

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**KUVARS KRİSTAL MİKROTERAZİ SENSÖR
KULLANILARAK YAPAY TÜKÜRÜKTE *ESCHERICHIA
COLI* ATCC 25922 BAKTERİSİNİN SENTETİK DNA İLE
GENETİK TESPİTİ**

**Hazırlayan
Kübra EROĞLU**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Çağrı SOYLU**

Yüksek Lisans Tezi

**Ağustos 2020
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**KUVARS KRİSTAL MİKROTERAZİ SENSÖR
KULLANILARAK YAPAY TÜKÜRÜKTE *ESCHERICHIA
COLI* ATCC 25922 BAKTERİSİNİN SENTETİK DNA İLE
GENETİK TESPİTİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Kübra EROĞLU**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Çağrı SOYLU**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından FBA-2016-6672 kodlu BAP projesi ile desteklenmiştir.**

**Ağustos 2020
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Kübra EROĞLU



YÖNERGEYE UYGUNLUK

“Kuvars Kristal Mikroterazi Sensör Kullanılarak Yapay Tükürükte *Escherichia coli* ATCC 25922 Bakterisinin Sentetik DNA İle Genetik Tespiti” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Kübra EROĞLU



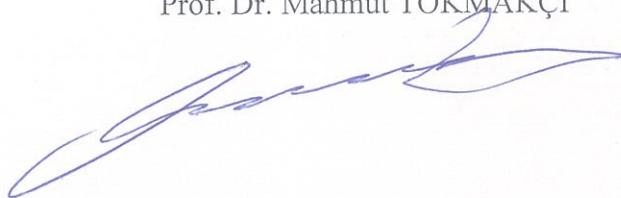
Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Çağrı SOYLU



Biyomedikal Mühendisliği Ana Bilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Mahmut TOKMAKÇI



Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Çağrı SOYLU danışmanlığında **Kübra EROĞLU** tarafından hazırlanan “**Kuvars Kristal Mikroterazi Sensör Kullanılarak Yapay Tükürükte *Escherichia Coli* ATCC 25922 Bakterisinin Sentetik DNA ile Genetik Tespiti**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyomedikal Mühendisliği** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

..... / /

JÜRİ:

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Çağrı SOYLU

Üye : Prof. Dr. Mahmut TOKMAKÇI

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Zeliha SORAN ERDEM

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... / /

Prof. Dr. Mehmet AKKURT

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bana çalıŐmalarım boyunca her tŸrlŸ yardımı ve fedakârlığı sağlayan, farklı bakıŐ açısı ile yolumu aydınlatan ve bana gŸvenen değerli hocam Dr. Őđr. Őyesi Mehmet ağrı SOYLU'ya ve tezimin ilerlemesinde yardımlarını esirgemedi, tŸm sŸre boyunca yanımda olan başta Fatma BetŸl KÖŞKER olmak Ÿzere BioMED SensŸrler Laboratuvarındaki tŸm çalışma arkadaŐlarıma buradan teŐekkŸrŸ borç bilirim.

Ayrıca zorlu ve uzun olan bu sŸrete, maddi ve manevi olarak daima yanımda olan, emeklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve çalıŐmalarım boyunca beni yŸreklendiren sevgili eŐim Emre EROĞLU'na ve değerli aileme teŐekkŸrlerimi sunarım.

KŸbra EROĞLU

Ağustos 2020, KAYSERİ

KUVARS KRİSTAL MİKROTERAZİ SENSÖR KULLANILARAK YAPAY TÜKÜRÜKTE *ESCHERICHIA COLI* ATCC 25922 BAKTERİSİNİN SENTETİK DNA İLE GENETİK TESPİTİ

Kübra EROĞLU

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2020
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Çağrı SOYLU

ÖZET

Escherichia coli (*E. coli*) bakterisi, enfeksiyonlardan kaynaklanan dünya çapındaki salgın ve ölümlerin büyük bir kısmından sorumlu olan ve bilim dünyasında en çok çalışılan mikroorganizmaların başında gelmektedir. Bu tez çalışmasında, küresel bir halk sağlığı problemi olan antibiyotik direncine sahip *E. coli* bakterisinin, yapay tükürük numunesi içerisinde, Kuvars Kristal Mikrodenge (QCM) sensör ile hızlı ve yüksek hassasiyette genetik tespitini yapabilen bir sistem sunulmaktadır. Tasarlanan sistemde, tespit işleminin tükürük sıvısı içerisinde yapılması hasta, sağlık personeli ve maliyet açısından oldukça avantaj sağlayacaktır.

Günümüzde *E. coli* bakterisinin genetik tespiti için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) altın standart olarak kabul edilmektedir. Fakat işlem süresinin uzun ve maliyetinin fazla olması gibi sebeplerden dolayı hali hazırda kullanılan yöntemlere karşı alternatif yöntemler aranmaktadır. Bu tez çalışmasında, sensör yüzeyine bağlanan analitlerin neden olduğu rezonans frekansındaki değişimlerin (Δf), nanogram seviyesinde bir hassasiyet ile ölçülmesini sağlayan Kuvars Kristal Mikrodenge (QCM) cihazı kullanılmıştır. Genetik tespite en uygun sensör yüzey modifikasyonunu elde etmek için (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPS) ve 11-merkaptoundekanoik asit (MUA) kimyasal kaplama ajanları ile çalışılmıştır. EDC/NHS çapraz bağlayıcıları ile sensör yüzeyi amin reaktif olarak işlevselleştirilmiş ve prob DNA'nın (pDNA) sensör yüzeyine immobilizasyonunun ardından, Büyükbaş Serum Albümin (BSA) bloklama işlemi yapılmıştır. Son olarak da sensör yüzeyi, 4 farklı (0 , 10^8 , 10^{10} , 10^{13} kopya/ml) sentetik hedef (veya target DNA (tDNA)) konsantrasyonuna maruz bırakıldı. Deneyler en az 3 kere tekrar edildi. Elde edilen sonuçlar model tükürükte *Escherichia coli* bakterisinin genetik tespitinin 10^8 kopya/ml hassasiyet ile DNA izolasyonu, purifikasyonu ve amplifikasyonuna gerek olmadan tespit edilebildiğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Biyosensör; QCM; *Escherichia coli*; Genetik Tespit

GENETIC DETECTION OF *ESCHERICHIA COLI* ATCC 25922 BACTERIA BY SYNTHETIC DNA IN ARTIFICIAL SALIVA USING A QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE SENSOR

Kübra EROĞLU

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences
Master Science Thesis, August 2020
Supervisor: Assist. Prof. Mehmet Çağrı SOYLU

ABSTRACT

Escherichia coli (*E. coli*) bacteria is one of the most studied microorganisms in the scientific world, responsible for most of the worldwide epidemics and deaths caused by infections. In this thesis, a system capable of rapid and high-precision genetic determination of the *E. coli* bacteria with antibiotic resistance, which is a global public health problem, in the artificial saliva sample, with a Quartz Crystal Microbalance (QCM) sensor. In the designed system, carrying out the detection process in saliva will provide a great advantage in terms of patient, healthcare personnel and financial means.

Today, polymerase chain reaction (PCR) has been accepted as the gold standard for the genetic detection of *E. coli* bacteria. However, alternative methods are sought against the currently used methods for reasons such as long processing time and high cost. In this thesis study, Quartz Crystal Microbalance (QCM) device, which enables the measurement of resonance frequency (Δf) caused by analytes connected to the sensor surface, with a precision at the nanogram level, was used. Chemical coating agents were studied using (3-Mercaptopropyl) trimethoxysilane (MPS) and 11-mercaptopundecanoic acid (MUA) to obtain the most suitable sensor surface modification for genetic detection. The sensor surface was amine reactively functionalized with EDC / NHS crosslinkers, and after immobilization of the probe DNA (pDNA) to the sensor surface, Bovine Serum Albumin (BSA) blocking was performed. Finally, the sensor surface was exposed to 4 different target DNA (tDNA) concentrations (0, 10^8 , 10^{10} , 10^{13} copy/ml). Each experiment was repeated at least 3 times. The results show that the genetic detection of *Escherichia coli* bacteria in model saliva can be detected with a precision of 10^8 copies/ml without the need for DNA isolation, purification and amplification.

Keywords: Biosensor; QCM; *Escherichia coli*; Genetic Detection

İÇİNDEKİLER

KUVARSA KRİSTAL MİKROTERAZİ SENSÖR KULLANILARAK YAPAY TÜKÜRÜKTE *ESCHERICHIA COLI* ATCC 25922 BAKTERİSİNİN SENTETİK DNA İLE GENETİK TESPİTİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI.	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	xi
TABLOLAR LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Gastrointestinal Enfeksiyonlar	3
1.2. <i>Escherichia Coli</i>	5
1.2.1. Tarihçe.....	5
1.2.2. Genel Özellikleri	5
1.2.3. Patojenik <i>E. coli</i> Bakterilerinin Sınıflandırması	7
1.2.3.1. Enteropatojenik <i>Escherichia Coli</i> (EPEC)	8
1.2.3.2. Enterotoksijenik <i>Escherichia Coli</i> (ETEC).....	8

1.2.3.3. Enteroinvaziv <i>Escherichia Coli</i> (EIEC)	9
1.2.3.4. Enteroagregatif <i>Escherichia Coli</i> (EAggEC / EAEC).....	9
1.2.3.5. Diffuz Agregatif <i>Escherichia Coli</i> (DAEC).....	10
1.2.3.6. Enterohemorajik <i>Escherichia Coli</i> (EHEC)	10
1.2.4. <i>Escherichia Coli</i> Bakterisinin Antibiyotik Direnci	12
1.2.5. <i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922 Suşu.....	13
1.3. Tükürük	13
1.3.1. Tükürük Bezleri	14
1.3.2. Tükürüğün Bileşenleri	16
1.3.2.1. Tükürüğün Organik Bileşenleri	17
1.3.2.2. Tükürüğün İnorganik Bileşenleri.....	18
1.3.3. Tükürüğün Fonksiyonları	19
1.3.4. Tükürük ile Hastalık Teşhisi	20
1.3.5. Erken Teşhisin Önemi.....	21
1.4. <i>Escherichia Coli</i> Tespit Yöntemleri	23
1.4.1. Kültür ve Koloniye Dayalı Yöntemler	24
1.4.2. Nükleik Asit Temelli Yöntemler	25
1.4.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	25
1.4.3. İmmünolojik Temelli Yöntemler.....	29
1.4.3.1. Enzim Bağlı İmmünosorbent Test (ELISA).....	29
1.4.4. Biyosensör Temelli Yöntemler	31
1.4.4.1. Elektrokimyasal Biyosensörler	32
1.4.4.1.1. Amperometrik Biyosensörler	32
1.4.4.1.2. Potansiyometrik Biyosensörler	32
1.4.4.1.3. Kondüktometrik (İletkenlik) Biyosensörler	33
1.4.4.1.4. İmpedimetrik Biyosensörler.....	34
1.4.4.2. Optik Biyosensörler	34

1.4.4.2.1. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Biyosensörler	35
1.4.4.2.2. Optik Fiber Biyosensörler	36
1.4.4.3. Piezoelektrik Biyosensörler.....	36
1.4.4.3.1. Piezoelektriğin Tarihçesi	36
1.4.4.3.2. Ferroelektrik Özellik	38
1.4.4.3.3. Piezoelektrik Özellik	38
1.4.4.3.4. Polarizasyon.....	39
1.4.4.3.5. Piezoelektrik Malzemeler	40
1.4.4.3.6. Piezoelektrik Malzemelerin Kullanıldığı Yerler	41
1.4.4.3.6.1. Sensör ve Aktüatör	41
1.4.4.3.6.2. Üreteç.....	42
1.4.4.3.6.3. Transdüser	43
1.5. Kuvars Kristal Mikrodenge	43
1.5.1. Kuvars	44
1.5.2. QCM'in Çalışma Prensibi	46
1.5.3. QCM Uygulamaları ve Piezoelektrik Sensörler ile Yapılan Çalışmalar	48
1.6. Çalışmanın Özgün Değeri	51

2. BÖLÜM

YÖNTEM ve MATERYAL

2.1. Materyal.....	52
2.1.1. Kimyasallar	52
2.1.2. Sentetik DNA'lar	54
2.1.3. Cihaz ve Ekipmanlar.....	54
2.1.4. Kullanılan Deney Düzenegi	55
2.2. Metot.....	56
2.2.1. QCM Sensör Temizliği.....	57
2.2.2. Yüzey Modifikasyonu.....	58

2.2.2.1. MUA ve MPS Kaplama	58
2.2.2.1.1. MUA ve MPS Solüsyonlarının Hazırlanması ve Uygulanması.....	58
2.2.2.2. EDC / NHS Kaplama	61
2.2.2.2.1. EDC / NHS Solüsyonlarının Hazırlanması ve Uygulanması.....	61
2.2.2.3. pDNA İmmobilizasyonu	63
2.2.2.3.1. pDNA Solüsyonunun Hazırlanması ve Uygulanması	63
2.2.2.4. Model Tükürük	65
2.2.2.5. BSA Bloklama	66
2.2.2.5.1. BSA Solüsyonunun Hazırlanması ve Uygulanması	66
2.2.3. tDNA Tespiti	68
2.2.3.1. tDNA Solüsyonunun Hazırlanması ve Uygulanması.....	68

3. BÖLÜM

BULGULAR ve SONUÇLAR

3.1. Deney Aşamalarının Frekans Analizi.....	70
3.1.1. 30 Dakikada Gerçekleştirilen Yüzey Modifikasyonlarının QCM ile Takibi	70
3.1.2. Metot 1 ve Metot 2 Deney Sonuçları.....	73
3.1.3. tDNA Tespitinde Yüzey Kaplama Sürelerinin Karşılaştırılması.....	75
3.1.4. Farklı tDNA Konsantrasyonlarının Frekans Analizi.....	78
3.2. İstatiksel Analiz	79

4. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

TARTIŞMA	80
KAYNAKÇA	83
ÖZGEÇMİŞ.....	95

KISALTMALAR ve SİMGELER

<u>Sembol</u>	<u>Anlamı</u>	<u>Birimi</u>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	-
InPEC	İntestinal patojenik <i>E. coli</i>	-
ExPEC	Ekstraintestinal patojenik <i>E. coli</i>	-
EPEC	Enteropatojenik <i>Escherichia Coli</i>	-
ETEC	Enterotoksijenik <i>Escherichia Coli</i>	-
EIEC	Enteroinvaziv <i>Escherichia Coli</i>	-
EAEC.	Enteroagregatif <i>Escherichia Coli</i>	-
DAEC	Diffuz Agregatif <i>Escherichia Coli</i>	-
EHEC	Enterohemorajik <i>Escherichia Coli</i>	-
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu	-
ELISA	Enzim Bağlı İmmünosorbent Test	-
QCM	Kuars Kristal Mikrodenge	-
DIW	Saf Su	-
BSA	Bovine Serum Albumin	-
PBS	Fosfat Tamponlu Serum	-
MUA	11-Mercaptoundecanoic Asit	-
MPS	(3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane	-
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> ethylcarbodiimide hydrochloride	-
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide	-
SAM	Kendiliğinden Düzenlenen Tabakalar	-
-SH	Tiyol Grubu	-
-COOH	Karboksilik Asit	-
-OH	Hidroksil Grupları	-
CFU	Coloni Forming Units	-
f	Frekans	Hz
f_0	Kristalin Temel Rezonant Frekansı	Hz
Δf	Frekans Değişimi	Hz
A	Elektrotlar Arasında Kalan Aktif Kristalin Alanı	cm ²

p_q	Kuvars Yoğunluğu	-
μ_q	AT-Kesim Kristal için Kuvarsın Kayma Genliği	-
Δm	Kütle Değişimi	g/cm^2
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit	-
pDNA	Prob DNA	-
tDNA	Target DNA	-
dk	Dakika	Saniye
s	Saniye	Saniye
M	Molar	Mol/Litre
nM	Nanomolar	Mol/Litre
pM	Pikomolar	Mol/Litre
ml	Mililitre	Litre
μl	Mikrolitre	Litre
mg	Miligram	Kilogram

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1. Dünyada <i>E. coli</i> O157:H7'nin sebep olduğu salgınlar	11
Tablo 1.2. Tükürüğün ana fonksiyonları.....	19
Tablo 1.3. Tükürük biyobelirteçleri ve tanıda kullanım alanları	22
Tablo 1.4. <i>Escherichia coli</i> tespit yöntemleri	24
Tablo 1.5. Kuvars kristal mikroterazinin kullanım alanları	48
Tablo 2.1. Sentetik DNA'lara ait özellikler	54
Tablo 2.2. Yüzey modifikasyon metotları.....	56



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Gastrointestinal enfeksiyona sebep olan organizmaların tespit oranı	4
Şekil 1.2. <i>Escherichia coli</i> bakterisinin mikroskopik görüntüsü	6
Şekil 1.3. <i>Escherichia coli</i> bakterisinin antibiyotik direnç yüzdeleri	13
Şekil 1.4. Tükürük örneği	14
Şekil 1.5. Tükürük bezleri.....	15
Şekil 1.6. Tükürüğün bileşenleri	17
Şekil 1.7. Primer tasarımı.....	26
Şekil 1.8. PCR döngü aşamaları.....	28
Şekil 1.9. Elisa çeşitleri.....	30
Şekil 1.10. Biyosensörlerin sınıflandırılması.....	31
Şekil 1.11. SPR'ın çalışma prensibini ve analitik döngünün adımlarını gösteren SPR grafiği	35
Şekil 1.12. Piezoelektrik etki, a) polarizasyon, b), c) düz piezoelektrik etki ve d), e), f) ters piezoelektrik etki	39
Şekil 1.13. Polarizasyon işlemlerinin şematik gösterimi a) polarizasyondan önce alanların rastgele yönelimi, b) elektrik alan ile yönlendirilen alanlar, c) elektrik alandan sonraki kalıcı polarizasyon.....	40
Şekil 1.14. Sensör ve aktüatör.....	42
Şekil 1.15. QCM sensör	44
Şekil 1.16. Kuvars kristali.....	45
Şekil 1.17. a) Kuvars kristalinin eksenlerinin belirlenmesi, b) AT kesim kuvars kristali.....	45
Şekil 1.18. Temel ve 3. harmonik frekansında rezonans salınım yapan bir kuvars kristal sensörünün şematik diyagramı	47
Şekil 2.1. MUA yapısı.....	51
Şekil 2.2. MPS yapısı	53
Şekil 2.3. EDC yapısı	53
Şekil 2.4. NHS yapısı	54
Şekil 2.5. QCM cihazı.....	55
Şekil 2.6. Deney düzeneği.....	56
Şekil 2.7. MUA kaplamanın yüzey ile etkileşimi (Metot 1)	59
Şekil 2.8. MPS kaplamanın yüzey ile etkileşimi (Metot 2)	60

Şekil 2.9. EDC/NHS'in MUA ile etkileşimi (Metot 1).....	62
Şekil 2.10. EDC/NHS'in MPS ile etkileşimi (Metot 2).....	62
Şekil 2.11. pDNA'nın EDC/NHS ile etkileşimi (Metot 1)	64
Şekil 2.12. pDNA'nın EDC/NHS ile etkileşimi (Metot 2)	64
Şekil 2.13. BSA'nın altın yüzey ile etkileşimi (Metot 1).....	67
Şekil 2.14. BSA'nın altın yüzey ile etkileşimi (Metot 2).....	67
Şekil 2.15. Hibridizasyon reaksiyonu (Metot 1)	69
Şekil 2.16. Hibridizasyon reaksiyonu (Metot 2)	69
Şekil 3.1. tDNA (30 Dakika MUA) tespitinin QCM ile takibi	70
Şekil 3.2. tDNA (30 Dakika MPS) tespitinin QCM ile takibi	72
Şekil 3.3. Metot 1'e ait deney aşamalarının QCM ile takibi.....	73
Şekil 3.4. Metot 2'e ait deney aşamalarının QCM ile takibi.....	73
Şekil 3.5. tDNA tespitinde MUA yüzey kaplama sürelerinin karşılaştırılması	75
Şekil 3.6. tDNA tespitinde MPS yüzey kaplama sürelerinin karşılaştırılması	76
Şekil 3.7. Metot 1 ve Metot 2'deki tDNA (10^{13} kopya/ml) frekans kaymalarının karşılaştırılması	77
Şekil 3.8. Metot 1'e ait tDNA frekans kaymalarının karşılaştırılması.....	78
Şekil 3.9. Kalibrasyon eğrisi	79

GİRİŞ

Hastalıkların erken evrede teşhis edilmesi, uygulanacak tedavinin başarı oranını önemli ölçüde etkilemektedir ve tedavi maliyetlerini o denli azaltmaktadır. Hastalık erken tespit edilebildiğinde oluşabilecek olumsuz etkiler geciktirilebilir, hastalığın gösterdiği belirtilerin şiddeti azaltılabilir veya hastalık tamamen sonlandırılabilir. Bu nedenle insan ve hayvanlarda sonucu ölüme kadar giden diyareye, yara enfeksiyonlarına, menenjit ve hemolitik üremik sendrom (HUS) ve çeşitli immünolojik hastalıklar gibi hastalıklara ve salgınlara sebep olabilen *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterisinin erken tespiti oldukça önem arz etmektedir. Ayrıca antibiyotik direnci gün geçtikçe artan *E. coli* bakterisinin, suşlarının hızlı bir şekilde tespit edilerek antibiyotik dirençlerinin saptanması, doğru antibiyotik tedavisinin önünü açacak, enfeksiyondan kaynaklanan morbidite ve mortalite oranlarını düşürecektir.

E. coli bakterisinin, tespiti için geleneksel tespit yöntemi olan kültür ve koloniye dayalı yöntemler ile nükleik asit ve immünolojik temelli yöntemler kullanılmaktadır. Bakteri kültürüne dayanan geleneksel yöntemde, toplam tespit süresi bir günü aşmaktadır. Genetik tespit için altın standart olan polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, (PCR)) ve enzim bağlı immünosorbent test (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, (ELISA)) ile yapılan tespitlerin zaman alıcı, maliyetli olması, uzman personel gerektirmesi ve belirli bir serolojik türe özgü olmasından dolayı alternatif yöntemler aranmaktadır. Sunulan tez çalışmasında Kuvars Kristal Mikrodenge (Quartz Crystal Microbalance, (QCM)) sensörü ile model tükürükte, *E. coli* bakterisinin ATCC 25922 suşunun genetik tespiti amaçlanmaktadır. Çalışmada, herhangi bir ön işleme ihtiyaç duyulmasını gerektirmeyecek, hızlı, hassasiyeti yüksek, güvenilir, yerinde, gerçek zamanlı ve erken tespit olanağı sağlayan bir sistem sunulmaktadır. Tasarlanan tespit işleminin tükürük sıvısı ile elde edilen tespit ortamlarında yürütülmesi, enfeksiyonunun sağlık personeline bulaşmasını oldukça sınırlayacağı gibi numunenin alınması invaziv olmayan bir işlem olduğu için hasta açısından da oldukça avantaj sağlayacaktır.

QCM cihazı, sensör yüzeyine bağlanan analitlerin neden olduğu rezonans frekansındaki değişimlerin (Δf), nanogram seviyesinde bir hassasiyet ile ölçülmesini sağlamaktadır. Çalışmada, genetik tespiti en uygun sensör yüzey modifikasyonu ve hassas bir tespit için gerekli olan yüzey modifikasyon süresi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, model tükürükte *Escherichia coli* bakterisinin genetik model organizması olarak bilinen ATCC 25922 suşunun, genetik tespitinin 10^8 kopya/ml hassasiyet ile yapılabildiğini ortaya koymaktadır.



1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Gastrointestinal Enfeksiyonlar

Gastrointestinal enfeksiyonlar, halk sağlığını tehdit eden başlıca enfeksiyonlar arasında yer almaktadır. Gastrointestinal sistemler, ağız boşluğundan başlayan, yiyeceklerin alındığı; ağız, özofagus, mide ve bağırsaklardan, yiyeceklerin atıldığı; rektum ve anüse kadar devam eden içi boş bir kas sisteminden oluşmaktadır. Bu sistem, gıdaların yutulmasında, sindirilmesinde ve emilimin kolaylaştırılmasında görev almaktadır [1].

Dünya çapında büyük bir akut ve kronik hastalık yükü oluşturan gastrointestinal enfeksiyonlar, gastrointestinal sistemin iltihaplanmasına neden olan enfeksiyonlardır. Bakteriyel, viral ve parazit olmak üzere üç ana gastrointestinal enfeksiyon türü bulunmaktadır [2].

