *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* by multiplex PCR, *Trop Biomed*, 2011 Apr;28(1):21-31 pp.
- Upadhyay, A., Yang, H., Zaman, B., Zhang, L., Wu, Y., Wang, J., Zhao, J., Liao, C., and Han, Q.**, 2020, ZnO nanolower-based nanoPCR as an efficient diagnostic tool for quick diagnosis of canine vector-borne pathogens, *Pathogens*, 9(122)
- Varadaraja, K., and Skinneratb, D. M.**, 1994, Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases (Recombinant DNA; polymerase chain reaction; Ampli Tug DNA polymerase; Stoffel fragment; satellite DNA; specificity of amplification), In *Gene* Vol. 140, 1-5 pp.
- Vazquez-Pertejo, M. T.**, 2023a, “Immunologic Tests for Infectious Disease”, <https://www.msmanuals.com/professional/infectious-diseases/laboratory-diagnosis-of-infectious-disease/immunologic-tests-for-infectious-disease> , (Erişim tarihi: 14 Nisan 2023)

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vazquez-Pertejo, M. T.**, 2023b, “*Introduction to Laboratory Diagnosis of Infectious Disease*”, <https://www.msmanuals.com/professional/infectious-diseases/laboratory-diagnosis-of-infectious-disease/introduction-to-laboratory-diagnosis-of-infectious-disease> , (Erişim tarihi: 14 Nisan 2023)
- Vazquez-Pertejo, M. T.**, 2023c, <https://www.msmanuals.com/professional/infectious-diseases/laboratory-diagnosis-of-infectious-disease/microscopy> , (Erişim tarihi: 14 Nisan 2023)
- Vu, B. V., Litvinov, D., and Willson, R. C.**, 2008, Gold nanoparticle effects in polymerase chain reaction: Favoring of smaller products by polymerase adsorption, *Analytical Chemistry*, 80(14), 5462–5467 pp.
- Wang, J., Cheng, Y., Zhang, M., Zhao, H., Lin, P., Yi, L., Tong, M., and Cheng, S.**, 2015, Development of a nanoparticle-assisted PCR (nanoPCR) assay for detection of mink enteritis virus (MEV) and genetic characterization of the NS1 gene in four Chinese MEV strains, *BMC Veterinary Research*, 11(1)
- Wang, M., Yan, Y., Wang, R., Wang, L., Zhou, H., Li, Y., Tang, L., Xu, Y., Jiang, Y., Cui, W., and Qiao, X.**, 2019, Simultaneous Detection of Bovine Rotavirus, Bovine Parvovirus, and Bovine Viral Diarrhea Virus Using a Gold Nanoparticle-Assisted PCR Assay With a Dual-Priming Oligonucleotide System, *Frontiers in Microbiology*, 10.
- Wang, X., Bai, A., Zhang, J., Kong, M., Cui, Y., Ma, X., Ai, X., Tang, Q., and Cui, S.**, 2014, A new nanoPCR molecular assay for detection of porcine bocavirus. *Journal of Virological Methods*, 202, 106–111 pp.
- Wang, Z., Ali, Z., Tang, Y., Jin, G., Khan, M. A., Dai, J., and Hu, Z.**, 2018, A Review on NanoPCR: History, Mechanism and Applications, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 18(12), 8029–8046 pp,
- World Health Organization**, 2002, Guidelines on prevention and control of hospital associated infections, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/205187> (Erişim Tarihi: 13 Nisan 2023)
- World Health Organisation**, 2020, “The top 10 causes of death”, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> , (Erişim Tarihi: 28 Ekim 2022)

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Xue, Z., You, M., Peng, P., Tong, H., He, W., Li, A., Mao, P., Xu, T., Xu, F., and Yao, C.,** 2021, Taqman-mgb nanopcr for highly specific detection of single-base mutations. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 3695–3705 pp.
- Yang, Z., Shen, B., Yue, L., Miao, Y., Hu, Y., and Ouyang, R.,** 2022, Application of Nanomaterials to Enhance Polymerase Chain Reaction, In *Molecules (Basel, Switzerland)* (Vol. 27, Issue 24)
- Yang, X., Guo, R., Xie, B., Lai, Q., Xu, J., Hu, N., Wan, L., Dai, M., and Zhang, B.,** 2021, Drug resistance of pathogens causing nosocomial infection in orthopedics from 2012 to 2017: a 6-year retrospective study, *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 16(1)
- Yuan, W., Li, Y., Wang, J., Wang, J., and Sun, J.,** 2016, A nanoparticle-assisted PCR assay for the detection of encephalomyocarditis virus, *VETERINARSKI ARHIV*, 86(1), 1–8pp.
- Zhang, Z., Shen, C., Wang, M., Han, H., and Cao, X.,** 2008, Aqueous suspension of carbon nanotubes enhances the specificity of long PCR, *BioTechniques*, 44(4), 537–545 pp.
- Zhu, Y., Liang, L., Luo, Y., Wang, G., Wang, C., Cui, Y., Ai, X., and Cui, S.,** 2017, A sensitive duplex nanoparticle-assisted PCR assay for identifying porcine epidemic diarrhea virus and porcine transmissible gastroenteritis virus from clinical specimens. *Virus Genes*, 53(1), 71–76 pp.

## 7.TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince benden ilgisini, tecrübesini, bakış açısını, desteğini ve takdirini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan gurur duyduğum ve çok mutlu olduğum değerli danışmanım Doç.Dr. Serap EVRAN'a, mikrobiyoloji ve moleküler biyoloji anlamında teorik ve teknik gelişimi her daim destekleyen, beni yönlendiren ve her anlamda yol gösteren hem lisans hem de yüksek lisansta birlikte çalışma fırsatı bulduğum değerli danışmanım Öğr. Gör. Dr.Emre ERDEN KOPAR'a , deneysel aşamalarda teknik ve teorik yardımlarıyla çalışmama destek olan Ege Üniversitesi Biyokimya Bölümü moleküler biyoloji ve biyoteknoloji araştırma laboratuvarı çalışanlarına, yüksek lisans eğitimim süresince benden maddi/manevi desteği ve anlayışını esirgemeyen işverenim Biored Laboratuvar Ürünleri Ltd.Şti'ye ve çalışanlarına ve ayrıca;

- Fungal kültürler için Ege Mikal Analiz Laboratuvarına,
- Fungal izolasyon adımında teknik ve teorik desteği için Prof.Dr.Alev Haliki UZTANA'a,
- Fungal genomik DNA'ların temininde cömert desteği için Instituto de Salud Carlos III 'dan Dr. Maria José Buitrago Serna'ya,
- Çalışmamı finansal açıdan destekleyen E.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (17-FEN-009 no.lu proje),

Son olarak, her koşulda yanımda olan ve beni hep güçlü hissettiren canım ailem'e sonsuz teşekkür ederim.

## ÖZGEÇMİŞ