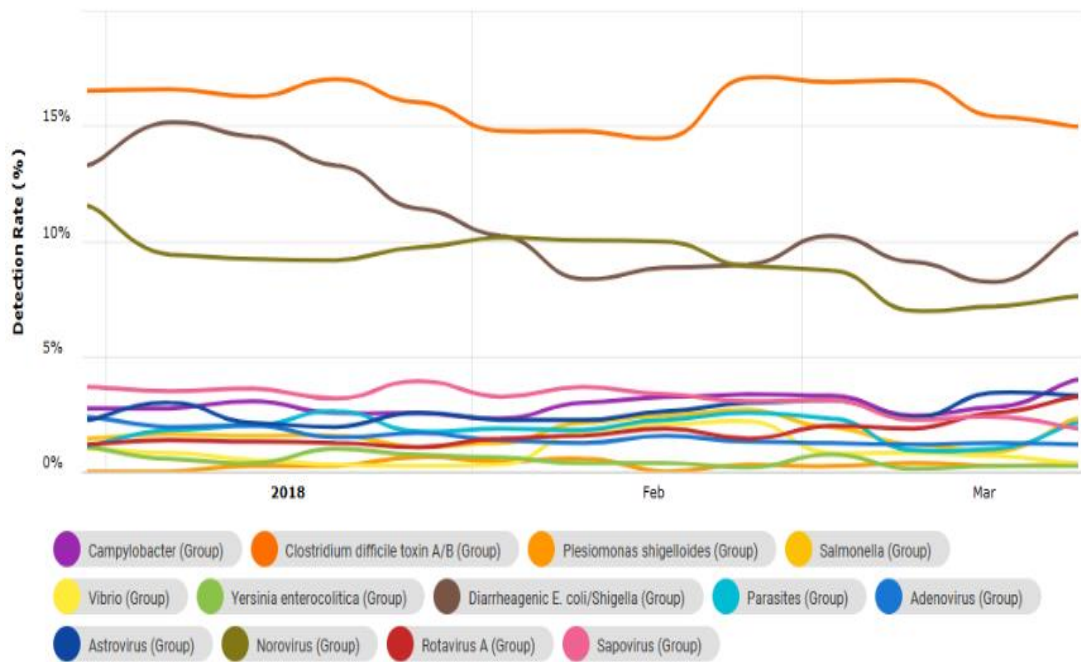
Bakteriyel gastrointestinal enfeksiyonlar, az pişmiş et, kirlenmiş su, pastörize edilmemiş süt, yıkanmamış meyve ve sebze tüketimi gibi sebeplerden ötürü oluşan gıda kaynaklı enfeksiyonlar ve gıda zehirlenmesi ile ortaya çıkmaktadır [3]. Gastrointestinal enfeksiyonların en yaygın görülen bakteriyel nedenleri, *Clostridium difficile*, *Salmonella*, *Shigella* ve *Escherichia coli* patojenlerinden kaynaklanmaktadır [4].

Viral gastrointestinal enfeksiyonlar, rotavirüs, sapovirüs ve nörovirüsten kaynaklanmaktadır. Bazı gelişmiş ülkelerde aşısı bulunan rotavirüs, viral gastrointestinal enfeksiyonların hastaneye yatmayı gerektiren en yaygın sebebidir [5].

Parazit gastrointestinal enfeksiyonlarına ise bağırsak helmintleri, solucanlar ve protozoan parazitleri neden olmaktadır. *Cryptosporidium*, *Cyclospora cayatanensis*, *Giardia lamblia* en yaygın olarak bilinen parazitlerdir [4]. Bu parazitler, insan teması ve kontamine olmuş su ile kolaylıkla bulaşabilmektedir.

Bakteriyel, viral ve parazitten kaynaklanan gastrointestinal sistem enfeksiyonları bulaşan kişilerde diyare, mide bulantısı, elektrolit dengesizliği, yüksek ateş, kilo ve iştah kaybı gibi temel semptomlar ortaya çıkmaktadır. En sık görülen belirti olan diyare ise en büyük etkisini bebeklerde ve çocuklarda göstermektedir [6]. Ayrıca bulaşıcı ishal, gelişmiş ülkelerde çalışan insan gücüne etkisinden dolayı mali yük getirmekte iken yoksul birçok ülkede başlıca ölüm nedenleri arasında yer almaktadır.

Viral gastrointestinal enfeksiyonları, genellikle bir haftadan az sürerken bakteriyel gastrointestinal enfeksiyonlar, yüksek ateş veya kanlı diyareden ötürü daha tehlikeli boyutlara ulaşabilmektedir. Özellikle hamile kadın, yaşlılar, bebekler ve çocuklar ile bağışıklık sistemi zayıf olan insanlar için gastrointestinal enfeksiyonlar oldukça tehlikeli ve ölümcüldür [2, 6].



Şekil 1.1. Gastrointestinal enfeksiyona sebep olan organizmaların tespit oranı [4]

Gastrointestinal enfeksiyonlar, dünya çapında enfeksiyonlardan kaynaklanan morbidite ve mortalite oranlarının önemli bir kısmını kapsamaktadır [6]. Tez çalışmasının bu bölümünde, bakteriyel gastrointestinal enfeksiyonlarına sebep olan, insan ve hayvanlarda sonucu ölüme kadar giden diyareye, yara enfeksiyonlarına, menenjitte,

hemolitik üremik sendroma (HUS), trombotik trombositopenik purpura (TTP), hemorojik kolitise ve çeşitli immünolojik hastalıklar gibi hastalıklara ve salgınlara sebep olan *Esherichia coli* patojeni ve bu patojenin teşhisi için günümüzde kullanılan yöntemler incelenerek, tez çalışmasında *Esherichia coli* bakterisinin genetik tespitine ilişkin alternatif bir yöntem sunulmaktadır.

1.2. *Escherichia Coli*

1.2.1. Tarihçe

Esherichia coli (*E. coli*), Alman mikrobiyolog ve çocuk doktoru Theodor Escherich tarafından 1885 yılında ishali süt çocuklarının dışkılarında keşfedilmiştir [6]. İlk olarak *Bacterium (Bacillus) coli commune* adıyla adlandırılan bu mikroorganizma, 1919 yılında Castellani ve Chalmer tarafından önerilen *Escherichia* cins ismi ile *Escherichia coli* olarak adlandırılmıştır [7]. *Escherichia coli*, uzun yıllar hayvanların ve insanların bağırsak florasında bulunan ve patojen olmayan mikroorganizma olarak kabul edilmiştir [8]. 1920'li yıllarda üriner sistem enfeksiyonlarına ve 1940'lı yıllarda da çocuklarda gastroenteritise neden olduğu belirlenmiştir. Daha sonra 1945'li yıllarda insan hastalığıyla ilgili ilk *E. coli* bakterisi olan *Enteropatojenik E. coli* (EPEC) suşları tanımlanmıştır [9]. Yapılan araştırmalar sonucunda bazı serotiplerinin hastalıklara neden olduğunun ortaya çıkması ile potansiyel bir patojen olarak tanımlanmıştır [10]. 1969'da *Enterotoksijenik E. coli* (ETEC) ve bağırsak enfeksiyonlarına yol açan *Enteroinvaziv E. coli* (EIEC) suşları izole edilmiştir. *E. coli* tarihi 1980'lerde ABD'de de *Enterohemorajik E. coli* suşlarının (EHEC) tanımlanması ile devam etmiştir. Son yıllarda ise küçük çocuklarda sık görülen *Enteroagregatif E. coli* (EAggEC) önem kazanmaya başlamıştır. Böylece geçmişten bugüne kadar enfeksiyon mekanizmalarına göre en az beş grupta toplanabilecek *E. coli* suşları tanımlanmıştır [11].

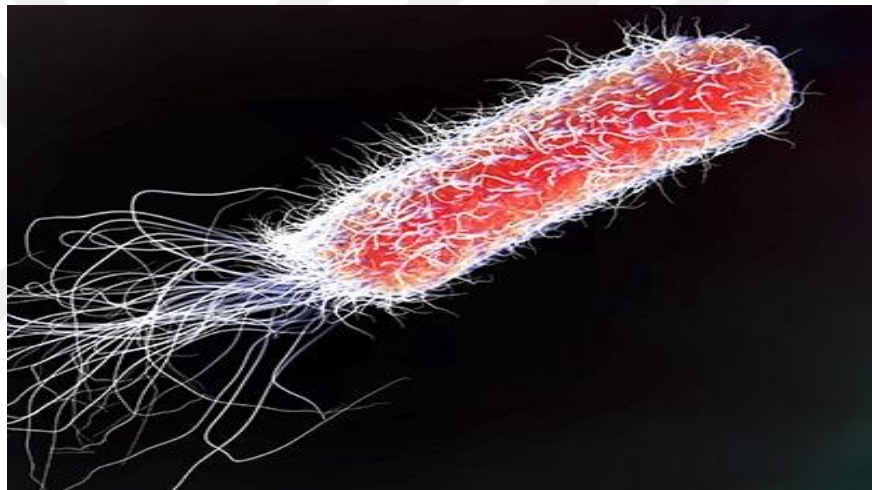
1.2.2. Genel Özellikleri

E. coli bakterisine ait taksonomik sınıflandırma aşağıdaki gibidir [19].

Alem	Bacteria
Şube	Proteobacteria
Sınıf	Gamma Proteobacteria

Takım	Enterobacteriales
Ailesi	Enterobacteriaceae
Cinsi	Escherichia

Escherichia coli, Enterobacteriaceae ailesinde yer alan, genetik yapısı iyi bilinen sayısız biyokimyasal, biyolojik ve biyoteknolojik çalışmalarda model olarak kullanılan bir bakteri türüdür [12, 13]. *E. coli*; 1.0-1.5 µm en ve 2-6 µm boyda, düz, uçları yuvarlak, çubuk şeklindedir. Peritrik kamçıları ile yavaş da olsa hareket eden *E. coli* suşlarının yanında hareketsiz *E. coli* suşları da bulunmaktadır [12].



Şekil 1.2. *Escherichia coli* bakterisinin mikroskopik görüntüsü [15]

E. coli, oksijen varlığında yaşayamayan ve üreyemeyen mikroorganizmalardır. Zenginleştirilmemiş besiyerlerinde, fakültatif anaerobik olarak ürerler. Optimum üreme için sıcaklık 37 derecede ve pH nötr durumunda olmalıdır. Fakat sıcaklık 20- 45 °C arasında, pH ise 5- 8 sınırlarında iken yavaş da olsa üreme gerçekleşmektedir [12, 14].

Gram negatif bakteriler grubuna giren *E. coli*, endospor oluşturamaz. Belirli şartlarda canlı kalmayı başaran *E. coli* bakterisi için memeli canlılar iyi bir konakçısıdır. Sıcakkanlı hayvanların sindirim sistemine kısa bir süre içerisinde kolonize olan fakültatif anaerobik bir bakteridir. Öncelerde bağırsaklarda bulunan zararsız bir bakteri olarak bilinen *E. coli*'nin bazı suşlarının aslında insan ve hayvanlarda hastalığa neden olan patojenler olduğu anlaşılmıştır [16, 17].

Pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleri, yıkanmamış meyve ve sebzeler, az pişirilmiş etler, tuvalet sonrası yıkanmamış eller ile insanlarla kurulan ilişki *E. coli* kaynaklı enfeksiyonların başlıca sebepleri arasında yer almaktadır [18].

1.2.3. Patojenik *E. coli* Bakterilerinin Sınıflandırması

Memelilerin normal bağırsak florasında yaşayan bu bakteri, diğer flora bakterileri ve organizmalar ile denge içinde kaldığı sürece hastalık yapmamaktadır. Yani *E. coli* suşları genellikle konağa zarar vermez. Fakat bağışıklık sistemi baskılanmış konaklarda sahip olduğu flagella, kapsül, hücre duvarı, fimbriya antijenleri, sentezlediği kolisinler, enterotoksinler, sitotoksinler, hemolizinler ve aerobaktin gibi virulans faktörleriyle hastalıklara neden olmaktadır. Bununla birlikte, bazı spesifik *E. coli* suşları, spesifik virülans özellikleri edindikten sonra hastalığa neden olma potansiyeli yüksek olan birincil patojenleri temsil eder [20, 21].

E. coli kaynaklı enfeksiyonlar; insan ve hayvanlarda sonucu ölüme kadar giden ishaller, yara enfeksiyonlarına, menenjit, sepsis, hemolitik üremik sendrom (HUS), trombotik trombositopenik purpura (TTP), hemorojik kolitis ve çeşitli immünolojik hastalıklar gibi hastalıklara ve salgınlara sebep olabilmektedir. Bu salgınlar binlerce kişiyi etkileyebilmektedir [20]. *E. coli*'nin patojenik suşları farklı patotiplere ayrılabilir, her patotip ise farklı bir hastalığa neden olmaktadır. Tüm patotipler iki büyük gruba ayrılabilir;

- İntestinal patojenik *E. coli* (bağırsaklarda oluşan *E. coli* hastalıkları)
- Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (bağırsak dışında oluşan *E. coli* hastalıkları)

İntestinal patojenik *E. coli* (InPEC) kolonizasyon ile birlikte diyare, şiddetli kolitis, dizanteriye neden olmaktadır [22].

Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) ise üriner sistem enfeksiyonları ve sepsisemilere yol açabilmektedir [23]. *E. coli*; enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), enteroinvazif *E. coli* (EIEC), difüzyonla yapışan *E. coli* (DAEC) ve enterohemorajik *E. coli* (EHEC) olmak üzere altı temel kategoride sınıflandırılmaktadır [24].

1.2.3.1. Enteropatogenik *Escherichia Coli* (EPEC)

Escherichia coli'nin ilk tanımlanan patotipi EPEC'dir. İlk defa 1940'lı yıllarda toplum ve hastane kaynaklı yeni doğan ishal salgınlarında izole edilmiştir. EPEC'in temel özelliği, bağırsak mukozasındaki belirli hücrelere yapışmasıdır. Membran mikrovilluslarından, lezyonlara ve epitel hücrelerine yapışarak çeşitli bozukluklara neden olur. Bu grubun serotipleri şiddetli geçen sulu ve kanlı diyareye neden olurlar [25].

Sanayileşmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ölümcül bebek ishalinin ve yeni doğan ölümlerinin önde gelen nedenlerindedir. Yeni doğan ve küçük çocuklarda sıklıkla şiddetli ve kansız ishal, kusma ve ateş hastalığın önemli belirtileridir [26]. Yetişkinlerin kazanılmış bağışıklığından ötürü yetişkinlerde nadiren görülmekte ve klinik belirtiler hafif düzeyde seyretmektedir. Çocuklarda yaş ne kadar küçülürse hastalığın gözlenme sıklığı o kadar artmaktadır. Yaşanan EPEC salgınları analiz edildiğinde; 6 aylık ve daha küçük olan çocukların, 1 ve 2 yaşındaki çocuklara göre hastalığın gözlenme sıklığının 20 kat fazla olduğu saptanmıştır [27]. EPEC enfeksiyonlarının sebep olduğu ishallerde antibiyotik tedavisi faydalı olabilir [28].

1.2.3.2. Enterotoksijenik *Escherichia Coli* (ETEC)

ETEC, ısıya duyarlı (labil) toksin (LT) ve ısıya dirençli (stabil) toksin (ST) olarak tanımlanmış iki toksine sahiptir. Bu iki enterotoksin su kaybına neden olmaktadır [29]. Bu toksinler plazmit genleri tarafından kontrol edilmektedir. ETEC bu iki farklı toksin grubundan en az birini salgılamak zorundadır. Isıya duyarlı toksin 60°C'de 30 dakikada ölürken, ısıya dirençli toksin 100°C'de 15 dakika boyunca direnç göstermektedir [30].

Ağız ile alınan gıdalar ve kontamine su ETEC enfeksiyonuna neden olmaktadır. Bakteri kolonize olduktan sonra toksinlerini salgılar. ETEC'nin en çok rastlanan belirtileri, ishal ve karın ağrılarıdır. Bu belirtileri ile birlikte baş ağrısı, bulantı ve ateşte gözlenebilmektedir. ETEC enfeksiyonu öncelerde 24 saat süren iken yeni ETEC salgınları incelendiğinde hastalık süresinin uzadığı gözlemlenmiştir [30, 31]. ETEC enfeksiyonlarında antibiyotik tedavisi belirtilerin şiddetini azaltmaktadır.

ETEC, gelişmekte olan ÷lkelerde sağlık koşulları yeterince gelişmediği için çocukluk ishali önemli bir nedenidir. Yetişkin bireylerde ishal birkaç g÷n içerisinde geçmesine rağmen bebeklerde ölümc÷l olabilmektedir. Aynı zamanda gelişmiş ve gelişmekte olan ÷lkeler arasında seyahat yapan bireylerde de ETEC enfeksiyonuna rastlanmaktadır. Bu nedenle turist diyaresi olarak adlandırılmaktadır [32].

1.2.3.3. Enteroinvaziv *Escherichia Coli* (EIEC)

Shigella, insanlarda shigelloz olarak bilinen bağırsak hastalığına neden olan, Shiga toksinleri salgılayan zorunlu bir hücre içi patojendir [33]. EIEC suşları dışındaki diğer *E. coli* suşları, *Shigella* patojeninden biyokimyasal testler ile ayırt edilememektedir. Yani EIEC suşları ve Shiga genetik ve patojenik olarak birbirine benzemektedir [34].

EIEC suşu 1960'lı yıllarda Japonya ve Brezilya'da izole edilmiştir. EIEC basil dizanteri ajanıdır. EIEC salgınları genellikle yiyecek veya su kaynaklıdır, gıdalar aracılığı ile kişiden kişiye bulaşmaktadır. Temiz suya erişimin az olduğu gelişmemiş, ekonomik olarak fakir ÷lkelerde EIEC suşundan kaynaklı salgınlara daha sık rastlanmaktadır. EIEC, kolon epitel hücrelerini istila eder ve hücre içinde çoğalır. EIEC, sulu ishal veya dizanteriyle birlikte, shigelloz hastalığına sebep olmaktadır. EIEC suşundan kaynaklı salgınlar diğer *E. coli* patojenik suşlarından kaynaklı salgınlara göre daha az gör÷lmektedir [35, 36].

1.2.3.4. Enteroagregatif *Escherichia Coli* (EAggEC / EAEC)

En son keşfedilen patojenik gruptur. EAEC; labil toksin (LT) veya stabil toksin (ST) üretmeyen ve HEp-2 hücrelerine yapışan *E. coli* olarak tanımlanır. EAEC'nin patogenezi, bağırsak mukozasına kolonize olduktan sonra toksin salgılar [37]. EAEC, enteroagregatif ısıya kararlı toksin (EAST) ve patolojik etkilerden sorumlu olan bir sitotoksin içermektedir. EAEC'in tanımlanması için ajanın izolasyonu ve doku k÷ltürü ile yapışma analizi gerekmektedir.

EAEC ile ortaya çıkan salgınlarda; d÷şük ateş, bulantı, dışkıda açık kan ve ishal gözlenmektedir [38]. EAEC hem akut hem de kronik (14 g÷nden fazla) ishal hastalığına neden olabilir. Kötü beslenmiş konakçılar mukozal hasarı onaramayabilir ve bunun sonucunda kalıcı veya kronik diyare gözlenebilmektedir [37]. EAEC, hem gelişmekte

olan hem de gelişmiş ülkelerdeki çocuklarda ve yetişkinlerde kalıcı ishalin önemli bir nedenidir. EAaggEC'in, kalıcı ishale neden sebep olduğu hala bilinmemektedir. Fakat EAEC ile ortaya çıkan ishal, EHEC ve EPEC'in neden olduğu ishalden daha az şiddetlidir.

1.2.3.5. Diffuz Agregatif *Escherichia Coli* (DAEC)

DAEC ile çok sayıda fonksiyonel çalışma olmadığı ve tüm genom dizisi tanımlanmadığı için DAEC'in patogenezi büyük ölçüde bilinmemektedir [39]. Yeni doğmuş bebeklerden daha sıklıkla çocuklarda ishal hastalıklarına neden olan *E. coli* patojenidir. Kan veya fekal lökosit olmadan sulu ishale neden olur [40].

1.2.3.6. Enterohemorajik *Escherichia Coli* (EHEC)

İnsan ve hayvanlarda hastalık oluşturan *E. coli* patotiplerinden birisidir. EHEC grubu, Shiga toksini üreten *E. coli* (STEC) olarak da adlandırılmaktadır. Enterohemorajik *E. coli*'nin STEC olarak adlandırılmasının nedeni, salgıladığı sitotoksinin *Shigella dysenteriae* tarafından üretilen Shiga toksin ile genetik ve protein yapısı olarak büyük ölçüde benzer olmasıdır. Shiga toksin üreten *E. coli* ilk kez 1977 yılında keşfedilmiştir [39]. Enterohemorajik *E. coli*'nin bir diğer ismi de VTEC (Verotoksin üreten *E. coli*)'dir.

STEC, çeşitli yollarla yayılabilmektedir. İnsan enfeksiyonlarının çoğu, kirli gıdaların tüketiminden kaynaklanır. Yerli ve vahşi hayvanlar, özellikle de sığırlar, STEC'nin ana rezervuarı ve gıda kontaminasyonu için ana kaynak olarak kabul edilmektedir [42]. Bu hayvanlardan elde edilen gıda ürünleri, kesim ve ileri işlemler sırasında STEC ile kontamine olabilmektedir. Ayrıca sığır gübresiyle kontamine olmuş sebzeler, STEC enfeksiyon salgınlarına neden olmuştur.

EHEC, konakçıdaki hafif diyareden şiddetli hemorajik kolite kadar birçok hastalıkla ilişkilidir. EHEC patojeninin, kuluçka süresi 3 ila 8 gün, hastalık süresi genellikle 1 ila 12 gündür. Ayrıca iki ciddi hastalığın da temel nedenidir. Bunlardan biri Hemolitik Üremik Sendrom (HUS), diğeri de Trombotik Trombositopenik Purpura (TTP) adları ile bilinen hastalıklardır [43]. STEC suşları, yaşamı tehdit eden bu iki hastalığa neden olma

yetenekleri ile birbirinden ayrılmaktadır. Bu ciddi klinik tablolara neden olan birkaç EHEC serotipi bulunmaktadır: O26, O111 ve O157. Bunlar arasında en çok öne çıkan *O157:H7* serotipi dışkıda 50 gün, toprakta ise 130 gün boyunca canlılığını koruyarak direnç gösterebilmektedir. STEC enfeksiyonunun diğer semptomları arasında kanlı ishal ve hemorajik kolit (HC) bulunur [44].

E. coli O157:H7 1982’de bir patojen olarak tanımlanmıştır. Çok önemli salgınların kaynağı olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 1.1. Dünyada *E. coli O157:H7*’nin sebep olduğu salgınlar [45]

Yıl	Yer	Vaka sayısı	Ölü sayısı	İnfeksiyon sebebi
1982	Michigan, Oregon, ABD	26	-	Hamburger
1985	East Anglia, İngiltere	49	1	Çiğ sebze
1985	Kanada, Bakımevi	73 (12 HUS)	17	Sandviç, kişiden kişiye
1989	Missouri, ABD	243 (2 HUS)	4	Su
1990	Japonya, Anaokulu	319	2	Çeşme suyu
1991	İngiltere, fast food restoran	23 (3 HUS)	-	Hamburger
1992/3	ABD, fast food restoran	732 (55 HUS)	-	Hamburger
1992	İngiltere, Hastane	14	3	Kişiden kişiye
1993	İngiltere, Mandıra	7 (3HUS)	-	Pastörize edilmemiş süt
1993	Galler	17 (1 HUS)	-	Kasap
1993	Londra, İngiltere	7 (3 HUS)	1	Kişiden kişiye
1994	İngiltere	7 (4 HUS)	-	Hayvan teması
1994	İskoçya	100 (9 HUS)	1	Pastörize süt
1996	Japonya, Okul	9451 (> 100 HUS)	3	Beyaz turp filizi
1996	İskoçya, Bakımevi	501 (27 HUS)	21	Pişmiş et
1996	ABD, Kanada	66 (12 HUS)	1	Elma suyu
1997	Michigan, Virginia	60	-	Alfalfa filizi ⁶⁶
1999	ABD	781 (15 HUS)	2	İçme suyu ⁶⁷
2000	Milwaukee, Wisconsin	66	1	Et ⁶⁸
2002	ABD	57	-	Kayma
2003/4	Danimarka	25	-	Süt
2006	Kuzey ABD	198	3	Sebze
2007	ABD	14	-	Et
2007	ABD	21(4 HUS)	-	Dondurulmuş gıda ⁶⁹
2007	ABD	40 (2 HUS)	-	Dondurulmuş gıda ⁷⁰
2008	ABD	49 (1 HUS)	-	Et ⁷¹
2009	ABD	76 (11 HUS)	-	Dondurulmuş gıda ⁷²
2009	ABD	26 (5 HUS)	2	Et ⁷³
2009	ABD	23 (2 HUS)	-	Dondurulmuş et ⁷⁴
2009	ABD	72 (10 HUS)	-	Dondurulmuş gıda ⁷⁵
2010	ABD	48 (1 HUS)	-	Peynir ⁷⁶
2010	ABD	21 (1 HUS)	-	Et ⁷⁷
2011	ABD	60 (2 HUS)	-	Marul ⁷⁸
2011	ABD	14	-	Fermente et ürünü ⁷⁹
2012	ABD	33	-	Sebze ⁸⁰
2013	ABD	33 (2 HUS)	-	Sebze ⁸¹
2013	ABD	79 (2HUS)	-	Restaurant

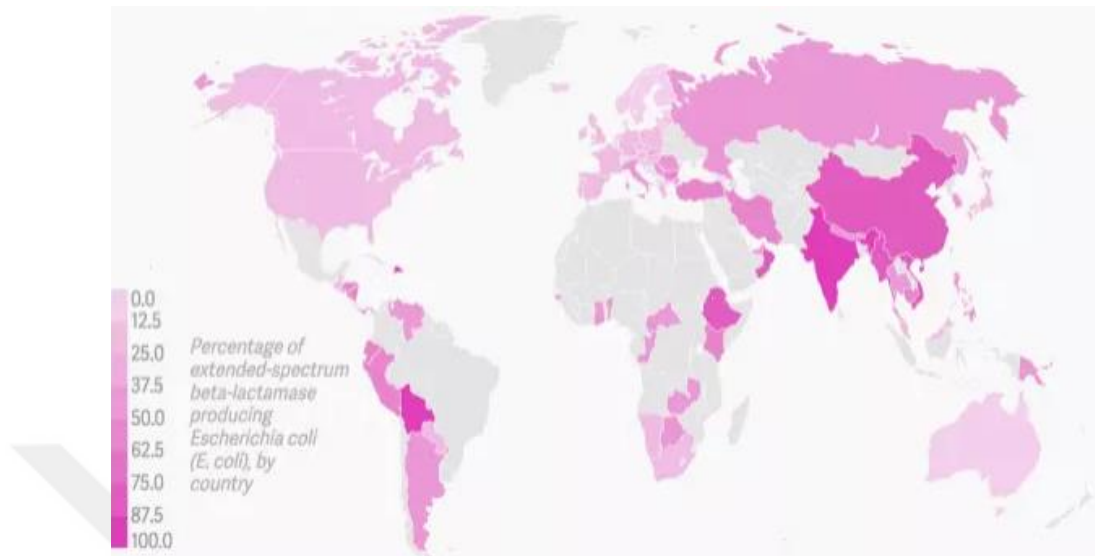
1.2.4. *Escherichia Coli* Bakterisinin Antibiyotik Direnci

Gram negatif organizmalar, beta-laktam antibiyotikler gibi enzimleri kodlayan genleri bulundurması, zardaki değişiklikler sonucu geçirgenliğin azalması, antibiyotiklerin engellediği yolları atlayarak alternatif yollar kullanması ile antibiyotiklere direnç geliştirebilmektedir [46]. Antibiyotik direnci artık sadece potansiyel bir tehdit değil, dünya çapında hızla artan ciddi bir sağlık sorunudur.

Dirençli bakteri ve genlerin gün geçtikçe artmasına neden olan baskın risk faktörlerinden biri, insan tıbbında, hayvanlarda, beslenmede ve tarımda antibiyotik ilaçların (aşırı) kullanılmasıdır. Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılan antibiyotikler, bir taraftan tedavide başarı sağlarken diğer taraftan enfeksiyona neden olan bakterilerde, kullanılan antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde ve hızlı bir şekilde dirençliliğin gelişimine neden olmuştur. Dünya genelinde yıllık toplam antibiyotik pazar tüketiminin 100.000 ila 200.000 ton arasında olduğu tahmin edilmektedir [47].

1980'lerde test edilen suşların çoğu ampicilin, trimetoprim-sülfametoksazol, tetrasiklin ve kinolonlara karşı duyarlı ve eritromisine, metronidazole ve vankomisine karşı dirençlidir. Daha yakın zamanlarda araştırmacılar, muhtemelen bu antibiyotikleri alan gıda hayvanlarında bu organizmanın prevalansının bir sonucu olarak, streptomisin, sulfimetoksazol ve tetrasikline karşı direnç oranlarının arttığını rapor etmişlerdir [48].

2000'li yıllardan itibaren *E. coli* bakterisinde de görülen genişletilmiş spektrum beta-laktamaz (GSBL) üretimi ile oluşan antibiyotik direnci hastanede ve yoğun bakım servislerinde yatak süresi uzun olan, bağışıklık sistemi baskılanmış, birden fazla antibiyotik kullanımına maruz kalan ve hijyen problemleri yaşanan yerlerde yaşayan kişilerde önemli bir risk oluşturmaktadır [49]. Bu enzimleri taşıyan bakteriler penisilin, sefalosporin gibi geniş kullanıma sahip antibiyotiklere karşı da dirençlidirler. Bakterilerin, antibiyotiklere direnç geliştirmesi küreselleşmiş bir sorun olup, özellikle hastane enfeksiyonlarında tedaviyi zorlaştıran, mortaliteyi ve tedavi maliyetlerini artıran önemli bir unsurdur. Bu kapsamda, gram-negatif bakterilerdeki direncin çok hızlı yayılması özellikle yoğun bakımlarda, kullanımdaki antibiyotiklerin hemen hepsine dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına yol açarak son derece tehlikeli gelişmelere neden olmaktadır.



Şekil 1.3. *Escherichia coli* bakterisinin antibiyotik direnç yüzdeleri [50]

1.2.5. *Escherichia Coli* ATCC 25922 Suşu

Escherichia coli bakterisinin ATCC 25922 suşu, ilk olarak 1946 yılında Washington'daki klinik bir örnekten izole edilmiştir. Genetik ve biyokimya alanında yapılan araştırmalarda ve laboratuvar çalışmalarında kullanılan, patojenik olmayan bu suş, antibiyotik duyarlılık testlerinde kontrol suşu olarak kullanılmaktadır. Laboratuvarlarda gerçekleştirilen duyarlılık testlerinin tekrarlanabilirliği, kararlı kontrol suşları ile mümkün olduğu için *E. coli* bakterisinin ATCC 25922 suşu, bu alanda kontrol gram negatif bakteri olarak kullanılmaktadır [51].

1.3. Tükürük

Tükürük bezleri ile salgılanan, ağız nemlendiren, gıdaların yutulmasında ve tadının alınmasında görev yapan interstisyel sıvıya tükürük denir. Tükürük; kokusuz, renksiz, kıvamlı, yapışkan, hafif bulanık ve kolayca köpüren yapıya sahiptir. Tükürüğün % 99.5'i sudan, % 0.5'i ise glikoproteinlerden, elektrolitlerden (potasyum, kalsiyum, sodyum), mukopolisakkaridlerden, immunglobulinlerden, antimikrobiyal maddelerden (IgA, hidrojen peroksit) ve amilaz, lizozim ve lipaz gibi enzimlerden oluşmaktadır [52].



Şekil 1.4. Tükürük örneği [54]

Vücuttaki sağlığın ve homeostazın korunmasında tükürüğün rolü büyüktür. Tükürük sıvısı azalan bireylerde yutma, diş çürümesi, konuşma, akut problemler, yiyeceklerin sindirilmesi ve tadı ile ilgili ciddi sıkıntılar oluşur. Tükürük karmaşık bir sıvıdır. Tükürüğün % 93'ü büyük tükürük bezleri tarafından salgılanırken kalan % 7'si küçük tükürük bezleri tarafından salgılanır [52, 53].

Tükürük % 99,5 oranında su ve % 0,5 oranında inorganik ve organik moleküllerden oluşur [53].

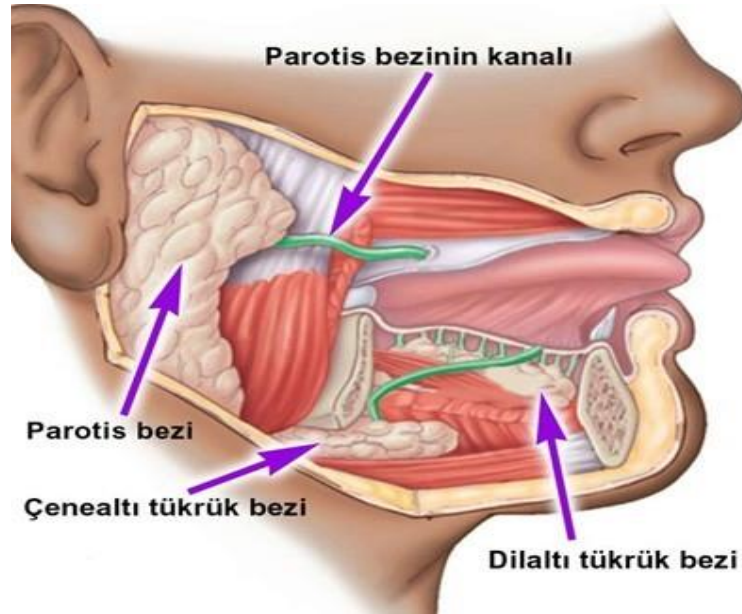
Erişkin bireylerde günlük ortalama 1000-1500 ml tükürük salgılanması gerçekleşmektedir. İstirahat halindeyken tükürüğün salgılanma hızı dakikada 0,05-0,3 ml iken uyarıldığı zaman dakikada 0,18-1,7 ml'dir. İstirahatte tükürüğün, % 69'unu submandibuler bezi, % 26'sını parotis bezi ve % 5'ini sublingual bez salgılar. Uyarıldığında ise tükürüğün, 2/3' ünü parotis bezi , % 7-8'ini minör bezler salgılar [52].

Tükürük, hipotonik bir sıvıdır. Yoğunluğu 1003-1009 g/ml arasında, pH'ı 6,2-7,4 arasında değişmektedir. Viskozitesi ise 19 ile 35 milipaskalsaniye arasındadır.

1.3.1. Tükürük Bezleri

Tükürük, tükürük bezleri tarafından üretilir ve salgılanır. Tükürük salgılayan bezler büyük tükürük bezleri (majör) ve küçük tükürük bezleri (minör) olarak ikiye ayrılır.

Büyük tükürük bezleri, parotis (kulakaltı), submandibuler (çenealtı) ve sublingual (dilaltı) tükürük bezi olmak üzere üç çeşittir. Küçük tükürük bezleri ise bukkal, labial, palatin ve lingual tükürük bezleri olarak adlandırılır [56].



Şekil 1.5. Tükürük bezleri [58]

Parotis bezinin, ağırlığı 20-25 gram olup büyük tükürük bezleri arasında en büyük olanıdır. Dış kulağın önünde, kanal yanak içinde yer almaktadır. Piramit şeklini andıran parotis bezinin tabanı arcus zygomaticus'ta, tepesi angulus mandibuladadır [56]. Geniş şekilli ve düzensiz olan parotis bezi, tamamen seröz salgı yapar. Bu salgı 4-5 cm uzunluğundaki stenon kanalı ile ağız boşluğuna ulaşır. Parotis salgısı, çeşitli elektrolit ve proteinlerden oluşur. Sulu, akıcı kıvamda ve α -amilaz bakımından zengin olduğu için gıda maddelerini ıslatıp yumuşatma etkisi vardır.

Submandibular bezi, 7-12 gram ağırlığında olup yaklaşık bir ceviz büyüklüğündedir. Çene altında yer aldığı için çenealtı tükürük bezi olarak da isimlendirilmektedir. Tükürüğün yaklaşık % 69'unu oluşturmaktadır. Submandibular bezi, mukoz ve seröz karma bir bezdir. Ağız tabanının arka kısmından mandibula orta hatta doğru uzanmaktadır. Yaklaşık 5 cm uzunluğundaki Wharton kanalı ile ağız boşluğuna dökülen submandibular salgı, yüksek viskoziteye sahiptir [57].

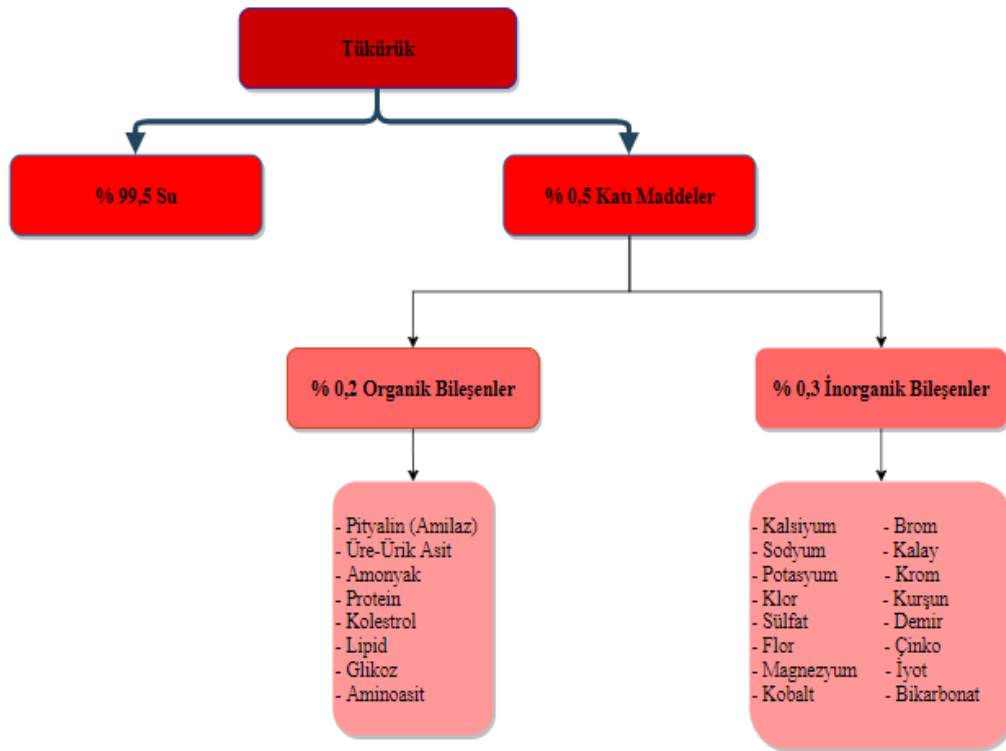
Sublingual bezi, büyük tükürük bezlerinin en küçüğü olup yaklaşık 2-4 gramdır. Badem şekli ile bilinen bu bezler, ağız tabanının derininde ve dilin altında bulunur. Bu nedenle dilaltı tükürük bezi olarak da adlandırılmaktadır. Sublingual salgısı, Bhartolin kanalı aracılığı ile Wharton kanalına dökülür. Buradan ağız boşluğuna ulaşır. Miks salgı üreten sublingual bezinin, müköz hücreleri fazla olduğu için salgısı müsinden zengindir. Müsin oranı fazla olduğu için salgısı daha koyudur.

Küçük tükürük bezleri, tükürüğün yaklaşık % 7-8'ini karşılamaktadır. Bukkal, labial, palatin ve lingual tükürük bezleri küçük tükürük bezleridir. Sert damağın ön bölgesi ve dişeti dışında ağız boşluğunun hemen her yerinde küçük tükürük bezleri yer almaktadır. Salgıları genellikle müköz karakterdedir. Küçük tükürük bezleri, daha az tükürük üretirler [57].

Submandibular, sublingual ve küçük tükürük bezleri esas olarak ağız sağlığı bakımından sorumluyken, parotis bezi sindirimde görev almaktadır.

1.3.2. Tükürüğün Bileşenleri

Tükürüğün miktarı ve içeriği, salgı yapan tükürük bezine, günlük ritme, sempatik ve parasempatik sinir sistemi uyarısına ve kişinin hastalık durumlarına göre değişmektedir. Tükürük bezleri tarafından bir günde yaklaşık 1000 mililitre tükürük salgılanmaktadır. Bunun yaklaşık % 99,5'u su, % 0,5'i ise organik ve inorganik maddelerden oluşur. Tükürüğün içerisinde 20'den fazla organik ve inorganik madde bulunmaktadır.



Şekil 1.6. Tükürüğün bileşenleri [59]

1.3.2.1. Tükürüğün Organik Bileşenleri

Tükürük, üre, enzim, immunglobulin (Ig), amilaz, protein, müsün, albümin, amonyak, polipeptid, hormon ve ürik asit gibi organik maddeleri içermektedir.

Tükürükte bulunan organik bileşenlerin büyük kısmını proteinler oluşturmaktadır. Büyük tükürük bezlerinden salgılanan en az 40 tükürük proteini olduğu bilinmektedir. Büyük tükürük glikoproteinleri (musinler, immünglobülinler ve glikoprotein) ve küçük tükürük glikoproteinleri (lizozim, aglütininler ve laktoferrin) ağız içerisindeki savunma mekanizmasında yer almaktadır. Tükürükte bulunan proteinlerin % 26'sını müsünlerden oluşmaktadır. Müsünler, ağızda bulunan sert ve yumuşak dokuların üzerinde bulunan tabakanın büyük bir kısmını kapsamaktadır. Müsünler, mikroorganizmaların ağız içine tutunmalarını ayarlayarak, antibakteriyel görev yerine getirirler. Müsünlerin diğer bir önemli görevi ise yemek yeme esnasında kayganlık oluşturmalarıdır [60].

Tükürükte en fazla miktarda bulunan immunoglobulin, İmmunoglobulin A'dır. İmmunoglobulinler, virüs ve toksinleri nötr hale getirerek, bakterilerin dış yüzeyine tutunmasını engeller. Tükürükte bulunan lizozim, laktoferrin gibi bazı maddeler ile

birlikte ağız içindeki anti bakteriyel etkinliği artırır. Bu antibakteriyel özellik, ağızda bulunan en önemli savunma mekanizmasıdır.

Yukarıda bahsedilen büyük tükürük glikoproteinlerinin yanı sıra laktoferrin, sistatin, aglutinin ve lizozim gibi küçük tükürük proteinleri de ağız boşluğunun savunma mekanizmasında görev almaktadır.

Üre ise tükürüğün pH'ını artıran organik bileşendir. Üre molekülü, enziminin etkisiyle karbondioksit ve amonyağa dönüşmekte ve asit ortamının pH'ını artırmaktadır.

Tükürükte bulunan en önemli organik bileşenlerden biri olan α -amilaz, insan tükürüğünde bol miktarda bulunmaktadır. Amilaz, nişastayı ayrıştırarak karbonhidratların sindiriminin ağızda başlamasını sağlar [59]. Nişastanın parçalanması ile oluşan glikoz ağızdaki bakteriler ile etkileşime girerek laktik asit oluşturur. Bu durum diş yüzeyinde mineral kaybına eden olur. Ayrıca amilaz diş yüzeyine bakterilerin tutunmasını sağlayarak plak oluşumuna neden olmaktadır.

1.3.2.2. Tükürüğün İnorganik Bileşenleri

Tükürüğün inorganik bileşenlerinden klor, sodyum, bikarbonat ve potasyum tükürükte fazla miktarda bulunurken magnezyum, kalsiyum, iyot, inorganik fosfat ve florür az miktarda bulunmaktadır.

Tükürükteki klor ve sodyum yoğunluğu tükürüğün akış hızına bağlı olarak değişmektedir. Potasyum yoğunluğu, tükürüğün akış hızı ile ters orantılıdır. Akış hızının artmasıyla tükürükteki potasyum yoğunluğu azalır.

Florür, bilinen en etkili çürük önleyici maddedir. Tükürükteki florür yoğunluğu tükürük akış oranından etkilenmemektedir. Florür gıdalardan, diş macunundan ve sindirimden tükürüğe geçebileceği gibi kan dolaşımı yoluyla da tükürüğe karışabilmektedir. Diş plaklarındaki asit üretimini azaltabilen florür iyonu, dişlerdeki mineral dengesini de değiştirmektedir [61].

Tükürükte bulunan diğer bir inorganik bileşen ise inorganik fosfatlardır. Fosfat seviyesinin yüksek olmasının çürük oluşum oranını azalttığı savunulmaktadır.

1.3.3. Tükürüğün Fonksiyonları

Tükürüğün yağlama, yıkama, tamponlama, koruma ve sindirim gibi birçok önemli görevi bulunmaktadır. Tablo 1.2.'de tükürüğün fonksiyonları ve bunlardan sorumlu olan tükürük bileşenleri verilmiştir.

Tablo 1.2. Tükürüğün ana fonksiyonları [64]

A. Koruyucu Fonksiyon	
Kayganlık	Müsin, su, glikoprotein, prolin
Antimikrobiyal fonksiyon	Amilaz, lizozim, laktoferrin, müsin, histatin, prolin, Ig
Büyüme faktörleri	Epidermal büyüme faktörü, nerve growth factor
Mukozal Bütünlük	Müsin, elektrolit, su
Yıkama / temizlik	Su
Tampon	Bikarbonat, fosfat iyonları, proteinler
Remineralizasyon	Kalsiyum, fosfat, prolin
B. Konuşma ve Gıda Üzerine Fonksiyon	
Konuşma	Su, müsin
Lokma yapımı	Su, müsin
Sindirim	Amilaz, lipaz, proteaz, ribonükleaz, su
Tat alma	Su, gustin

Tükürüğün karmaşık karışımı, ağız boşluğundaki yumuşak ve sert dokuları yağlama (lubrikasyon) ve koruma üzerine etkilidir. Tükürük sayesinde ağız boşluğu serömukozal bir kaplama sağlayarak dokulara karşı yağlama ve koruma özelliğini göstermektedir. Müsinler tarafından yapılan serömukozal kaplama sayesinde dişler erozyona karşı korunur [62]. Bunun yanı sıra ağız dokularının kayganlığı çiğnemeye, konuşmaya ve yutkunmaya yardımcı olur.

Ortamdaki pH değişikliklerine direnme gücü tamponlama gücü olarak ifade edilmektedir. Nötr pH'a sahip olan tükürük etkili bir tampon sistemidir. Tükürüğün içerisinde bulunan üre ve amonyak tükürüğün pH'ını arttırarak tamponlama yapmaktadır. Tamponlama kapasitesi, tükürük akış miktarı ile orantılıdır. Tükürüğün

tampolama işlevi sayesinde dokular bakteri ve besinlerin asitlerine karşı korunmakta ve tükürüğün pH'ı fizyolojik sınırlar içinde tutulabilmektedir [61].

Tükürüğün bileşenlerinden lizozom, immunoglobulin A ve laktoferrin ağız içerisindeki antimikrobiyal ortamı sağlamaktadır. Tükürük, ağız florasında bulunan bakterilerin duvarlarını parçalayarak ve bakteriler için gerekli olan besinleri yok ederek antimikrobiyal etki oluşturmaya görevlidir.

Yediğimiz besinlerin tatlarını algılayabilmemiz için suda çözülmüş halde olması gerekmektedir. Hipotonik halde bulunan tükürük tat veren maddelerin çözünmesini sağlamaktadır. Çözünen maddeler taşınarak tat tomurcuklarının, farklı tatları algılamasına izin verir. Yeni alınan besinlerin tatlarının algılanabilmesi için tükürük dildeki tat veren maddeleri temizler. Tükürüğün içerisinde bulunan gustin isimli proteinlerde tat tomurcuklarından sorumludur [61, 62].

Tükürük sayesinde nişastanın vücuttaki ilk sindirimi gerçekleşmektedir. Alfa amilaz (pityalin) enzimi sayesinde gerçekleşen bu sindirim ağız içerisi ile sınırlıdır.

1.3.4. Tükürük ile Hastalık Teşhisi

Kan, idrar ve tükürük gibi vücut sıvılarından hastalık teşhisi yapılmaktadır. Hastalık tayininde kullanılan bu vücut sıvıları içerisinde tükürüğün bazı avantajları bulunmaktadır:

- Tükürük örneğinin hastadan alınma işlemi daha hızlı gerçekleşmektedir.
- Hasta konforu açısından diğer vücut sıvılarının örnek alma işlemlerine göre üst düzeydir.
- Örnek toplama, saklama ve taşıma gibi durumlar açısından maliyeti daha az ve kolaydır.
- Noninvaziv yöntemler ile örnek alınabilmektedir.
- Hasta ve sağlık personeline bulaşabilecek enfeksiyon riski çok azdır.
- Erken teşhis için önemli bir vücut sıvısıdır.

Bu avantajların yanında kan sıvısında gerçekleştirilen işlemlerde sadece büyük laboratuvarlarda bulunan PCR cihazları kullanılmaktadır. Bunlar oldukça yüksek

maliyetli ve kullanımı uzmanlık gerektiren cihazlardır. Bunların yanı sıra işlem süresinin uzun olması ve kan numunesinin pıhtılaşması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Tükürük ise daha az bir sürede ve daha az maliyetle kesin sonuçlar alınabilmektedir [65].

Günümüzde, tükürükten bakteriyel enfeksiyon teşhisi, bazı klinik laboratuvarlarda yapılabilmektedir:

- *Helicobacter pylori* enfeksiyonuna sebep olan *Helicobacter pylori* (*H. Pylori*) bakterisi, *H. Pylori* tükürük testi (HPS) ile tespit edilebilmektedir. HPS, tükürük numunesi ile *H. Pylori* patojeninin 5 ila 15 dakika içerisinde, hızlı ve kalitatif tespiti için kullanılan basit bir immünokromatografik testtir [66].
- OralDNA laboratuvarı ile yaygınlaşan, MyPerioPath isimli tükürük testi ise periodontal hastalığa neden olduğu bilinen bazı bakterilerin tespiti için tükürük numunesi ile çalışan bir laboratuvar testidir. Bu test, ciddi sistemik sağlık sorunlarıyla bağlantılı olan 11 bakteriyel patojenin varlığını test edebilmektedir [67].

1.3.5. Erken Teşhisin Önemi

Hastalıkların erken evrede teşhis edilmesi, uygulanacak tedavinin başarı oranını önemli ölçüde etkilemektedir. Hastalığın erken tespitinde, oluşabilecek olumsuz etkiler geciktirilebilir, hastalığın gösterdiği belirtilerin şiddeti azaltılabilir veya hastalık tamamen sonlandırılır.

Bazı hastalıkların belirtileri çok geç görülebilmektedir. Böylece kişi hasta olduğunu öğrenene kadar hastalık tedavi edilemez sürece girmiş olabilir. Bu tür hastalıkların belirlenebilmesi için bireylerin sağlık kontrollerini düzenli şekilde yaptırmaları gerekmektedir. Sağlık kontrollerinde belirlenen hastalıklarda erken tanı, hem tedavi sürecinin daha olumlu ilerlemesini sağlamakta hem de hastanın yaşayacağı sıkıntıları minimum seviyeye indirmektedir.

Hastalıkların erken teşhislerinde biyobelirteç adı verilen biyolojik işaretlerin etkisi oldukça büyüktür. Bu biyolojik işaretler, hastalığın varlığının veya hastalığın hangi evrede olduğunun belirlenmesinde önemli rol oynarlar.

Antikor-antijen etkileşimindeki antikor veya antijene, nükleik asit-nükleik asit etkileşimindeki nükleik asitlere (DNA, RNA) veya protein-protein etkileşimindeki proteinlere biyobelirteç denir. Biyobelirteçler, deri, saç teli ve tırnak gibi dokularda bulunabileceği gibi kan, idrar, tükürük ve beyin omurilik sıvısı gibi vücut sıvılarında da görülebilmektedir [65, 68]. Son yıllarda klinik uygulamalarda moleküler teşhislerin önemi artsa da hastalığa özgü biyolojik işaretlerin eksikliği moleküler teşhisleri sınırlandırmıştır.

Tükürüğün serum komponentleri, karotid artere bağlı olan lokal damar ağından elde edilmektedir [68]. Bu nedenle tükürük, büyük kan dolaşımında bulunan birçok molekülü içeren ve hastalıkların erken tanısında kullanılabilen çok büyük bir sıvı kaynağıdır.

Tükürüğün içerisinde protein ve DNA, RNA gibi genetik moleküller bulunmaktadır. İçerik bakımından kana benzeyen tükürük ile yapılan analiz testlerinin ucuz, kolay ve güvenilir olması hastalıkların tanısında tükürük biyoişaretleyicilerinin önemini ortaya koymaktadır. Bazı hastalıkların teşhisine engel olan biyobelirteçlerin eksikliğinin, tükürük biyobelirteçleri ile gelecekte ortadan kalkabileceği düşünülmektedir [69].

Tablo 1.3. Tükürük biyobelirteçleri ve tanıda kullanım alanları [70]

Tükürük Biyoişaretleyici	Kullanım Alanı
DNA	Standart genotip Bakteriyel enfeksiyonlar Baş-boyun kanserlerinin tanısı Adli tıp
RNA	Virüs ve bakterilerin tanısı Baş-boyun kanserlerinin tanısı
Proteinler	Periodontitis Tanısı Baş-boyun kanserlerinin tanısı Çürük kaviteilerinin tanısı
Müsin/Glikoprotein	Baş-boyun kanserlerinin tanısı Çürük kaviteilerinin tanısı
İmmüoglobulinler	Virial hastalıkların tespiti (HBV, HCV, HIV)

Metabolitler	Periodontal hastalıkların tanısı
İlaçlar ve metabolitler	İlaç bağımlılıklarının ortaya çıkarılması Vücuttaki ilaçların tespiti
Virüs, Bakteri	Epstein-Barr virüsü reaktivasyonu
Hücreselel Materyal	Baş-boyun kanserlerinin tanısı

Tükürük tanı materyali olarak:

- Hormonal hastalıklar,
- Kardiyovasküler hastalıklar,
- Enfeksiyon hastalıkları (bakteriyel/viral),
- Onkolojik hastalıklar,
- Böbrek hastalıkları,
- Otoimmün hastalıklar,
- İlaç bağımlılıkları ve kullanılan ilaçların tespit edilmesinde kullanılır [69, 70].

Tükürük tanı yöntemleri gelecekte yaygınlaştığında, sosyoekonomik düzeyi düşük bölgelerde etkili tarama programları gerçekleştirilebilecek, risk grubundaki hastaların saptanması ve tedavi edilmesi ile toplumun sağlık düzeyi yükseltilebilecektir.

1.4. *Escherichia Coli* Tespit Yöntemleri

Escherichia coli bakterisinin saptanması için hali hazırda kullanılan klinik yöntemler ve gelişmekte olan yöntemler bulunmaktadır. Hali hazırda kullanılan yöntemlerin, maliyetinin yüksek ve zaman alıcı olması, çalışmalarda uzman personele ve tespit için ön işleme ihtiyaç duyulması gibi sınırlılıkları bulunmaktadır. Son zamanlarda zaman ve işgücü tasarruflu, hassas ve spesifik yeni tespit yöntemleri araştırılmaktadır. Yeni tespit yöntemlerinin araştırılmasında, en önemli noktalardan biri hassasiyet seviyesidir. Biyosensör temelli olan ve üzerinde hala çalışmaların devam ettiği gelişmekte olan piezoelektrik sensörler ile yapılan tespit işlemleri, yüksek hassasiyeti öne çıkmaktadır. Tablo 1.4.'de *E. coli* bakterisinin tespit edilmesinde, hali hazırda kullanılan ve geliştirmeye çalışılan yöntemlerin avantajları, dezavantajları ve hassasiyet seviyeleri hakkında bilgiler yer almaktadır.

Tablo 1.4. *Escherichia coli* tespit yöntemleri

<i>Escherichia Coli</i> Tespit Yöntemleri	Avantaj	Dezavantaj	Hassasiyet
Hali Hazırda Kullanılan Klinik Yöntemler			
Kültür ve Koloniye Dayalı Yöntemler	- Maliyet - Güvenilirlik - Kararlılık	- Zaman - Eğitimli personel ihtiyacı - Yapılan ön işlemlerin uzunluğu - Endüstriyel uygulamalar için elverişsiz olması	Yüksek [71]
Nükleik Asit Temelli Yöntemler (PCR)	- Duyarlılık - Özgüllük - Güvenilirlik - Düşük konsantrasyonlarda çalışma olanağı	- Maliyet ve zaman - Eğitimli personel ihtiyacı - DNA saflaştırma gereksinimi - Canlı ve cansız hücreler arasında ayırım eksikliği	$3,5 \times 10^3$ CFU/ml [72]
İmmünojenik Temelli Yöntemler (ELISA)	- Zaman - İş gücü - Çok sayıda örnek ile çalışma olanağı	- Spesifiklik - Eğitimli personel ihtiyacı - Antikor-antijen etiketleme ve ön zenginleştirme ihtiyacı	$6,8 \times 10^3$ CFU/ml [73]
Gelişmekte Olan Yöntemler			
Elektrokimyasal Biyosensörler	- Maliyet - Etiketsiz tespit - Çok sayıda örnek ile çalışma olanağı	- Duyarlılık - Seçicilik	$7,8 \times 10^1$ CFU/ml [74]
Optik Biyosensörler	- Hassasiyet - Etiketsiz tespit - Gerçek zamanlı tespit	- Maliyet	3×10^3 CFU/ml [75]
Piezoelektrik Biyosensörler (QCM)	- Maliyet - Hassasiyet - Etiketsiz tespit - Kullanım kolaylığı - Gerçek zamanlı tespit	- Ortam şartları	$1,46 \times 10^3$ CFU /ml [76]

1.4.1. Kültür ve Koloniye Dayalı Yöntemler

Gıda kaynaklı patojen bakterilerin tespit edilmesi için kullanılan geleneksel yöntemler, mikroorganizmaların agar plakaları üzerinde kültürlenmesine ve biyokimyasal kimliklerinin belirlenmesine dayanmaktadır. Geleneksel yöntemler genellikle ucuz ve basit olsa da bu yöntemlerdeki ön işlemler uzun zaman almaktadır. Geleneksel

yöntemlerde ön tanımlama işlemi için genellikle 2-3 gün, patojen türlerinin doğrulanması için en az bir hafta gerekmektedir.

Konvansiyonel yöntemler, gerek kültür ortamının hazırlanması gerekse koloni sayımı gibi işlemlerden dolayı zahmetlidir. Canlı olan fakat kültürülenemeyen patojenleri tespit edemeyen geleneksel yöntemler, düşük hassasiyetleri ile patojen tespitinde yetersiz kalmaktadır.

Kültür ve koloniye dayalı yöntemlerin en büyük dezavantajları yoğun emek istemesi ve zaman alıcı olmasıdır. Bu durum özellikle gıda sektöründe olmak üzere birçok alanda sıkıntı oluşturmaktadır. Dezavantajlarına rağmen, geleneksel kültür yöntemleri hala ilerlemenin mümkün olduğu bir alanı temsil etmektedir. Daha doğru ve hızlı sonuçlar elde etmek için bu sistemler antikor, DNA veya biyokimyasal temelli yöntem gibi diğer patojen tespit yöntemleri ile birleştirilebilmektedir.

Son zamanlarda, gıda kaynaklı patojenlerin saptanması ve tanımlanması için geleneksel yöntemlerin sınırlamalarının üstesinden gelmek için yüksek hassasiyete sahip farklı yöntemler geliştirilmiş ve geliştirilmeye çalışılmaktadır. Nükleik asit, immünolojik ve biyosensör temelli geliştirilen yöntemler ile patojen tespitinde oldukça hassas ve hızlı bir sistem oluşturulmaya çalışılmaktadır. Her bir patojen tespit yönteminin kendi avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Araştırmacılar hala yerinde analiz yapabilen hızlı, duyarlı ve özgül iyileştirmeler ile yeni yöntemler geliştirmektedir.

1.4.2. Nükleik Asit Temelli Yöntemler

1.4.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Gıda kaynaklı bakteriyel patojenleri tespit etmek için kullanılan nükleik asit temelli yöntemlerden biri polimeraz zincir reaksiyonudur. PCR, polimeraz zincir reaksiyonunun İngilizce karşılığı olan Polimeraze Chain Reaction kelimelerinin baş harflerinden oluşmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), mantar, virüs veya bakteri gibi herhangi bir organizmaya ait belirli bir DNA dizisinin *in vitro* olarak çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayarak, DNA'nın milyarlarca kopyasını oluşturan bilimsel bir tekniktir.

Polimeraz zincir reaksiyonu, Kary Mullis isimli Amerikalı biyokimyacı tarafından 1984 yılında geliştirilmiştir. Mullis, bu buluşundan dolayı 1993 yılında Nobel Ödülü kazanmıştır [77]. PCR şu anda tıbbi ve biyolojik araştırma laboratuvarlarında çeşitli uygulamalar için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu teknik bir çeşit DNA klonlama işlemidir. Bir PCR reaksiyonunun gerçekleşmesi için gereken 6 adet temel bileşen bulunmaktadır [77, 78, 79]:

1. Kalıp DNA: Polimeraz zincir reaksiyonunun başlangıç materyalidir. Yani amplifiye edilecek baz dizisine sahip genetik materyali temsil etmektedir. PCR uygulaması için çok küçük DNA bölgeleri yeterlidir. PCR'daki en önemli nokta çoğaltılacak DNA'nın işlevsel özellikte olmasıdır.
2. Primerler: 15-25 nükleotidden oluşan, DNA sentezleyicide özel olarak sentezlenen spesifik bir sekansa sahip, DNA'nın PCR tekniği ile çoğaltılmasında kullanılan oligonükleotidlerdir. Primerler, başarılı bir PCR reaksiyonu gerçekleşmesi için kritik bileşenler olup çoğaltılmak istenilen DNA parçasının iki ucu ile eşleşmektedir. 5' uçlu primer DNA'nın ilgili bölümünün bir ucundaki üst iplikçikle eşleşirken diğer primer, Şekil 1.7. 'da gösterildiği gibi diğer uçtaki alt iplikçikle eşleşmektedir. Primer tasarımı yapılırken çoğaltılmak istenen DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınmaktadır.



Şekil 1.7. Primer tasarımı [77]

3. DNA Polimeraz: Canlı bir organizmada hücre döngüsü sırasında DNA'nın çoğalmasını sağlayan bir enzim kompleksidir. Bu enzim tamamlayıcı olan iki DNA ipliğini ayırmak için gerekli olan yüksek sıcaklığa (95 ° C) tolerans gösterebilmektedir. DNA polimeraz enzimleri, kalıp DNA'yı kullanır, onu okuyup, onun boyunca deoksiribonükleotitlerin polimerizasyonunu katalizler.

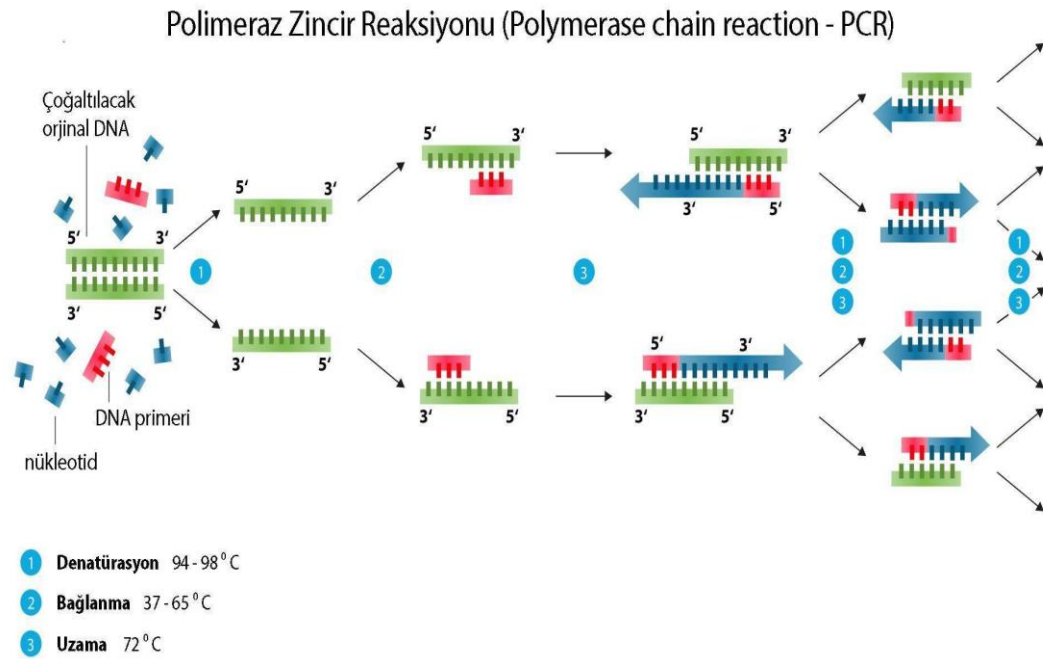
4. Nükleotidler (Deoksiribonükleozid Trifosfat (dNTPs)): DNA molekülünün sentezlenmesi için 4 tip nükleotidin (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) karışımı olan deoksiribonükleozid trifosfat karışımına ihtiyaç duyulmaktadır. dNTP moleküllerinin miktarı; hedef DNA'nın sayısı, uzunluğu ve döngünün kaç kere tekrarlanacağı ile doğrudan ilişkilidir.
5. PCR Tamponları: Reaksiyon döngüleri sırasında doğru pH'ın korunmasına yardımcı olarak enzimlerin çalışması için gerekli iyonları sağlamaktadır. Polimeraz enzimleri aktiviteler için serbest magnezyum iyonlarına gereksinim duymaktadır. Bu yüzden magnezyum içeren tamponlar tercih edilmektedir.
6. Reaksiyon Koşulları: PCR'da DNA'nın hangi oligonükleotid ile çoğaltılacağı zaman, sıcaklık ve döngü sayısı gibi parametreleri etkilemektedir.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) prosedürü, 20-40 tekrarlı döngüden oluşan otomatik bir termal döngüleyici makinesinde gerçekleştirilmektedir. Her döngü ayrışma, birleşme ve uzama aşamalarını içeren üç adımdan oluşmaktadır [78, 79]:

1. Ayrışma (Denatürasyon): Bu aşamada çift iplikli hedef DNA'nın birbirinden ayrılması sağlanmaktadır. Çift sarmallı olarak bulunan DNA, hidrojen bağlarının kopmasıyla tek sarmal haline getirilmektedir. Bu aşama genellikle 5 dakika sürmektedir. Ayrışmanın gerçekleşmesi için sıcaklık yaklaşık 95°C' de olmalıdır. Ayrışmanın gerçekleştiği sıcaklığın yüksek olması veya işlem süresinin uzaması gibi etkenler prosedürde kullanılan enzimleri olumsuz etkilemektedir.
2. Birleşme (Primerlerin Bağlanması, Hibridizasyon): PCR'ın bu aşamasında; hedef DNA bölgesine özel olarak tasarlanan primerler, ayrışma adımında elde edilen tek sarmallı DNA'nın üzerindeki tamamlayıcı olan diziyeye bağlanmaktadır. DNA sarmalı ile primerler arasındaki hidrojen bağlarının oluşması için sıcaklığın yaklaşık 37-65 °C arasında olması gerekmektedir. Fakat bu sıcaklık primerlerin uzunluğuna ve nükleotid yapısına göre değişkenlik gösterebilmektedir.

3. Uzama (Polimerizasyon): PCR işlemlerinin bu aşaması; DNA polimeraz enziminin en yüksek aktivasyonu gösterdiği sıcaklık olan 72 °C' de gerçekleşmektedir. DNA polimeraz enzimi, nükleotidleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek primerin uzamasını sağlayarak çift iplikli DNA'nın sentezini gerçekleştirmektedir.

Yukarıda verilen üç basamak PCR tekniğinin bir döngüsünü oluşturmaktadır. Üç aşamadan oluşan ve toplamda 10-15 dakika kadar süren bu prosedür sonunda DNA'nın ilk çoğalma aşaması tamamlanmaktadır.



Şekil 1.8. PCR döngü aşamaları [80]

PCR; hemofili gibi kalıtsal hastalıkların teşhisinde, kanser araştırmalarında, adli tıp çalışmalarında, babalık testlerinde, biyoteknolojik alanda rekombinant proteinlerin ve rekombinant aşıların geliştirilmesinde, bakteri ve virüslerin tespitinde kullanılmaktadır.

Çok düşük konsantrasyonlardaki DNA veya RNA'nın, özel bir bölgesinin kısa süre içerisinde çoğaltılabilmesi, hassasiyet, spesifiklik ve hata oranı açısından güven oluşturması PCR yöntemin avantajları iken pahalı laboratuvar ekipmanlarına ihtiyaç olması, hem cihazın kullanımı hem de sonuçların analiz edilmesi için çok iyi eğitilmiş

eleman gerekliliği, kullanılan sarf malzemelerin pahalılığı ve işlemin uzun zaman alması bu yöntemin dezavantajlarıdır [77, 78, 79].

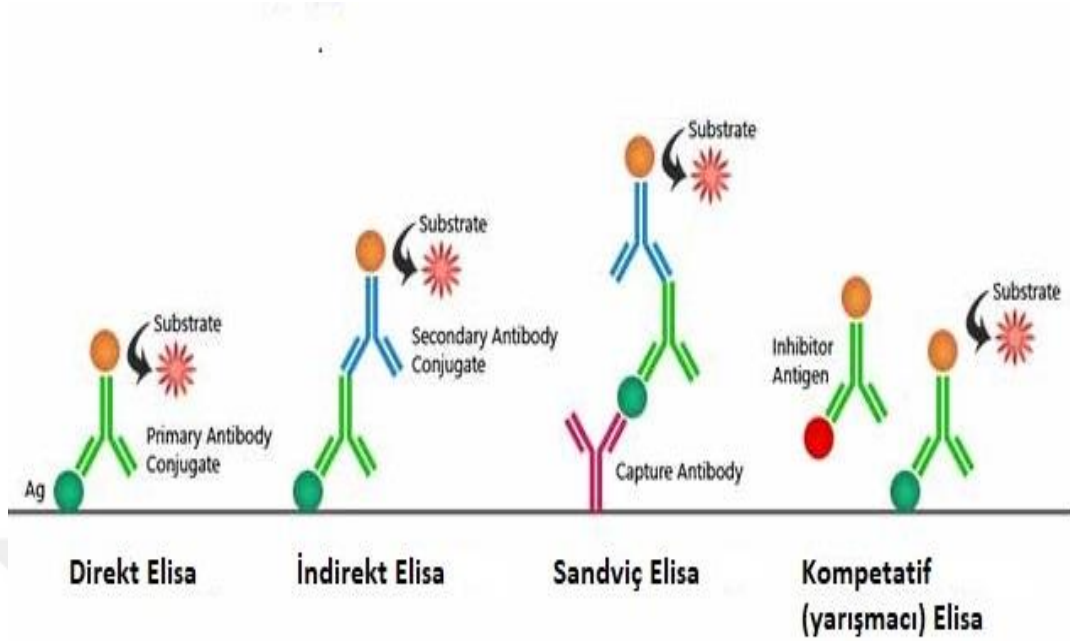
1.4.3. İmmünolojik Temelli Yöntemler

Gıda kaynaklı patojenlerin immünolojik temelli yöntemlerle tespiti, antikor-antijen etkileşimlerine dayanmaktadır. Bu yöntemlerde antikor kendisine spesifik olan antijenine bağlanır. Bu bağlanma mukavemeti, yöntemin duyarlılığını ve özgüllüğünü belirler. İmmünolojik temelli yöntemlerde, poliklonal veya monoklonal antikorların kullanılabilmektedir. Enzim bağlı immünosorbent test (ELISA), gıda kaynaklı patojenlerin saptanması için en sık kullanılan immünolojik temelli yöntemler arasındadır.

1.4.3.1. Enzim Bağlı İmmünosorbent Test (ELISA)

ELISA, enzim bağlı immünosorbent test ifadesinin ingilizce karşılığı olan Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay kelimelerinin baş harflerinden oluşmaktadır. Gıda kaynaklı patojenlerin saptanması için yaygın olarak kullanılan immünolojik bir yöntemdir. ELISA; enzim ile işaretlenmiş antikorlar (konjugat) ve substrat kullanılarak, şüpheli materyalde bunlara karşı oluşmuş antikor varlığının araştırılması amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Farklı ELISA yöntemleri bulunmaktadır [82]:

- Doğrudan (Direkt) ELISA Testi
- Dolaylı (İndirekt) ELISA Testi
- Sandviç ELISA Testi
- Rekabetçi (Kompetatif) ELISA Testi



Şekil 1.9. ELISA çeşitleri [81]

Temel ELISA prosedürü, kaplama, bloklama, tespit etme ve okuma olmak üzere 4 aşamadan oluşmaktadır. ELISA testi, bir hedef antijen veya antikordan oluşan birinci katmanın 96 kuyucuklu bir polistiren plaka üzerine absorbe edildiği bir kaplama aşamasıyla başlar. Bu aşamayı, bağlı olmayan alanların bir bloke edici ajan ile engellendiği bloklama aşaması izler. Bir dizi yıkamanın ardından, plaka enzim ile konjüge edilmiş antikor ile inkübe edilir. Başka bir yıkama serisi, bağlı olmayan tüm antikorları çıkarır. Substrat eklendikten sonra son olarak, plakadaki absorbans değişikliği okunur ve ELISA testi tamamlanır.

Hepatit B, Hepatit C, HIV, Lyme hastalığı, rotovirüs, frengi, suçiçeği ve bazı virüs hastalıklarının tespitinde ELISA testi kullanılmaktadır [81].

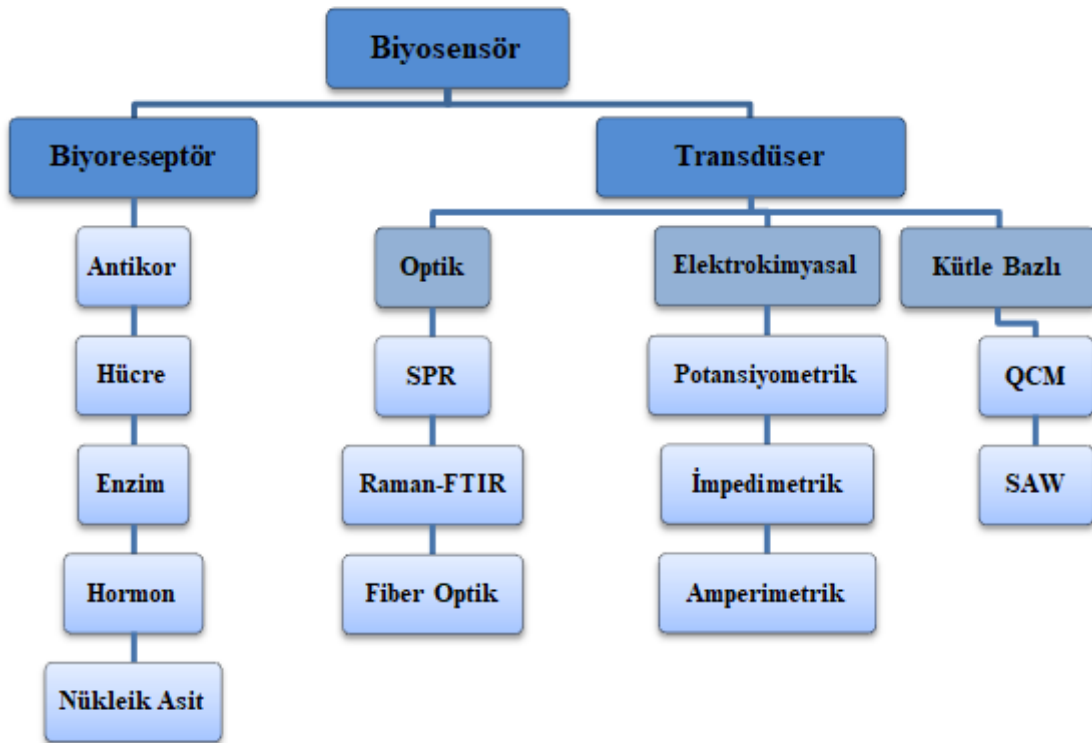
ELISA, bakteriyel toksinlerin tespitini gerçekleştirebildiği, hassas ölçümler yapabildiği, çok sayıda örneği aynı anda test edebildiği, zamandan ve işgücünden verimlilik (otomatik sistem) sağladığı için avantajlıdır. Fakat antikorların veya antijenlerin etiketlenme gerekliliği, spesifikliğin düşük olması, eğitilmiş personel gerektirmesi ve hücre yüzeyi antijenlerini için ön zenginleştirme gereksinimi açısından dezavantajlıdır [82].

1.4.4. Biyosensör Temelli Yöntemler

Gıda kaynaklı patojenleri tespit etmek için hali hazırda kullanılan yöntemlerin aksine düşük maliyetle yerinde gerçek zamanlı izleme yapılabilen, hızlı, güvenilir, basit, spesifik ve hassas olan yeni teknolojilere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla biyosensör temelli yöntemler geliştirmeye çalışılmaktadır.

Biyosensör, biyokimyasal bir yanıtı okuyan ve fiziksel, kimyasal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlardır. Biyoreseptör ve dönüştürücü (transdüser) olmak üzere iki ana kısımdan oluşmaktadır. Biyoreseptörler, analiti tanıyan biyomoleküller (enzim, antikor, nükleik asit, hormon vb.), dönüştürücüler ise biyoreseptörün analiti tanıdığı anda ürettiği kimyasal veya fiziksel sinyali, elektrik sinyallerine dönüştüren yapılardır [83].

Biyosensörler, biyoreseptörelere veya dönüştürücü türlerine göre Şekil 1.10.'da verildiği gibi sınıflandırılabilir.



Şekil 1.10. Biyosensörlerin sınıflandırılması

1.4.4.1. Elektrokimyasal Biyosensörler

Gıda kaynaklı patojenlerin tespit edilmesi ve miktarının belirlenmesi için kullanılan başka bir olası yöntem de elektrokimyasal biyosensörlerdir. Antijen ile biyoreseptör etkileşimlerinden kaynaklanan akım, empedans, voltaj ve iletkenlikteki değişikliklerin ölçülmesine göre amperometrik, impedimetrik, potansiyometrik ve kondüktometrik gibi farklı çeşitleri bulunmaktadır.

1.4.4.1.1. Amperometrik Biyosensörler

Amperometrik biyosensörler alanındaki araştırmalar, 1956 yılında oksijen elektrotları üzerinden Clark tarafından başlatılmıştır. Amperometrik biyosensörler, patojen tespiti için kullanılan en yaygın elektrokimyasal tespit yöntemidir. Bu biyosensörlerin sinyali, biyoreseptör tabakasındaki biyolojik sistem ile elektrot arasındaki elektron değişimi ile üretilmektedir.

Amperometrik ölçüm, sabit gerilim altındaki elektrokimyasal hücreden geçen akım yoğunluğunun ölçülmesi prensibi ile çalışmaktadır. Amperometrik biyosensörlerde, referans ve ölçüm elektrotu olmak üzere iki elektrot kullanılmaktadır. En basit amperometrik biyosensörlerde, Clark oksijen elektrotu tercih edilmektedir. Ölçüm elektrotu yükseltgenme veya indirgenme reaksiyonlarını gerçekleştirmekte olup analitin yapısına göre katot veya anot olarak davranabilmektedir.

Büyük ölçüde basitliği, üretim kolaylığı, düşük maliyeti gibi avantajlarından ötürü amperometrik biyosensörler sıklıkla kullanılmaktadır.

Birçok araştırmacı, *E. coli O157: H7* gibi gıda kaynaklı patojenlerin amperometrik biyosensörler ile tespit edilebildiğini bildirmiştir [85, 86].

1.4.4.1.2. Potansiyometrik Biyosensörler

Potansiyometrik biyosensörler, sabit akımda çalışan elektrokimyasal bir biyosensördür. Potansiyometri, en genel anlamda bir çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümü ile gerçekleştirilmektedir. Referans elektrot, bulunduğu çevreden etkilenmeyen ve gerilim değeri sabit olan elektrotu temsil ederken ölçüm elektrotu, katı ve sıvı yüzeyde oluşan indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonları sonucu oluşan

gerilim değerini temsil etmektedir [83]. Potansiyometrik biyosensörlerde kullanılan temel sensörler, pH ya da tek değerlikli iyonlara duyarlı cam elektrotlar, anyon veya katyonlara duyarlı iyon seçimli elektrotlar ve karbondioksit ya da amonyağa yönelik gaz duyarlı elektrotlardır.

Farklı çeşitlerde potansiyometrik biyosensörler bulunmaktadır. Bunlardan biri de ışığa duyarlı potansiyometrik sensörlerdir (LAPS). LAPS, sulu çözeltilerin analit konsantrasyonlarının çözülmüş bir şekilde belirlenmesini sağlayan yarı iletken tabanlı bir potansiyometrik sensördür. 1988 yılında Hafeman tarafından önerilen yarı iletken bir cihaz olup günümüzde iyon duyarlı alan etkisi transistörü (ISFET) olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. LAPS, silikon / silikonoksit / silikon nitrürden oluşan heteroyapıya sahiptir. LAPS, iyon konsantrasyonu, redoks etkisi, vb. dahil olmak üzere yüzey potansiyelinin değişmesine neden olan tüm olayları tespit edebilir. Alan etkisi temelli olan bu potansiyometrik sensörler, yüksek pH duyarlılığından dolayı da diğer potansiyometrik biyosensörlere üstünlük sağlamaktadır [84].

Işığa duyarlı potansiyometrik sensörler, sebze gıdalarındaki *E. coli* hücrelerinin tespitinde [87] kullanılmıştır. Farklı bir çalışmada ise Gehring ve arkadaşları, tamponlu tuzlu su içinde *E. coli O157: H7* hücrelerinin hızlı tespiti için ışığa duyarlı potansiyometrik sensörler (LAPS) ile birlikte bir immünoligand analizi (ILA) geliştirmişlerdir [88].

1.4.4.1.3. Kondüktometrik (İletkenlik) Biyosensörler

İncelenen bir analitin elektrotlar arasındaki elektrik akımı iletme kabiliyeti, kondüktometrik cihazlar ile ölçülmektedir. Dışarıdan uygulanan akım nedeniyle iki elektrot arasında iyon hareketliliği oluşmaktadır. Kondüktometrik biyosensörler, bu iyon hareketliliğini ölçmektedir. Bu biyosensörlerde algılama, elektrotlar arasındaki boşluğun kimyasal seçicilik sağlayan biyolojik bir molekülün modifikasyonu ile sağlanmaktadır. Analit, seçici moleküle bağlandığı zaman iletkenlik değişmekte ve kondüktometrik biyosensörler bu değişimi algılamaktadır.

İki elektrot arasındaki bir çözeltinin iletkenliği, bir enzimatik reaksiyonun sonucunda değişir. Dolayısıyla, bir çözeltilde yüklü türlerin konsantrasyonunda değişiklikler üreten enzimatik reaksiyonları incelemek için kondüktometrik cihazlar kullanılabilir.

Muhammed ve arkadaşları, *E. coli O157: H7* ve *Salmonella* gibi gıda kaynaklı patojenlerin tespiti için iletkenlik biyosensörü geliştirmiştir [89]. 10 dakika içerisinde tamamlanan patojen tespitinin, tespit alt sınırının 7.9×10^1 CFU/mL olduğu bildirilmiştir.

1.4.4.1.4. İmpedimetrik Biyosensörler

Empedansın, patojenlerin tespiti için biyolojik tanıma teknolojisiyle entegrasyonu, son yıllarda yaygın olarak kullanılan empedans biyosensörlerinin gelişmesine yol açmıştır. İmpedimetrik biyosensörler, biyolojik tanıma elemanlarının bir elektrot yüzeyi üzerine immobilizasyonu ile oluşturulur [90]. Analitin çıkışta oluşturduğu elektriksel empedans sinyali, ölçülerek veya izlenerek sonuç raporu oluşturulur.

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), biyosensör gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. EIS, elektrik iletken polimerlerin yüzeylerinde biyoafinite etkileşimlerini araştırmak için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir ve impedimetrik transdüksiyon yoluyla analitlerin etiketsiz tespitini araştırmak için de kullanılmaktadır. EIS, amperometrik veya potansiyometrik biyosensörler ile karşılaştırıldığında etiketsiz algılama sunması açısından avantajlı olsa da algılama limitleri geleneksel yöntemlere göre daha düşüktür.

1.4.4.2. Optik Biyosensörler

Optik biyosensörler, duyarlılıkları ve seçicilikleri nedeniyle bakteriyel patojen tespiti için büyük ilgi görmüştür. Bu sensörler, biyokimyasal reaksiyonun bir sonucu olarak emilen veya yayılan ışığın ölçülmesi prensibi ile çalışmaktadır.

Optik teknikler, birçok biyolojik ve kimyasal maddenin doğrudan, gerçek zamanlı ve etiketsiz algılanmasını sağladığından geleneksel tekniklere göre büyük avantajlar sumaktadır [91].

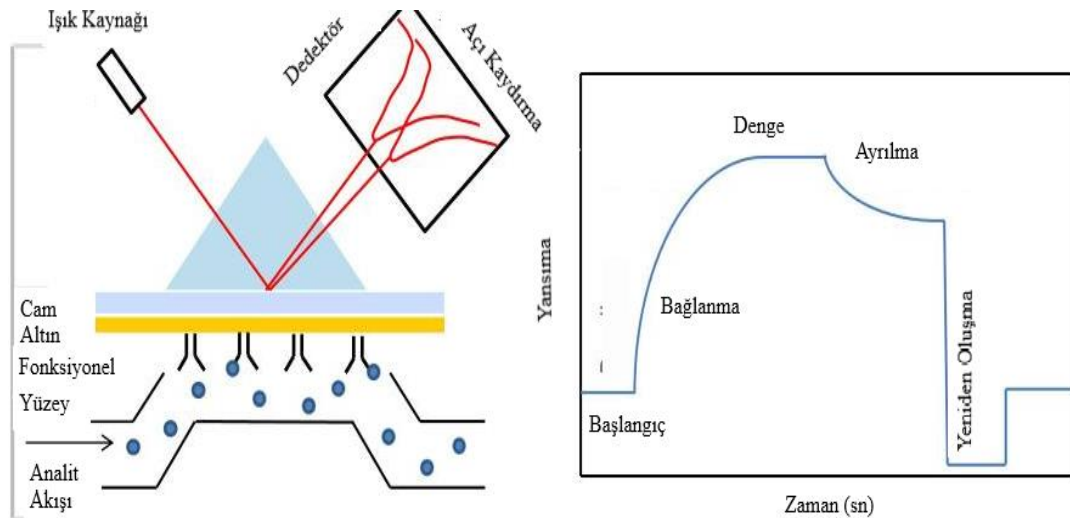
Optik biyosensör, optik dönüştürücü sistemi ile entegre edilmiş bir biyotanıma elemanı içeren kompakt bir analiz cihazıdır. Bu biyosensörlerin temel amacı, ölçülen bir maddenin (analit) konsantrasyonu ile orantılı bir sinyal üretmektir. Optik biyosensörler;

enzim, antikor, antijen, nükleik asit, bütün hücreler ve dokular dahil olmak üzere çeşitli biyolojik materyalleri biyotanıma elementleri olarak kullanabilir.

1.4.4.2.1. Yüze Plazmon Rezonans (SPR) Biyosensörler

SPR'nın fiziksel fenomeni, ilk olarak 1902 yılında gözlenmiştir. Yıllar boyunca bu olgu üzerinden yüze plazmon fiziğinin tam olarak anlaşılması için çalışmalar yapılmış ve 1983 yılında SPR ilk olarak biyomoleküler etkileşimleri tespit etmek için SPR temelli bir sensör olarak kullanılmıştır [92].

Patojen tespiti için yansıtma spektroskopisini kullanan yaygın bir yöntem, yüze plazmon rezonansıdır (SPR). SPR, metal yüzeze yakın kırılma indisindeki değişimi ölçerek basit ve doğrudan ölçüm yapan bir tekniktir. SPR yönteminde geçirgen ve farklı kırılma indisli iki ortam arasında (cam prizma ve çözelti) ince metal bir film kullanılır. Metal film genellikle altın veya gümüştür. Düzlem polarize ışık, belirli bir açı ile daha yüksek kırılma indisli bir ortama girdiğinde iç yansımaya uğrar. Bu koşullarda kendiliğinden sönümlü dalga adı verilen ışık, metal filmin içine nüfuz eder. Belirli bir kırılma açısında bu dalga, metal yüzeyindeki serbest elektronların yüze plazmonları oluşturmasına sebep olur ve yansıyan ışığın yoğunluğu düşer. Bu olaya yüze plazmon rezonans denir. Bu yöntem kullanılarak patojenlerin doğrudan etiketsiz tespiti de mümkündür. Şekil 1.11.'da bir SPR cihazının çalışma prensibi verilmiştir.



Şekil 1.11. SPR'in çalışma prensibini ve analitik döngünün adımlarını gösteren SPR grafiği [92]

SPR temelli biyosensörler, gıda kaynaklı patojenlerin tespiti için birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Waswa ve arkadaşları, SPR temelli biyosensör kullanarak *E. coli O157: H7* patojeninin tespit edilebileceğini göstermiştir [93]. Bu biyosensörde, bir LED'den gelen ışık, altın bir yüzeyden yansıtılmakta ve minimum SPR'ye karşılık gelen açı ve yoğunluk ölçülmektedir. 30 dakikada gerçek zamanlı olarak gerçekleştirildiği savunulan *E. coli O157: H7* tespitinin duyarlılığı 10^2-10^3 CFU/mL olarak belirtilmiştir.

1.4.4.2.2. Optik Fiber Biyosensörler

Optik fiberler, optik algılama cihazlarındaki potansiyelleri için araştırılmış ve fiber optik kimyasal algılama ile biyoalgılama alanlarında son on yılda çok sayıda başarı elde edilmiştir. Uzaktan ve gerçek zamanlı izleme için küçük boyutlu sensörlere olan talep nedeniyle optik fiberler maliyeti, küçük boyutu, hafifliği, uzaktan algılama yeteneği ve esnekliği gibi ayırt edici avantajları sayesinde kimyasal sensörlerin ve biyosensörlerin üretimi için çok yönlü ve mükemmel bir platform haline gelmiştir [95].

Toplam iç yansıma ilkesine dayanarak, optik fiberler ışığı iletir. Fiber optik biyosensörler, algılama yüzeyine uyarma lazer ışığı göndermek ve yayılan ışığı almak için konik fiber kullanır. Bir fiber veya dalga kılavuzu yoluyla ışığın yayılması, çevreye karşı çok hassas olabilir. Bu durum optik fiberleri, patojenlerin tanımlanması ve saptanması gibi gıdalardaki çeşitli uygulamalar için mükemmel dedektörler yapmaktadır.

Simpson ve arkadaşları tarafından, fiber optik biyosensörlerin diğer optik tekniklerle kombinasyonlu kullanılması sonucunda *Listeria*, *Salmonell*, *E. coli O157: H7* ve *Clostridium botulinum* gibi gıda kaynakları patojenlerin tespit edildiği bildirilmiştir [94].

1.4.4.3. Piezoelektrik Biyosensörler

1.4.4.3.1. Piezoelektriğin Tarihçesi

Piezoelektrik, bazı malzemelerin mekanik deformasyon nedeniyle elektrik yükü üretme kabiliyeti olarak tanımlanır. Adı, basınç anlamına gelen eski bir Yunanca kelime olan “piezein” kelimesinden türetilmiştir. Kristal fiziğin bir araştırma alanı olan

piezoelektriğin çalışmaları, Jacques Curie ve Pierre Curie kardeşler tarafından başlatılmıştır.

İlk olarak 1880 yılında turmalin, şeker kamışı ve kuvars dahil olmak üzere çeşitli kristallerin piezoelektrik özellik gösterdiği Pierre ve Jacques Curie kardeşler tarafından keşfedildi [96]. Jacques ve Pierre Curie kardeşler 2 Ağustos 1880 yılında Fransız Bilim Akademisi'nde piezoelektrik etki keşfettiklerini açıkladılar. Piezoelektriğin temelleri bu bir yıl içinde Lippmann tarafından termodinamiğin ilkeleri ile ortaya çıkarıldı. Lippmann tarafından ortaya çıkarılan piezoelektriğin matematiksel temeli ile Curie kardeşler piezoelektriğin varlığını kanıtlayarak çalışmalarına devam ettiler.

I. Dünya Savaşı sırasında, piezoelektrik cihazları kullanılarak bu alandaki ilk büyük adım atılmıştır. Savaş sırasında batık büyük nakliye gemilerin bulunması için bir araç geliştirilmesi gerekti. Radyo dalgaları deniz suyunu geçemediği için akustik dalgaların geliştirilecek araç için daha uygun olabileceği kanısına varıldı. Bu çalışmada yer alan Fizikçi Paul Langevin, 1918 yılında kuvars temelli piezoelektrik dönüştürücü kullanarak ultrasonik bir denizaltı algılama tekniği geliştirdi. Sonar olarak bilinen bu yaklaşım daha sonra her iki dünya savaşında da kullanıldı. Langevin'in icadı ultrasonik transdüserler, mikrofonlar ve ivmeölçerler gibi piezoelektrik ile yapılabilecek başka çalışmalar için fırsatlar yarattı.

1945 yılında karışık oksit bileşik baryum titanat $BaTiO_3$ 'ün keşfi sayesinde piezoelektrik küresel pazara sunuldu. Bu bileşik kolay imal edilebilen, düşük fiyat ile şekillendirilebilen ve piezoelektrik özellikler gösteren ferroelektrik seramik bir malzemedir. 1950'lerde kurşun zirkonat titanat (PZT) ailesinin keşfi ile modern piezoelektriklik tarihi başladı. Bugüne kadar, PZT malzemesi en yaygın kullanılan piezoelektrik malzemelerden biridir [97].

Piezoelektrik dönüştürücüler ile ultrasonik gecikme hatları, ultrasonik tıbbi teşhis ve tedavi cihazları, fiziksel ve kimyasal madde özelliklerinin devamlı endüstriyel kontrolü için kullanılabilecek cihazlar ve daha fazlası keşfedildi. Aynı zamanda daha etkili elektro akustik transdüserler kullanıma sunuldu.

Günümüzde piezoelektrik dönüştürücüler; ultrasonik tomografi, nabız ölçümleri, ton ölçümleri, üroloji, oftalmoloji, tıp ve biyomühendislik dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılmaktadır.

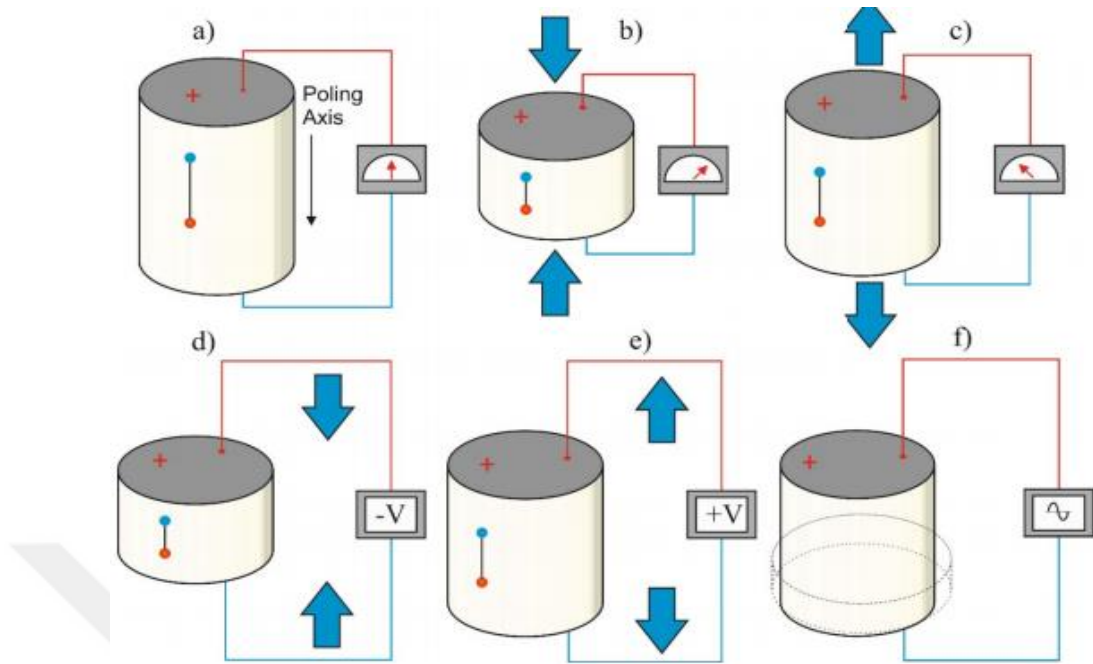
1.4.4.3.2. Ferroelektrik Özellik

Ferroelektrik , piroelektriklik ve piezoelektrikliğin bir alt kümesidir. 1921 yılında Rochelle tuzunda bulunan ferroelektrikliğin, ilk keşfinden bu yana suda çözünür kristallerden oksitlere, polimerlere, seramiklere ve hatta sıvı kristallere kadar çok çeşitli malzemelerde ferroelektrik etki gözlemlenmiştir.

Ferroelektrik malzemeler, kristal yapısı yüksek elektrik alan altında ani olarak kutuplanabilme yeteneğine sahip olan malzemeler olarak tanımlanabilirler. Bir ferroelektrikte spontan (doğal) dipol moment, harici bir elektrik alanı uygulayarak yeniden yönlendirilebilir. Bu grubun en bilinen üyeleri, baryum titanat ($BaTiO_3$) ve lityum niobattır ($LiNbO_3$). Ferroelektriklerin yaygın olarak kullanılmasının temelini oluşturan en belirgin özellikleri, son derece yüksek dielektrik geçirgenlik, sıcaklığa ve elektrik alanına çok güçlü bağımlılıklarıdır [98]. Bu özellikteki malzemeler sensörler, sıcaklık düzenleyiciler/stabilizatörler, doğrusal olmayan kondansatörler, elektromagnetik radyasyon alıcıları ve radyo dalgalarından görünür ışığa kadar frekans aralığında çalışan cihazlarda kullanılmaktadır.

1.4.4.3.3. Piezoelektrik Özellik

Piezoelektrik özellik, kristal simetriye sahip olmayan (anizotropik) malzemelerde gözlenen ve gerilme veya deformasyonun elektrik alanla olan ilişkisi olarak tanımlanabilir. Piezoelektrik malzemelerin iki ana işlevi vardır. İlk işlevi, mekanik gerilime maruz kalan piezoelektrik malzemenin elektrik yükü üretmesidir. Düz piezoelektrik etki olarak adlandırılan bu davranışın tersi de geçerlidir. Yani elektrik potansiyeli uygulanan malzeme mekanik değişime uğrar. Bu davranış piezoelektrik malzemelerin ikinci işlevi olan ters piezoelektrik etki olarak adlandırılmaktadır [99]. Her iki etkinin şematik gösterimi Şekil 1.12.'de verilmiştir.



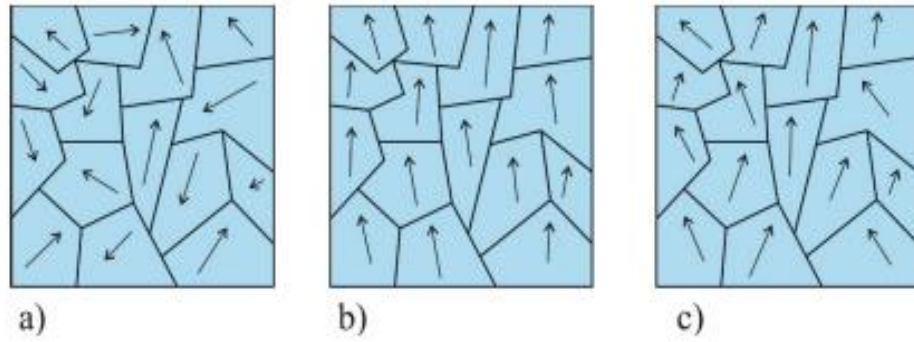
Şekil 1.12. Piezoelektrik etki, a) polarizasyon, b), c) düz piezoelektrik etki ve d), e), f) ters piezoelektrik etki [99]

1.4.4.3.4. Polarizasyon

“Poling”, yeterince yüksek elektrik alanı uygulanarak malzemede polarizasyonun üretilmesi işlemidir. Ferroelektrik bir malzemeye elektrik alanı uygulandığında, mikroskobik ferroelektrik alanlar uygulanan alanın yönünde kendilerini yönlendirirler. Elektrik alan arttıkça daha fazla alan yönlendirilir ve elektrik alan yeterince yükseldiğinde neredeyse tüm alanlar aynı yönde olur. Bu durumdaki malzemeler maksimum polarizasyona sahiptir [99]. Elektrik alanı uygulanırken malzeme yüksek bir sıcaklıkta (geçiş sıcaklığına yakın) tutulursa, alanların yönlendirilmesi kolaylaştırılır. Polarizasyon işlemi aşağıdaki adımları içerir:

1. Malzeme, geçiş sıcaklığından biraz daha düşük bir sıcaklığa ısıtılır ve o sıcaklıkta tutulur.
2. Malzemeye yaklaşık 2-3 saat boyunca yüksek bir elektrik alan uygulanır. Tüm ferroelektrik alanlar elektrik alanı yönünde yönlendirilir ve malzeme doyumluk polarizasyonuna ulaşır.
3. Malzeme, elektrik alan açık tutularak oda sıcaklığına gelene kadar soğutulur. Alanlar, yönlendirilmiş durumda dondurulmuş olarak kalır.

4. Elektrik alan kapatılır. Malzeme, alanların çoğu aynı yönde olacak şekilde maksimum polarizasyon durumunda kalır. Elektrik alandan çıkan malzeme tekrardan eski haline dönemez.



Şekil 1.13. Polarizasyon işlemlerinin şematik gösterimi a) polarizasyondan önce alanların rastgele yönelimi, b) elektrik alan ile yönlendirilen alanlar, c) elektrik alandan sonraki kalıcı polarizasyon [99]

1.4.4.3.5. Piezoelektrik Malzemeler

Piezoelektrik etki sergileyen malzemeler üç ana gruba ayrılır:

- Doğal ve sentetik piezoelektrik malzemeler
- Polarize piezoelektrik seramikler malzemeler
- Polimer piezoelektrik malzemeler

Doğal piezoelektrik malzemeler, kuvars, Rochelle tuzu, Turmalin grubu mineraller, şeker kamışı, emaye, kemik, saç ve kauçuk gibi bazı organik maddelerdir. 1935'ten beri kuvarsın yerini alabilecek piezoelektrik kristaller üretilmeye çalışıldı. Amonyum ve potasyum tuzları ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{P}_04$ - ADP, KH_2P_04 - KDP), etilen diamin tartrat (EDT), dipotasyum tartrat (DKT) ve lityum sülfat monohidrat (LH) gibi piezoelektrik kristaller geliştirildi. Bu malzemelerden kuvars hariç çoğu yapay kuvars, ferroelektrik kristaller veya piezoelektrik seramiklerin geliştirilmesi ve üretimi nedeniyle artık kullanılmamaktadır.

Ferroelektrik seramiklerin güçlü piezoelektrik özelliklerinin keşfi, piezoelektrik uygulamalarında önemli bir adım oldu. Ferroelektrik seramikler günümüz mühendislik uygulamalarında en yaygın kullanılan piezoelektrik malzemedir. Bunlar arasında

baryum titanat ($BaTiO_3$) ve kurşun zirkonat titanat (PZT) gibi polikristalin seramikler, özellikle düşük üretim maliyetleri ve şekillendirme kolaylıkları nedeniyle en popüler malzemelerdir [100]. Ayrıca olağanüstü piezoelektrik ve dielektrik özellikler sergilemeleri onları aktüatör alanında vazgeçilmez kılmaktadır.

Piezoelektrik seramikler genellikle iki gruba ayrılır. “Sert” ve “yumuşak” katkılı piezoelektrik malzemeler, ferroelektrik özelliklerine yani dipollerin veya alanların hareketliliğine, polarizasyon/depolarizasyon davranışına uygun olarak isimlendirilmiştir. “Sert” piezoelektrik malzemeler, sıcaklık, elektrik alanı ve stres ile ilgili özellikleri stabil olan malzemelerdir. Yüksek güç çalıştırma gerektiren uygulamalarda kullanılırlar. “Yumuşak” piezoelektrik malzemeler, algılama, çalıştırma veya her ikisi için özellikleri geliştirilmiş malzemelerdir [100].

En son keşfedilen piezoelektrik malzeme grubu PVDF filmlerdir (poliviniliden florür). 1969 yılında Japonya'da keşfedilen PVDF iki tipte olabilir: Piezo-polimer ve iki farklı seramikten yapılmış kompozit malzemeler olan piezo-kompozitler.

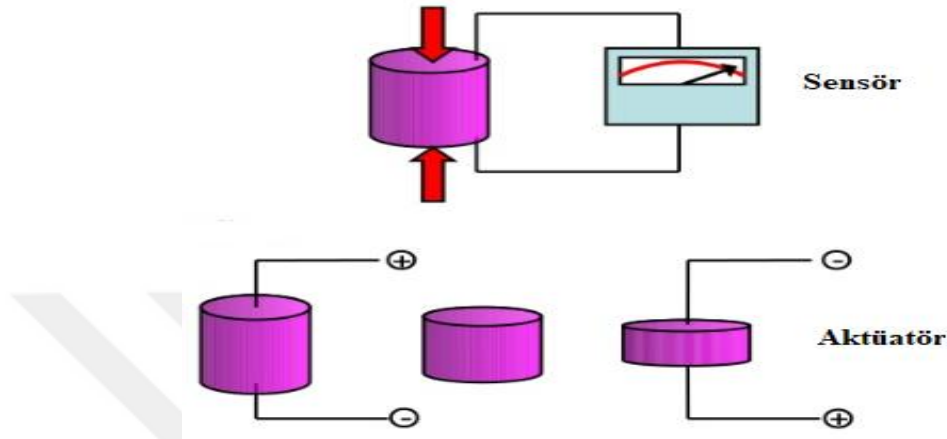
1.4.4.3.6. Piezoelektrik Malzemelerin Kullanıldığı Yerler

Yapılan çalışmalarla birlikte geliştirilen piezoelektrik teknolojisi, piezoelektrik malzemelerin kullanımını yaygınlaştırmaktadır. Az enerji tüketimi ve hızlı cevap verme özellikleri, piezoelektrik malzemelerin tercih edilmelerine neden olmuştur. Otomotivlerdeki hava yastığı sensöründen, bilgisayardaki disk sürücülere ve tıbbi alanlardaki ultrasonik görüntüleme sistemlerine kadar pek çok yerde kullanılan piezoelektrik malzemelerin kullanım alanları sensörler, aktüatörler, üreteçler ve transdüserler olarak dört başlık altında toplanabilir.

1.4.4.3.6.1. Sensör ve Aktüatör

Sensör, ısı, nem, ses, basınç, kuvvet, uzaklık, ivme ve pH gibi fiziksel ya da kimyasal büyüklükleri elektrik sinyallerine çeviren düzeneklerin genel adıdır. Piezoelektrik sensörler ise basınç ve ivmedeki değişiklikleri ölçmek ve elektriksel sinyale dönüştürmek için piezoelektrik etkiyi kullanan cihazlardır. Bu sensörler mekanik enerjiyi elektrik enerjisine (doğrudan piezoelektrik etki) dönüştürürler.

Piezoelektrik aktüatörler, elektrik enerjisini piezoelektrik etkiye dayanan mekanik bir yer değiştirmeye veya strese dönüştüren transdüserlerdir. Aktüatörler, ters piezoelektrik etki ile çalışırlar.



Şekil 1.14. Sensör ve aktüatör [102]

Piezoelektrik aktüatörlerin sağladığı hassas hareket kontrolü sayesinde sistemlerde kullanılan lensler, aynalar veya diğer ekipmanlar hassas bir şekilde ayarlanabilmektedir. Hidrolik valfleri kontrol etmede, hareket veya kuvvet gerektiren uygulamalarda, küçük hacimli pompa veya motor kontrollerinde kullanılabilir. Ayrıca piezoelektrik aktüatörler çok az ısı verdiğinden ve enerjik bir durumda çalışırken neredeyse hiç güç tüketmediğinden, otomotiv ve savunma uygulamalarından bilimsel enstrümantasyon ve ultrasonik makine kontrollerine kadar geniş bir endüstri yelpazesinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar.

1.4.4.3.6.2. Üreteç

Piezoelektrik üreteçler, mekanik enerjiyi elektriğe dönüştürerek gerilim üretirler. Birçoğumuzun günlük olarak kullandığı basmalı çakmaklar ve gazlı barbekü ızgaraları piezo üreteçlerin iki yaygın uygulamasıdır. Bu uygulamalarda bir düğmeye basılması, tek katmanlı piezoelektrik seramiklere mekanik bir kuvvet uygulanmasına neden olur. Seramik eleman, piezoelektrik etkinin bir sonucu olarak yakıt kaynağının tutuşmasına neden olan bir voltaj üretir. Piezoelektrik ateşleme sistemleri küçük, basit, uzun ömürlü ve az bakım gerektirir [103].

Çok katmanlı bir piezo üretici tarafından üretilen elektrik enerjisi, tek katmanlı bir piezo üretici tarafından üretilene göre çok daha düşük voltajdadır. Fakat çok katmanlı bir üreteç tarafından üretilen akım, tek katmanlı bir piezoelektrik üreteç tarafından üretilen akımdan daha yüksektir. Elektromanyetik girişim oluşturmayan çok katmanlı piezo üreteçleri, elektronik devreler için katı hal pilleri olarak kullanılmaktadır. Ayrıca cephaneler ve otomobillerdeki lastik basıncını izleyen sensörler gibi kablosuz sensörler için enerji kaynağı olarak piezoelektrik üreteçler tercih edilmektedir.

1.4.4.3.6.3. Transdüser

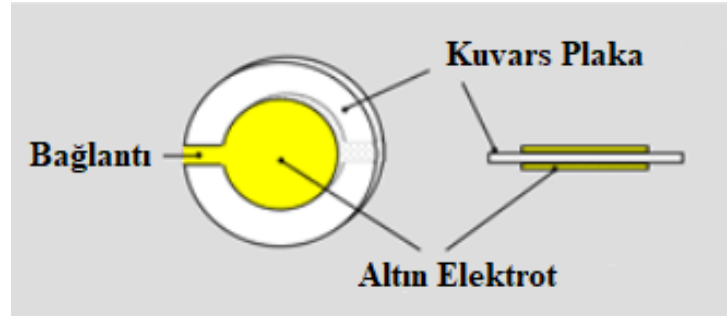
Piezoelektrik transdüserler, elektrik enerjisini mekanik enerjiye ya da mekanik enerjiyi elektrik enerjisine dönüştür. Piezoelektrik transdüserler, yüksek frekans tepkisi, hassasiyeti, sağlamlığı ve küçük boyutlarından ötürü avantajlıdır. Bu özelliklerinden dolayı ivmeölçerlerde, mesafe ölçerlerde, titreşim alıcılarında, sismografta, otomotiv motor bloklarındaki patlamaları tespit etmede, tıbbi tedavilerde ve endüstriyel işleme ekipmanlarında kullanılmaktadır.

1.5. Kuvars Kristal Mikrodenge

Piezoelektrik temelli tespit platformlarından birisi de ticari olarak mevcut olan ve klinik uygulamalarda da kullanılan Kuvars Kristal Mikrodenge (Quartz Crystal Microbalance (QCM)) sistemidir. QCM, sensör yüzeyine bağlanan analitlerin neden olduğu rezonans frekansındaki değişimlerin (Δf) ölçülmesi prensibine göre çalışan cihazlardır.

Nanogram seviyesindeki kimyasal bileşikler tespit edebilen bir kütle ölçümü yöntemi olan QCM, piezoelektrik özelliktedir. QCM sensörü, 5-30 MHz aralığındaki temel rezonans frekansına sahip olarak üretilmiş kuvars plaka olan bir çekirdek ve bu kuvars plakayı saran iki adet elektrottan oluşmaktadır. Bu elektrotlar genellikle hava içerisinde okside olmayan altın metalinden yapılmaktadır. Kuvars materyalin piezoelektrik özelliklerinden dolayı bu elektrotlar arasındaki alternatif bir voltaj, kristalin mekanik salınımlarına yol açar. Bu salınımlar çok kararlıdır. Bir madde kuvars kristali yüzeyine yerleştirilirse, titreşim frekansı kütle miktarına orantılı olarak değişir [104]. Kuvars kristali, hibridizasyon işleminden kaynaklanan kütle değişikliklerini frekans değişimlerine dönüştüren bir sinyal dönüştürücü olarak kullanılmaktadır. Farklı

kaplamalar ile QCM'in seçiciliğinin kontrol edilebilmesi bu sensörleri çok yönlü hale getirmektedir.



Şekil 1.15. QCM sensör [105]

QCM, gerçek zamanlı izlemeye izin veren, düşük maliyetli, hacim açısından kompakt, kolay taşınabilir, hassasiyeti yüksek ve nanogram seviyesindeki düşük algılama limiti açısından oldukça avantajlıdır.

1.5.1. Kuvars

Kuvars, saf silisyum dioksit kristallerine verilen addır. Kimyasal formülü SiO_2 olup, % 46,5 silisyum ve % 53,3 oksijen içermektedir. Hem kimyasal hem de mekanik ayrışmaya karşı dayanıklı olan kuvars taşının içerisinde katı eriyik halde lityum, sodyum, magnezyum ve alüminyum elementleri bulunmaktadır. Kuvars genellikle saydam ve renksiz olsa da farklı maddelerle olan birleşimi sonucu mor, siyah gibi farklı renklerde de karşımıza çıkmaktadır [106].

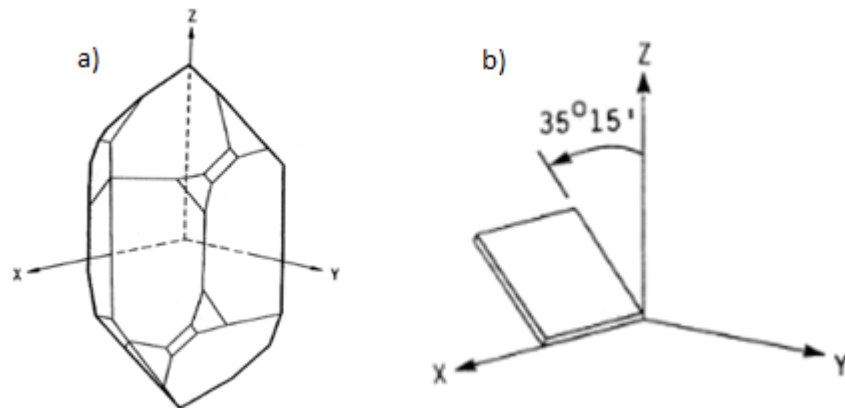
Kuvars doğal olarak oluşan ilk piezoelektrik malzemedir. Düz ve tersinir piezoelektrik etki özelliklerini gösteren kuvars, üzerine uygulanan basınç sonucundan yüzeyinde elektrik gerilimleri oluşturmaktadır.



Şekil 1.16. Kuvars kristali [107]

Kuvars, kolay bulunabilmesi ve kendisine özgü özellikleriyle endüstri ve sanayide geniş bir kullanım alanına sahiptir. Endüstride en çok kullanıldığı yerler, cam-seramik hammaddesi olarak, elektronik ve optik endüstrisi olarak sıralanabilir. Optik ve elektronik sanayinde kullanılan kuvars kristallerinin % 99.99 oranında SiO_2 içermesi istenmektedir.

QCM cihazında, akustik dalganın kristal yüzeyine dik bir yönde ilerleyebilmesi için kuvars kristal plakanın kristal eksenlerine göre belirli bir yönde kesilmesi gerekir. QCM uygulamalarında genel olarak AT kesim kuvars kristali tercih edilmektedir.



Şekil 1.17. a) Kuvars kristalinin eksenlerinin belirlenmesi, b) AT kesim kuvars kristali [108]

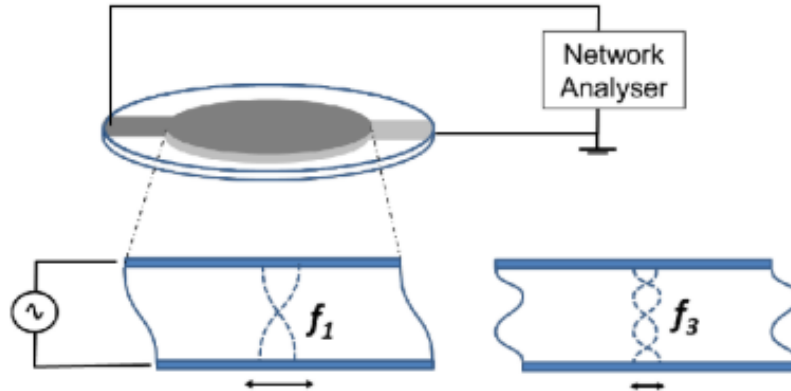
1.5.2. QCM'in Çalışma Prensibi

Piezoelektrik etki, kristal simetriye sahip olmayan kristallerde oluşmaktadır. Kristale basınç uygulandığında kristal kafes, kristalin moleküllerinde bir dipol momenti oluşacak şekilde deforme olur. Yani piezoelektrik özellikteki kristal mekanik bir kuvvetle sıkıştırıldığında veya gerildiğinde, yüzeyi elektrik yükü üretmektedir. Mekanik kuvvet geri alındığında ise kristal denge durumuna döner ve elektrik yükü yok olur. Bu duruma piezoelektrik etki denilmektedir. Bunun tersi de mümkündür. Kristale elektriksel yük uygulandığında kristalde mekanik değişme görülmektedir.

Birçok kristal türü piezoelektrik etki gösterir fakat kuvarsın elektriksel, mekanik ve kimyasal özellikleri onu analitik uygulamalarda en yaygın kullanılan kristal türü haline getirmektedir. Kuvars kristal yüzeyi, kimyasal bir malzeme ile kaplanarak işlevsel hale getirilir ve kimyasal sensör olarak kullanılabilir. Kuvars çekirdeğe sahip olan ve piezoelektrik özellik gösteren Kuvars Kristal Mikrodenge (QCM) sensörleri kimyasal sensör olarak kullanılmaktadır.

QCM sensörleri, kuvars çekirdeğinin her iki tarafında elektrotlar bulunduran ince kuvars disklerdir. Kuvars kristali, piezoelektrik madde olduğundan iki elektrot arasına bir voltaj uygulandığında kristalde bir yer değiştirme meydana gelir. Voltaj uygulaması devam ettikçe kristalde rezonans salınımı uyarılabilir. Bu durum, Şekil 1.18. 'de gösterildiği gibi üst elektrot alt elektroda zıt yönde hareket ederek kuvars kristalinde bir dalga oluşturulabileceği anlamına gelmektedir. Sensörün yüzeyindeki kütle artışı devam ettikçe dalga bu katmana yayılır ve rezonans frekansı değişir [109]. Kısacası QCM, sensör yüzeyine bağlanan analitlerin neden olduğu rezonans frekansındaki değişimlerin (Δf) ölçülmesi prensibine göre çalışan cihazlardır.

Rezonans, tek sayılı overtonlara veya harmoniklere karşılık gelen daha yüksek frekanslarda da uyarılabilir. 5 MHz'lik bir kristalin ayrıca 15 MHz, 25 MHz, 35 MHz'de tonları vardır. Kuvarstaki akustik dalganın hızı sabit olduğundan, yüzeysel yer değiştirme her ardışık ton için azalır. Bu farklı harmonikler, sensör yüzeyindeki ince tabaka hakkında farklı bilgiler edinmemizi sağlamaktadır.



Şekil 1.18. Temel ve 3. harmonik frekansında rezonans salınım yapan bir kuvars kristal sensörünün şematik diyagramı [109]

QCM kristaline, yüksek akımlı ve alternatif elektrik alan uygulandığında rezonans frekansında salınım yapmaktadır. QCM sistemindeki kütle değişimini algılama hassasiyeti, kristaldeki toplam kütle üzerinde meydana gelen osilasyon frekansına bağlı olarak ortaya çıkar. Sistemde elektronik bir devreye bağlı olan kuvars rezonatörü, bir numune çözeltisi ile etkileştiğinde rezonans frekansında kütle değişiminden kaynaklanan bir değişim meydana gelir. Kütle değişiminin neden olduğu frekans değişikliği Sauerbrey tarafından açıklanmıştır. Sauerbrey, QCM teknolojisinin potansiyel kullanılabilirliğini tanıyan ve QCM elektrotlarının yüzeyindeki kütle değişikliklerine karşı son derece hassas olduğunu gösteren ilk kişidir. Sauerbrey, yaptığı çalışmalar sonucunda QCM elektrot yüzeyindeki birim alan başına kütle değişimini, kristalin salınım frekansında gözlenen değişikliklerle ilişkilendirmiş ve bu doğrultuda Sauerbrey denklemini oluşturmuştur [110].

Sauerbrey denklemi:

$$\Delta f = \frac{-2\Delta m f_0^2}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}} = \frac{-2f_0^2}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}} \Delta m$$

Burada,

f_0 = kristalin temel rezonant frekansı,

A = elektrotlar arasında kalan aktif kristalin alanı,

ρ_q = kuvars yoğunluğu,

μ_q = AT-kesim kristal için kuvarsın kayma genliği,

Δf = Frekans değişimi,

Δm = Kütle değişimidir.

Sauerbrey denklemi, sensör yüzeyine bağlanan malzemenin kütlesi kuvars kristalinin kütlesinden çok daha küçük olduğunda ve malzeme rijit, elastik ve sensör yüzeyi üzerinde eşit olarak dağıldığında geçerlidir.

1.5.3. QCM Uygulamaları ve Piezoelektrik Sensörler ile Yapılan Çalışmalar

QCM sistemlerin, tanıyıcı bölümünün ucuz ve küçük olması, kullanım kolaylığı, çok küçük konsantrasyonlarda örnek ile çalışmaya izin vermesi, spesifikliğı, yerinde ölçüm olanağı sağlaması, tekrarlanabilirliğı ve yüksek hassasiyeti gibi avantajlarından dolayı farklı sektörlerde kullanılabilir. Özellikle son zamanlarda QCM sistemlerin kullanımını oldukça artmıştır.

Tablo 1.5. Kuvars kristal mikroterazinin kullanım alanları

Kullanım Alanı	Kullanım Şekli
Biyoteknoloji	<ul style="list-style-type: none"> • Yüzeylerin biyo-uyumluluğunda • DNA ve RNA'nın tamamlayıcı dizilerle etkileşimi • Bakteri, virüs, memeli hücresi tespitinde • İmmobilize edilmiş reseptörler tarafından protein ligandları tanımda
İşlevsel Hale Getirilmiş Yüzeyler	<ul style="list-style-type: none"> • Lipit membranlar • Polimer kaplamalar • İnce film oluşumu • Reaktif yüzeyler • Gaz sensörler
İlaç Araştırmaları	<ul style="list-style-type: none"> • İlacın dağıtımında

	<ul style="list-style-type: none"> • Polimer kaplamaların eritilmesinde • İlaçların moleküler etkileşimde
Elektrot Yüzeyleri	<ul style="list-style-type: none"> • Yüzeyler arası işlemlerin elektrokimyası

Piezoelektrik kristallerin, ilk analitik uygulaması 1964 yılında King tarafından rapor edilmiştir [111]. Yapılan çalışmada, buharların ve gazların bileşimini tespit etmek ve ölçmek için kaplanmış piezoelektrik kuvars kristallerinin kullanımı hakkında bilgi sunulmaktadır. Bu çalışmadan sonra hidrokarbonları tespit edebilen bir piezoelektrik dedektör geliştirilerek ticarileştirilmiş, organik buharlar, çevre kirleticileri ve kromatografi dedektörleri için birçok gaz fazı dedektörünün geliştirilmesini sağlamıştır.

İlk piezoelektrik immünosensör, Shons ve arkadaşları tarafından 1972 yılında geliştirilmiştir [112]. Çözeltideki antikor aktivitesinin belirlenmesi için tasarladıkları sensörün, yüzeyinde gerçekleştirdikleri işlemleri frekans kayması ile takip etmişler ve kristalin frekans kayması ile ölçülen antikor katmanının kalınlığının, çözeltideki spesifik antikorun konsantrasyonu ile orantılı olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Geliştirdikleri bu teknik, antikor aktivitesinin analizinin hızlı bir şekilde gerçekleştirilmesini sağlamıştır.

Fawcett ve arkadaşları, tek sarmallı DNA'yı kuvars kristalleri üzerine immobilize etmişler ve hibridizasyon işleminden sonra kristal yüzeyindeki kütle değişimini takip etmişlerdir. DNA tespiti için ilk piezoelektrik biyosensör kullanımı bu çalışma ile gerçekleştirilmiştir [113]. Yapılan bu çalışmadan yaklaşık 10 yıl sonra kuvars kristali mikroterazi (QCM) sensör kullanılarak DNA ve RNA tespiti üzerine yapılan araştırmalar artmıştır.

1996 yılında Ito ve arkadaşları, DNA hibridizasyon reaksiyonlarında QCM'nin kullanılmasını ve hareketsizleştirilmiş prob miktarı ile hibridize hedef arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir [114]. Hem hareketsizleştirilmiş prob miktarının hem de hibridize hedef miktarının pH durumuna bağlı olduğunu savunan araştırmacılar, QCM üzerindeki problemlerin yoğunluğunun da etkili hibridizasyon için önemli olduğunu ifade etmişlerdir.

Xiao-Li Su ve arkadaşı, *Salmonella Typhimurium* patojeninin tespit edilmesi için rezonans frekansı ve hareket direncinin eşzamanlı ölçümlerini alan kuvars kristal

mikroterazi (QCM) immünosensörü geliştirmişlerdir [115]. Çalışma sonucunda, QCM'nin rezonans frekansı ve hareket direncindeki (ΔF ve ΔR) değişikliklerin *Salmonella Typhimurium* patojeninin tespiti için önemli olduğu, statik kapasitans, hareket kapasitansı ve hareket endüktansındaki değişikliklerin ise *Salmonella Typhimurium* patojeninin tespiti için önemsiz olduğu görülmüştür.

Vivian CH Wu ve arkadaşları, *E. coli* O157: H7 patojeninin gerçek zamanlı tespiti için bir DNA piezoelektrik biyosensörü tasarlamışlardır. Geliştirdikleri QCM sistemini, PCR ile çoğaltılmış gerçek örneklerle ait DNA'ları tespit etmek için kullanan araştırmacılar, tasarladıkları DNA piezoelektrik sensörünün, *E. coli* O157: H7 patojeninin tespitinin yanı sıra gıda, su ve klinik numunelerdeki diğer mikroorganizmaların tespit edilmesinde de kullanılabileceği savunmaktadırlar [116].

Başka bir çalışmada araştırmacılar, 11-merkaptoundekanoik asit (MUA) ve 1-dekanetiol (DCT) modifiye edilen altın nanopartiküllerin (AuNP) yüzeylerindeki değişimleri takip etmek için QCM ile bir model geliştirmişler [117] ve bu geliştirdikleri QCM sistemini, plazma-optik emisyon spektrometrisi ve mikro bilgisayarlı tomografi ile karşılaştırmışlardır.

Yanbin Li ve arkadaşı, *E. coli* O157: H7'nin hızlı ve hassas tespiti üzerine yaptığı çalışma sonucunda MHDA-SAM temelli piezoelektrik bir immünosensör tasarlamıştır. QCM sensör ile gerçekleştirdikleri bu çalışmada, MHDA, EDC / NHS ve antikor için elde ettikleri yüzey kaplamalarını sırasıyla 0,240, 0,095, ve 0,314 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak açıklayan araştırmacılar, bu immünosensörün, 30 ila 50 dakika içinde, 10^3 - 10^8 CFU / ml aralığında hedef bakterileri tespit edebildiğini ileri sürmüşlerdir [118].

Xiaofan ve arkadaşları yaptığı çalışmada, MHDA, EDC ve NHS ile sensör yüzeyini modifiye ederek *E. coli* bakterisinin tespiti için QCM aptasensörü geliştirmeye çalışmışlardır [76]. *E. coli* bakterisinin farklı konsantrasyonlarında da yürütülen çalışma da tasarlanan sistemin tespit süresi 50 dakika, tespit limiti ise 1.46×10^3 CFU/ml olarak açıklanmıştır.

Soylu ve arkadaşları, genetik tespit için yüzey kaplamasının etkisini incelemek için QCM sensör kullanmışlardır. Araştırmacılar, yüzey modifikasyonu uyguladıkları kristalin tDNA tespitindeki başarısı ile yüzey modifikasyonu uygulamadıkları kristalin tDNA

tespitindeki başarısını karşılaştırarak yüzey modifikasyonu ile yapılan genetik tespitin daha başarılı olduğunu savunmuşlardır [126].

1.6. Çalışmanın Özgün Değeri

Yapılan tez çalışma ile;

- *Escherichia coli* bakterisinin, piezoelektrik bir sensör olan QCM ile tükürük numunesi içerisinde genetik tespiti amaçlanmıştır.
- DNA izolasyonuna, pürifikasyonuna ve amplifikasyonuna ihtiyaç duymadan tespit işlemi gerçekleştirebilecek şekilde sistem kurgulanmıştır.
- Erken teşhiste önemli bir vücut sıvısı olan tükürük numunesi ile hasta ve sağlık personeline bulaşabilecek enfeksiyon riskinin azaltılması, hasta konforunun da göreceli olarak artırılması planlanmıştır.
- Salgınlara ve ölümlere sebep olan *E. coli* bakterisinin tespit süresi kısaltılıp erken tanı ile gerekli tedavi işlemlerine ivedilikle başlanabilmesi hedeflenmiştir.
- Antibiyotik direnci gün geçtikçe artan *E. coli* bakterisinin, hızlı bir şekilde tespit edilmesi antibiyotik dirençlerinin saptanması, doğru antibiyotik tedavisinin önünü açarak, enfeksiyondan kaynaklanan morbidite ve mortalite oranlarını düşürecektir.
- Tasarlanan sistem ile *E. coli* bakterisinin tespitinde kullanılan hali hazırdaki ticari yöntemler kıyaslandığında, o yöntemlerin maliyeti, zaman alıcı olması, deneyimli personele ihtiyaç duyulması, sigorta kuruluşları veya hastaların üzerine yüklediği mali yük hususlarında tez çalışmasında önerilen sistem oldukça avantaj sağlayacaktır.
- Tasarlanan tespit sisteminin ticari klinik diyagnostik tespit araçlarının hassasiyet seviyesine ulaşması, yerinde, hızlı ve güvenilir olması ile gerek *E. coli* gerekse diğer mikrobiyolojik bakterilerin patojenik ve toksijenik türlerinin incelenmesinin önü açılacaktır.

2. BÖLÜM

YÖNTEM ve MATERYAL

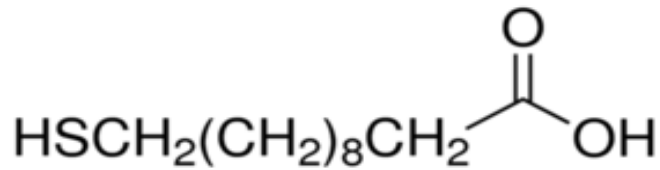
2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasallar

- 1) Etil Alkol (Merck: 1117272500)
- 2) Saf Su (Erciyes Üniversitesi Çevre Mühendisliği laboratuvarından temin edildi.)
- 3) Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Merck: 8220500100)
- 4) Hidrojen Peroksit (Merck(% 35): 10860001000)
- 5) Potasyum Hidroksit (Merck: 1050331000)
- 6) Sülfürik Asit (Sigma Aldrich: 30743)
- 7) Büyükbaş Serum Albümini (Bovine Serum Albumin (BSA)) (Sigma Aldrich:A2153)
- 8) Fosfat Tamponlu Serum (Phosphate Buffered Saline (PBS)) (Chembio)

PBS, insan tükürüğüne benzer ortam oluşturabilmek için kullanılmıştır. İçerisine ek olarak kalsiyum ve magnezyum ilave edilmiş ve pH'ı 7,2 olacak şekilde temin edilmiştir.

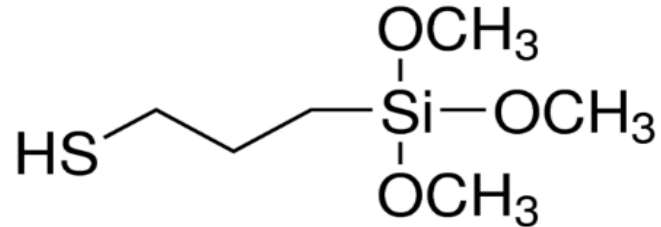
- 9) 11-Mercaptoundecanoic acid (MUA) (Sigma Aldrich: 450561-5G)



Şekil 2.1. MUA yapısı

Kapalı Yapısı = $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{H}$

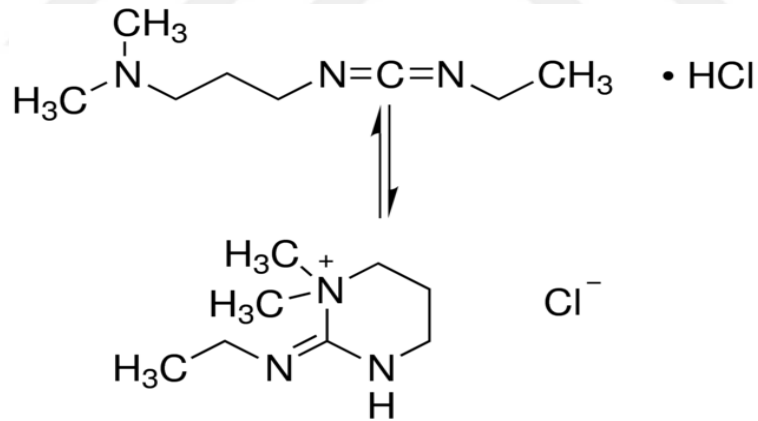
10) (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPS) (Sigma Aldrich: 175617)



Şekil 2.2. MPS yapısı

Kapalı Yapısı = $\text{HS}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$

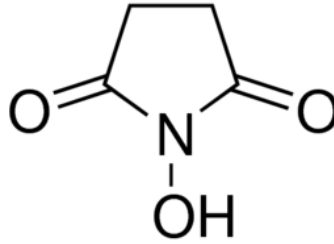
11) *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*'ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) (Sigma Aldrich: 03450-5G)



Şekil 2.3. EDC yapısı

Kapalı Yapısı = $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$

12) *N*-Hydroxysuccinimide (NHS) (Sigma Aldrich: 130672-5G)



Şekil 2.4. NHS yapısı

Kapalı Yapısı = $C_4H_5NO_3$

2.1.2. Sentetik DNA'lar

Sentetik DNA'lar Sentegen firmasından temin edilmiştir.

Tablo 2.1. Sentetik DNA'lara ait özellikler

	pDNA	tDNA
Baz Sayısı	20	20
Baz Dizilimi	5'-ATTGGCGACGTTTCATGGTTG-3'	5'-CAACCATGAACGTCGCCAAT-3'
Molekül Ağırlığı	6637.1	6055
Modifikasyon	Amin	Yok
Saklama Koşulları	+4° C'de saf su içerisinde	+4° C'de saf su içerisinde
Erime Sıcaklığı	51.8° C	51.8° C

2.1.3. Cihaz ve Ekipmanlar

Yapılan deneyler ve ölçümler esnasında kullanılan cihazlar aşağıdadır.

- 1) Kuartz Kristal Mikrodenge (QCM) cihazı – Referans Kimya – eQCM 10M



Şekil 2.5. QCM cihazı

eQCM cihazı 3 kısımdan oluşmaktadır. Bunlar flow (akış) modülü, elektronik ünite, hücre platformu dur. Cihazda sensör olarak 5 MHz, 14 mm çaplı, parlatılmış, AT-kesimli, altın elektrotlar kullanılmaktadır.

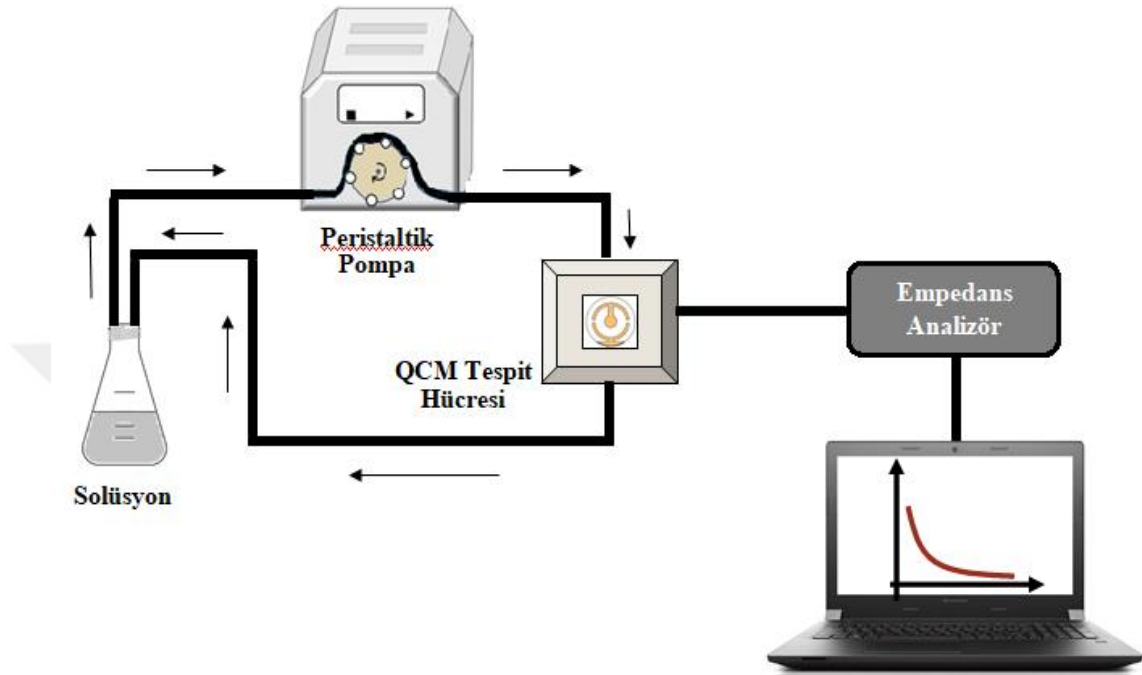
Cihazın sıvıdaki maksimum kütle hassasiyeti, $0,1 \text{ ng/cm}^2$ (5 pg/mm^2) olarak katalogunda yer almaktadır.

- 2) Karıştırıcı (Vorteks) - Stuart
- 3) Hassas Tartı – Radwag
- 4) pH-metre – Milwaukee
- 5) Peristaltik Pompa – Longer Pump
- 6) Isıtıcı – IKA CMAGHS7
- 7) Altın Kaplamalı Kristal Sensör - Qsense

2.1.4. Kullanılan Deney Düzenegi

Yapılan deneylerde hazırlanan solüsyonlar peristaltik pompa ile hücreye aktarılmış, hücreden çıkan solüsyonlar tekrar değerlendirilmek üzere solüsyonun verildiği kaba aktarılmıştır. Deneylerin çoğu aşaması (MUA, MPS, EDC/NHS, pDNA, BSA, tDNA aşamaları) bu şekilde kapalı döngü içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bazı deney aşamaları ise (sensör yüzeyinin temizlik aşamaları) açık döngü şeklinde gerçekleştirilmiştir. Peristaltik pompa aracılığıyla hücreye gönderilen solüsyonlar etkileşim oluşturmaması

için solüsyonun olmadığı diğer bir kaba aktarılarak bir daha kullanılmamıştır. Deneyleerde kullanılan düzenek Şekil 2.6.'de verilmiştir.



Şekil 2.6. Deney düzeneği

2.2. Metot

Bu tez çalışmasında, *E. coli* bakterisine ait tDNA'ları tespit edebilmek için iki farklı metot denenmiştir.

Tablo 2.2. Yüzey modifikasyon metotları

Metot	Tiyol Grup	Bağlayıcı	Reseptör	Analit
Metot 1	MUA	EDC/NHS	pDNA	tDNA
Metot 2	MPS	EDC/NHS	pDNA	tDNA

Metot 1'de sensör yüzeyi 11-Mercaptoundecanoic acid (MUA) kimyasal kaplama ajanına maruz bırakılmış ve sensör yüzeyinde -COOH fonksiyonel grupları (karboksilik asit ile işlevselleştirilmiş SAM'lar) oluşturulmuştur. Tiyol ile kristalin altın yüzeyinin

bağlantısı sağlandıktan sonra ara bağlama ajanı olarak EDC/NHS (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimidehydrochloride/*N*-hydroxysuccinimide) kullanılmış ve sensör yüzeyi, amin reaktif pDNA immobilizasyonu için hazır hale getirilmiştir.

Metot 2’de ise sensör yüzeyi ilk olarak 3-Mercaptopropyltrimethoxysilane (MPS) kimyasal kaplama ajanına maruz bırakılmıştır. MPS kaplama işleminden sonra kaplama üzerinde kalan serbest nükleofilik hidroksil gruplarını, amin reaktif hale getirebilmek için EDC/NHS ara bağlanma ajanı kullanılmıştır. EDC’nin elektrofilik karbodiimidleri kaplama üzerinde kalan serbest nükleofilik hidroksil grupları ile reaksiyona girer [128]. Böylece sensör yüzeyi amin reaktif olarak işlevselleştirilmiş ve amin aktif pDNA immobilizasyonu için hazır hale getirilmiştir.

Bu aşamaları takiben her iki metot için deney prosedürü aynı şekilde devam ettirilmiştir. Target DNA’yı (tDNA) tespit edebilmek için sensör yüzeyine immobilize edilen prob DNA (pDNA) aşamasından sonra spesifik olmayan bağlantıları önlemek için Büyükbaş Serum Albümini (BSA) solüsyonu uygulanmıştır. Son aşamada ise model tükürük içerisinde hazırlanan tDNA solüsyonu, altın yüzeye uygulanarak tespit işlemi tamamlanmıştır.

2.2.1. QCM Sensör Temizliği

Yüksek kaliteli tiyol altın temelli kendiliğinden düzenlenen tabakalar (SAM) elde edebilmek için altın yüzeyin iyi temizlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla, oksidatif ve indirgeyici ön temizleme işlemleri ile tekrarlanabilir altın yüzeylerin hazırlanması için bazı yöntemler önerilmektedir. Piranha çözeltisi, ultraviyole-ozon, oksijen plazması, elektrokimyasal oksidasyon gibi gelenekselleşmiş yöntemler ile okside edilen altın yüzey pozitif yük ile yüklenmektedir. Oksitlenmiş altın yüzeyler etanol içine daldırıldıktan sonra kimyasal olarak sıfır duruma (metalik altın) indirgenmektedir [119].

QCM tespit hücresi mekanik parçalara ayrılarak temizlendi. Ayrılan her bir parça etil alkol ve saf su ile yıkandı. QCM sensör temizliği için her kullanımdan önce piranha solüsyonu (% 33 Saf Su + % 33 Sülfürik Asit + % 33 Hidrojen Peroksit) hazırlandı. Belirtilen kimyasallar karışım oranında eklenerek 1 ml’lik piranha solüsyonu elde edildi. Daha sonra hazırlanan solüsyon behere alındı ve QCM sensör 5 dakika boyunca

solüsyona maruz bırakıldı. Organik temizliği yapılan QCM sensör, önce saf su daha sonra etil alkolden geçirilerek tespit işlemine hazır hale getirildi.

2.2.2. Yüzey Modifikasyonu

Çalışmadaki amacımız *E. coli* bakterisinin genetik tespitini sağlamaktır. Bunu gerçekleştirmek için QCM sensör yüzeyi genetik tespitine uygun olarak hazırlanmalıdır. Analiz edilecek maddeye spesifik bir kristal yüzeyi oluşturmak için QCM sensör yüzeyi çeşitli yüzey modifikasyon teknikleri kullanılarak kaplanmaktadır. QCM'e dayalı DNA hibridizasyon çalışmalarında kullanabileceğimiz 2 farklı yol mevcuttur:

Bunlardan yöntemlerden biri; altın yüzeye doğrudan tiyol grupları içeren probun tutturulmasıdır. Tiyol gruplarının altına olan duyarlılığı bilinmektedir. Tiyol ile aktif edilmiş pDNA'ları altın yüzeye tutturularak biyosensör oluşturabiliriz [120].

Diğer yol ise sensör yüzeyini bir kaplama ajanıyla kaplayarak aktive edilmiş DNA'ya uygun bir yüzey sağlamaktır [121]. Bu tabakanın oluşturulması için farklı kimyasal kaplama ajanları kullanılabilir.

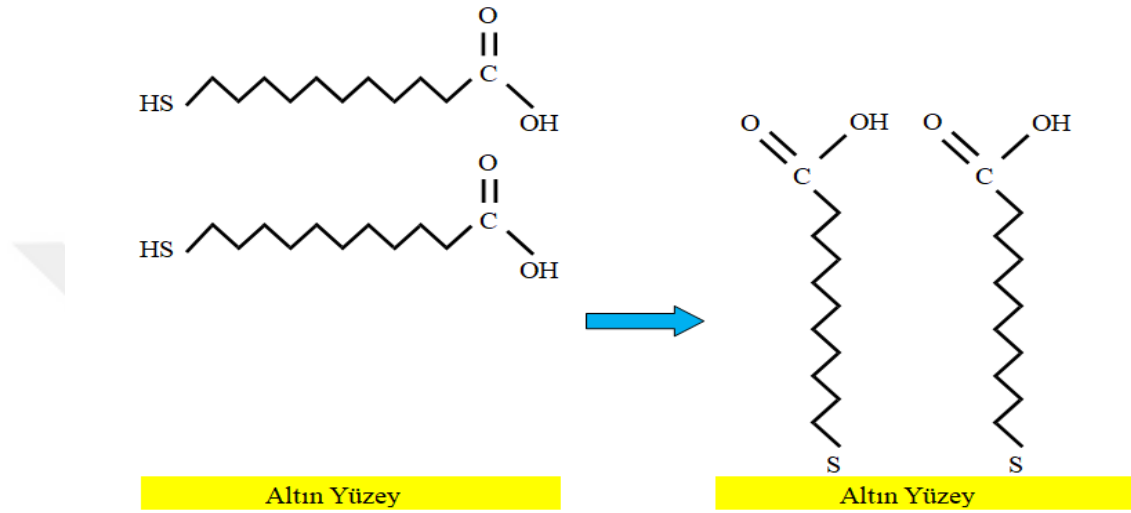
2.2.2.1. MUA ve MPS Kaplama

Spesifik olmayan etkileşimlerin en aza indirilmesi, DNA tespitinin kalitesi ve hassasiyeti için kristal yüzeyin kendiliğinden düzenlenen tabakalarla (SAM) düzgün bir şekilde işlevselleştirilmesi oldukça önemlidir. Altın yüzeylerde kararlı bağlar oluşturması ile bilinen tiyol (-SH) grupları yüzey modifikasyonlarında sıklıkla tercih edilmektedir.

Tiyol grupları altına olan duyarlılıkları ile bilinmektedir. Bir tiyol grubu, substrat ile güçlü bir kovalent bağ oluşturan kükürt uç grubu, Van der Waals etkileşimleri ile SAM'i stabilize eden hidrokarbon zinciri ve farklı işlevlere sahip olabilen (-COOH, -OH, -NH₂) son gruptan oluşmaktadır [122]. Bu tez çalışmasında sensör yüzeyinin modifikasyonu için 11-Merkaptoundekanoik asit (MUA) ile 3-Mercaptopropyl-trimethoxysilane (MPS) kimyasal kaplama ajanları kullanılmıştır.

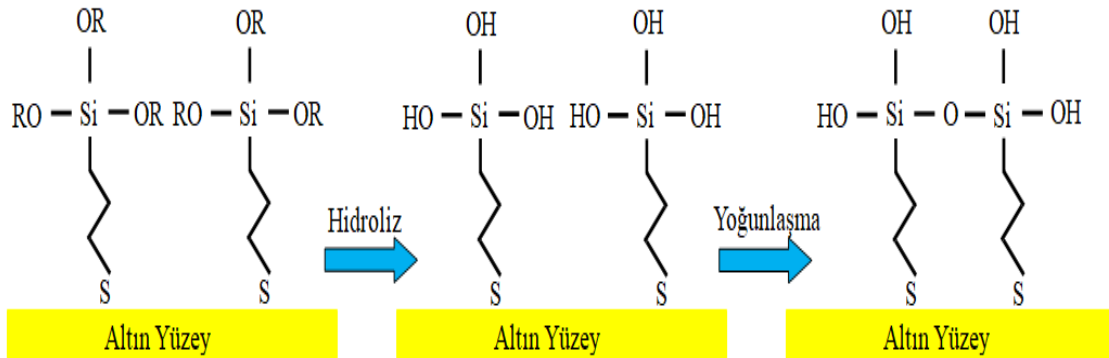
MUA kimyasal kaplama ajanının içerdiği tiyol grupları (-SH) altın elektrot ile etkileşime girerek elektrot yüzeyinde karboksilik asit (-COOH) ile işlevselleştirilmiş

SAM'lar oluşturulmuştur. Karboksilik asit ile işlevselleştirilmiş kendiliğinden düzenlenen tabakaların oluşumu, Şekil 2.7.'de verildiği gibi ilk olarak S-H bağının kırılması daha sonra ise Au (altın)-S bağının oluşması şeklinde iki adımda gerçekleşmektedir [119].



Şekil 2.7. MUA kaplamanın yüzey ile etkileşimi (Metot 1)

İki fonksiyonel gruba sahip MPS kimyasal kaplama ajanının, altın yüzeye kaplanması hidroliz ve yoğunlaşma olmak üzere iki basamakta gerçekleşmektedir. İlk aşama olan hidroliz reaksiyonu, silan grubunun bir silanol ile yer değiştirmesine, ikinci aşama olan yoğunlaşma reaksiyonu ise iki silanolün bir Si-O-Si bağı oluşturmasına dayanmaktadır [127]. pH'a oldukça duyarlı olan MPS, düşük pH'ta hidroliz reaksiyonunu, yüksek pH'ta ise yoğunlaşma reaksiyonunu gerçekleştirmektedir. Bu iki reaksiyonun başarısı, MPS'in konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir.



Şekil 2.8. MPS kaplamanın yüzey ile etkileşimi (Metot 2)

2.2.2.1.1. MUA ve MPS Solüsyonlarının Hazırlanması ve Uygulanması

MUA ve MPS kimyasal kaplama ajanlarının, muhafaza koşulları 2-8°C olduğu için deney anına kadar buzdolabında muhafaza edildi. Solüsyon hazırlamadan önce kimyasallar, dolaptan çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi için beklenildi.

Metot 1 için, 1 ml etil alkolün içerisine 0,7 mg MUA eklendi ve 1 dakika boyunca karıştırıcı (Vorteks-Stuart) ile karıştırılarak MUA solüsyonu hazırlandı. Metot 2 için, 1 ml etil alkolün içerisine 5 µl MPS eklendi ve 1 dakika boyunca karıştırılarak MPS solüsyonu (pH=4,5) hazır hale getirildi.

MUA ve MPS prosedürü uygulanmadan önce yüzeyleri piranha solüsyonu ile temizlenen sensörlerin ilk frekansları kaydedildi. Daha sonra sensör yüzeyleri, hazırlanan MUA ve MPS solüsyonları içerisinde bir gece boyunca, oda sıcaklığında bekletilerek yüzey modifikasyonları gerçekleştirildi. Sensör yüzeylerinin MUA ve MPS kaplama sonundaki frekansları kaydedildikten sonra sensör yüzeyleri ilk önce etil alkol ile daha sonra saf su ile yıkandı. Altın yüzeye bağlanmayan MUA ve MPS, yıkama aşamasında sensör yüzeylerinden temizlendi. Bu işlemlerin ardından, karboksilik asit ve hidroksil grupları ile işlevselleştirilmiş kristaller elde edildi.

Sensör yüzeylerinin MUA ve MPS kaplama işlemindeki, rezonans frekans değişimini belirlemek için solüsyon uygulanmadan önce alınan frekans değerleri ile solüsyon uygulandıktan sonra alınan frekans değerleri karşılaştırıldı. Bu iki değer arasındaki fark incelendiğinde rezonans frekansında, MUA ve MPS kaplamadan kaynaklanan azalma

gözlemlenmiştir. Bu durum yüzey modifikasyonunun ilk aşamalarının başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir.

İki metot için ayrı ayrı gerçekleştirilen deney prosedürleri üç tekrarlı olarak yapılmış ve teyit edilmiştir. Yüzey modifikasyon aşamasına ait MUA ve MPS kaplama verilerinin ortalamaları alındıktan sonra oluşturulan veri setlerine uygun eğri uydurma işlemi yapılmıştır. Eğri uydurma işlemi ile veri setlerindeki aykırı veriler ve gürültü verileri bastırılmıştır.

Metot 1 ve Metot 2 olarak yürütülen iki farklı deney prosedürü için MUA ve MPS kaplamadan sonra gerçekleştirilen tüm deney prosedürleri aynı şekilde yürütülmüştür.

2.2.2.2. EDC / NHS Kaplama

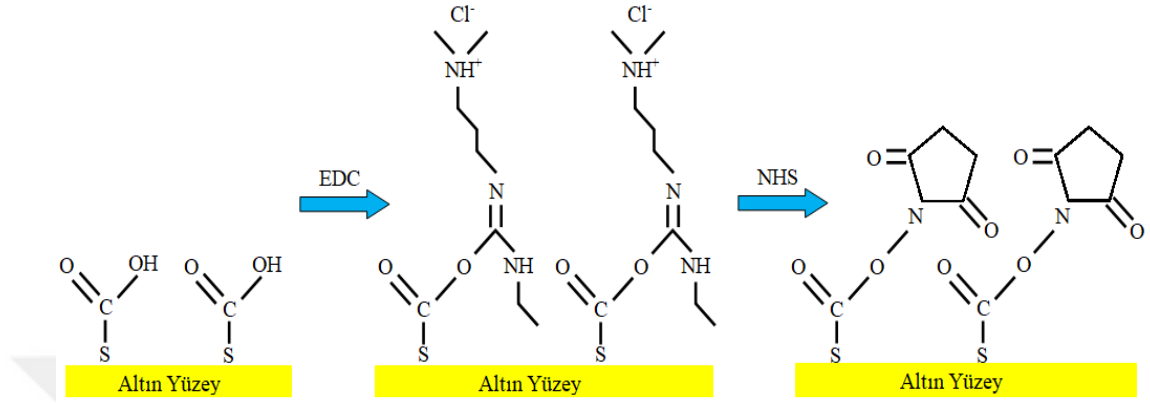
Amin gruplarıyla kovalent bağ oluşturmak için karboksil gruplarının aktivasyonunda en yaygın kullanılan ve kabul edilen yöntem, EDC/NHS kimyasıdır.

1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) Karbodiimid (EDC), kullanımı kolay, nispeten ucuz ve suda çözünen bir çapraz bağlayıcıdır. Karboksil ve hidroksil gruplarını, birincil aminlerle birleştirmek için çeşitli birleşme tekniklerinde kullanılmaktadır. EDC, ilk olarak birincil aminleri, bir aktif ester ara maddesi (*O*-asilisourea) oluşturarak karboksilik asit ve hidroksil grubu ile birleştirir. Daha sonra oluşan aktif ester ara maddesi doğrudan amin ile reaksiyona girerek karboksilik asit ve hidroksil grubu ile amid bağı oluşturur ve yan ürün olarak bir üre türevi ortaya çıkar [123].

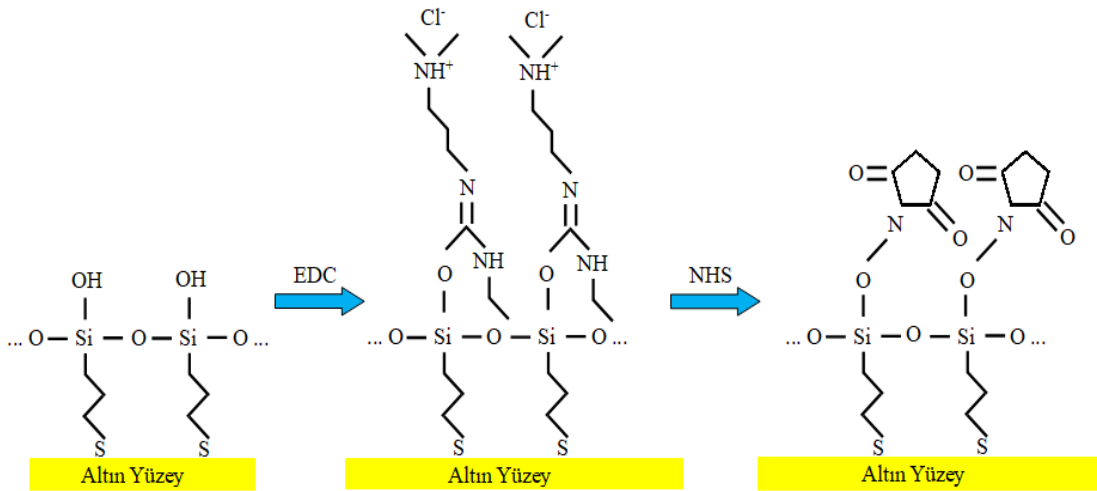
N-hidroksisüksinimid (NHS), verimliliği artırmak ve kararlı (aminle reaktif) ara ürünler oluşturmak için genellikle EDC birleştirme protokollerine dahil edilir. NHS, birincil aminler ile karboksilatların aktivasyonunu içeren EDC çapraz bağlama reaksiyonlarının kontrolünü sağlar.

EDC ve NHS çapraz bağlayıcıları ile gerçekleşen reaksiyonlar, hazırlanan solüsyonun pH değerine karşı duyarlıdır. Çapraz bağlama reaksiyonları, en verimli olarak pH 4 ila 6 arasında asidik koşullarda gerçekleşmektedir. Bu nedenle çözücü olarak genellikle morfolinetansülfonik asit (MES) tampon çözeltisi tercih edilmektedir. Fosfat tamponları ve nötr pH (7,2'ye kadar) koşulları, reaksiyon kimyasıyla, düşük verimlilikle de olsa

uyumludur [124]. Reaksiyon çözeltisindeki EDC miktarının artırılması, azaltılmış etkinliği telafi edebilmektedir.



Şekil 2.9. EDC/NHS'in MUA ile etkileşimi (Metot 1)



Şekil 2.10. EDC/NHS'in MPS ile etkileşimi (Metot 2)

2.2.2.2.1. EDC / NHS Solüsyonlarının Hazırlanması ve Uygulanması

EDC solüsyonu, 1 ml saf su içerisine 5 mg EDC eklenerek hazırlandı. pH 5,5 olarak hazırlanan solüsyon 1 dakika karıştırılarak, 30 dakika boyunca sensör yüzeyine kapalı döngü olacak şekilde peristaltik pompa aracılığıyla verildi. Peristaltik pompanın hızı 100 µl/sn olacak şekilde ayarlandı. 30 dakika boyunca QCM cihazından ölçüm alınarak EDC immobilizasyonuna ait frekans kayması kaydedildi. Daha sonra sensör yüzeyi saf su ile temizlendi.

NHS solüsyonu, 1 ml saf su içerisine 5 mg NHS ilave edilerek hazırlandı. pH 5,5 olarak hazırlanan solüsyon 1 dakika karıştırıldıktan sonra, 30 dakika boyunca MUA ve EDC kaplı sensör yüzeyine peristaltik pompa aracılığıyla verildi. Peristaltik pompanın hızı 100 µl/sn olacak şekilde ayarlandı. 30 dakika boyunca QCM cihazından ölçüm alınarak NHS immobilizasyonuna ait frekans kayması kaydedildi ve sensör yüzeyi ilk olarak saf su ile temizlendi. Daha sonra peristaltik pompa hızı 100 µl/sn'ye ayarlanarak sensör yüzeyinden PBS çözeltisi geçirildi. Bu yapılan işlem ile sensör yüzeyi bir sonraki deney aşaması için hazır hale getirildi.

Yüzey modifikasyon için MUA ve MPS kaplamadan sonra EDC/NHS çapraz bağlayıcıları kullanılmış ve bu bağlayıcılar ile sensör yüzeyine prob DNA bağlanabilmesi için uygun ortam oluşturulmuştur. Toplam 60 dakika süren EDC / NHS aşamasında belirgin bir şekilde frekans kayması gözlemlenmiştir. Frekans kayması bize MUA ve MPS kaplamalarının gerçekleştiğini göstermektedir. Çünkü immobilizasyonunun gerçekleşmesi için EDC/NHS'in yüzeyde bağlanabileceği kimyasal ajan olması gerekmektedir. Kısacası kullanılan çapraz bağlayıcılar hem MUA ve MPS kaplamasının gerçekleşip gerçekleşmediğinin teyit edilmesini sağlamış, hem de prob DNA'nın immobilizasyonu için istenilen bağlantıları gerçekleştirmiştir.

EDC/NHS deney prosedürü üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Kaydedilen frekans kaymalarının ortalamaları alınmış ve oluşturulan veri setine eğri uydurma işlemi yapılmıştır. Eğri uydurma işlemi için 7. dereceden polinom kullanılmıştır. Eğri uydurma işlemi, verilen noktalardan minimum hata ile geçebilecek eğrinin uydurulması işlemidir. Bu işlemler MATLAB programında yapılmıştır. Eğri uydurma ile veri setinde bulunan aykırı veriler ve gürültü verileri bastırılmıştır.

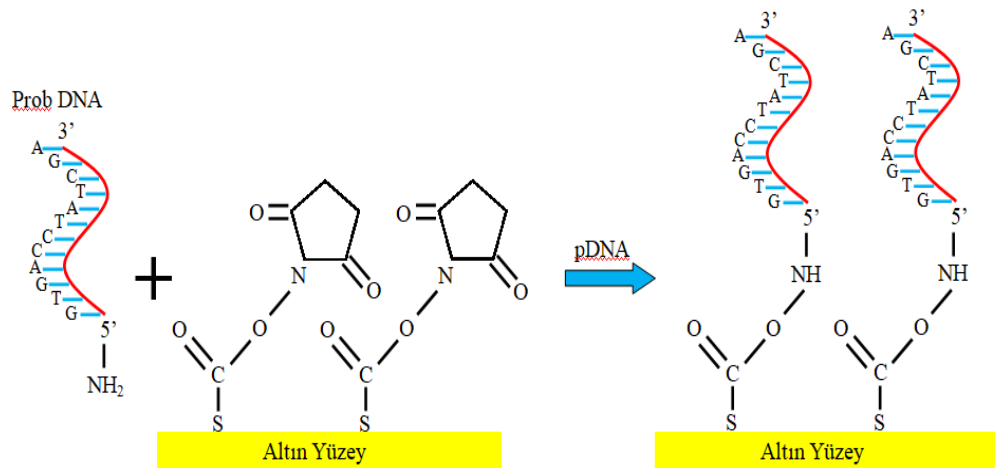
2.2.2.3. pDNA İmmobilizasyonu

Antikor gibi peptitler ve proteinlerin çapraz bağlanması veya etiketlemesi için en basit ve en yaygın yöntem, birincil aminler ($-NH_2$) ile reaksiyona giren kimyasal grupların kullanılmasıdır. Birincil aminler ile kimyasal bağlar oluşturacak çok sayıda kimyasal grup bulunmaktadır [125]. Bunlar; zotiyosiyanatlar, izosiyanatlar, asil azidler, NHS esterler, sülfonil klorürler, aldehitler, glikokalslar, epoksitler, oksiranlar, karbonatlar, aril halojenürler, imidoesterler, karbodiimitler, anhidritler ve florofenil esterlerdir. Bu

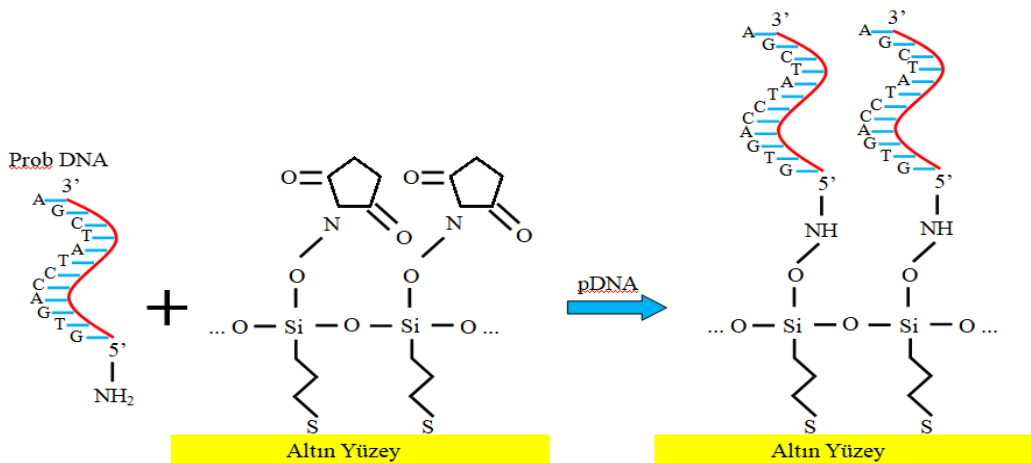
kimyasal gruplar arasında NHS esterleri ve imidoesterler, protein çapraz bağlama ve etiketleme için kullanılan en popüler amine özgü fonksiyonel gruplardır.

NHS ester ile aktive edilen çapraz bağlayıcılar, kararlı amid bağları oluşturmak üzere birincil aminler ile hafif bazik koşullarda reaksiyona girer ve reaksiyon sonunda N-hidroksisüksinimidi (NHS) serbest kalır.

NHS esterlerinin aminler ile reaksiyonu pH'a bağlıdır. Düşük pH'ta tepkime gerçekleşmezken optimalden daha yüksek pH'da NHS esterinin hızlı hidrolizi modifikasyonun verimi düşürülebilir. Modifikasyon için en ideal pH değeri 7 ile 9 arasındır [125].



Şekil 2.11. pDNA'nın EDC/NHS ile etkileşimi (Metot 1)



Şekil 2.12. pDNA'nın EDC/NHS ile etkileşimi (Metot 2)

2.2.2.3.1. pDNA Solüsyonunun Hazırlanması ve Uygulanması

E. coli bakterisine ait pDNA amin (NH₂) ile aktive edilmiş olarak satın alındı. pDNA dizaynı, *E. coli* bakterisi ATCC 25922 suşunun apaH gen bölgesini hedef alacak şekilde yapılmıştır. Alınan pDNA'ya ilk olarak 1 ml saf su ilave edilerek stok solüsyon haline getirildi ve 10¹⁵ kopya/ml pDNA stok solüsyonu elde edilene kadar saf su ile aşamalı olarak açıldı. Muhafaza koşulları doğrultusunda deney süresine kadar 2-8°C'de saklandı.

Stok olarak kullanılan pDNA tüpü her kullanımdan önce vorteks edildi. 1 ml PBS içerisine 10¹⁵ kopya/ml stok solüsyonundan 100 µl eklendikten sonra 1 dakika boyunca karıştırılarak pDNA solüsyonu kullanıma hazır hale getirildi. Gerçekleştirilen tüm deney aşamalarında pDNA konsantrasyonu 10¹⁴ kopya/ml olarak kullanıldı.

Hazırlanan solüsyon 60 dakika boyunca peristaltik pompa ile sensör yüzeyine verildi. Kapalı döngü ile verilen pDNA solüsyonu için peristaltik pompa hızı 100 µl/sn olarak ayarlandı. 60 dakika boyunca deney sisteminden anlık olarak alınan veri sonuçlarına baktığımızda rezonans frekansında azalma gözlenmiştir. Bu durum, amin ile aktive edilmiş sentetik *E. coli* pDNA'sının, NHS ile tepkimeye girerek kararlı amit bağı ile sensör yüzeyine kovalent olarak bağlandığını göstermektedir. pDNA immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra sensör yüzeyi PBS ile temizlendi. Bu yapılan işlem ile sensör yüzeyi bir sonraki deney aşaması için hazır hale getirildi.

10¹⁴ kopya/ml pDNA immobilizasyonunu ait deney aşaması 3 kez gerçekleştirildi ve her deney sonucunda elde edilen frekans bilgileri kayıt altına alındı. Ham veri setlerinin ortalaması alınarak elde edilen yeni veri setine eğri uydurma işlemi yapıldı. Eğri uydurma işlemi ile veri setindeki istenmeyen veriler bastırıldı.

2.2.2.4. Model Tükürük

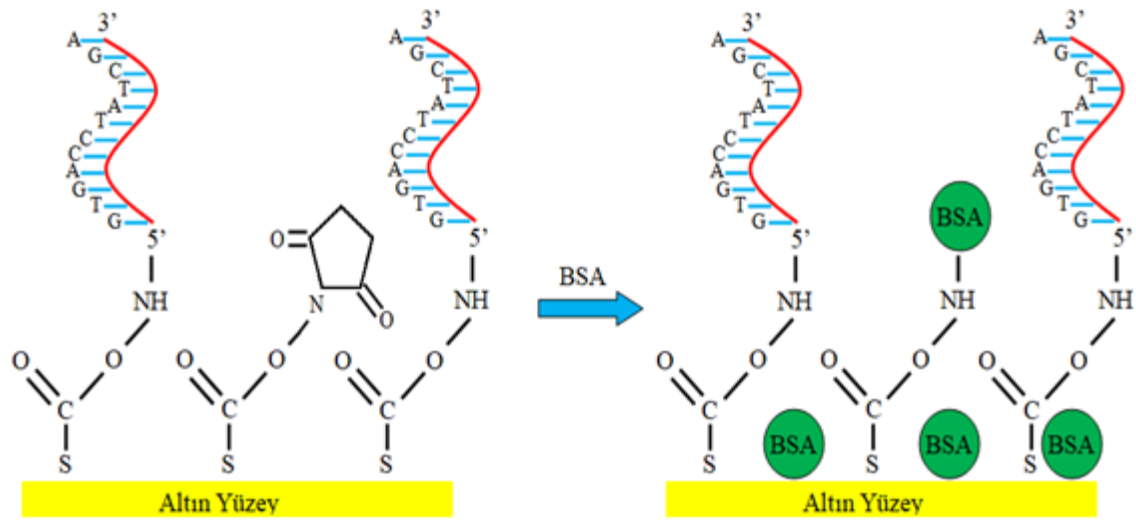
Bu tez çalışmasında gerçek tükürük numunesi kullanılmamış ve *E. coli* bakterisine ait genetik materyalin model tükürük içerisinde tespiti amaçlanmıştır. Model tükürük kullanılmasının nihai amacı genetik tespitin model tükürükte gerçekleşip gerçekleşmediğini tespit etmek ve ileri çalışmalarda gerçek tükürük numuneleri ile *E. coli* bakterisinin genetik tespitini gerçekleştirmektir.

Model tükürük oluşturmak için kullanılan temel kimyasal PBS'dir. PBS, biyolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan pH'ı yaklaşık olarak 7 olan bir tampon çözeltilidir [129]. PBS ile hazırlanan çözeltilerin ozmolalitesi ve iyon konsantrasyonları insan vücudu (izotonik) için uygun olmakta beraber çoğu hücre için toksik de değildir. Tükürük konulu bölümde de anlatıldığı üzere insan tükürüğünde çeşitli mineraller bulunmaktadır. PBS çözeltisini insan tükürüğüne benzetmek için çözeltinin içerisinde magnezyum ve kalsiyum ilave edilmiştir. Bunun yanında tükürükte bulunan proteinlerin göz ardı edilmemesi için % 5 oranında büyükbaş serum albümini (BSA) (10 ml PBS içinde 0,5 mg BSA) kullanılmıştır [130].

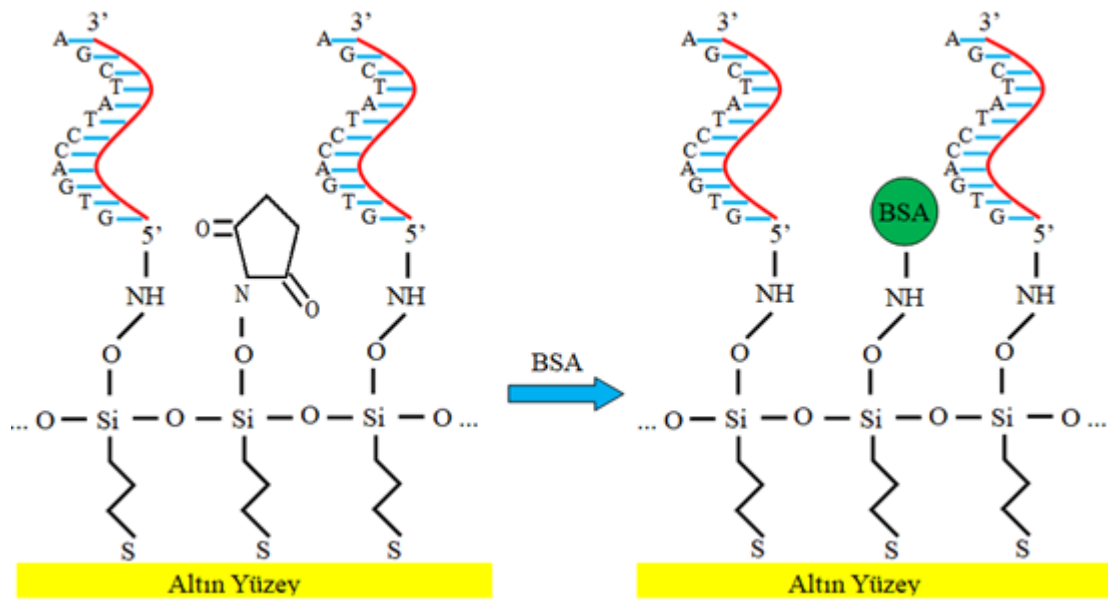
2.2.2.5. BSA Bloklama

Bloke edici ajan olan büyükbaş serum albümini (-BSA-), antijen ve antikorların spesifik olmayan bağlanmasını önlemek için sıklıkla kullanılmaktadır. BSA, yaklaşık 583 amino asitten oluşan ve karbonhidrat içermeyen bir polipeptit zinciridir. Stabilitesi nedeniyle biyolojik reaksiyonlarda tercih edilen bu proteinin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 66,000 gram/mol'dür [130].

İnsan tükürüğünde bulunan proteinler spesifik olmayan bağlantılar gerçekleştirebilmektedir. Bunu önlemek ve yüzey modifikasyonunun gerçekleştiğinden emin olmak için pDNA immobilizasyonundan sonra BSA ile bloklama yapılmıştır. Bir protein olan BSA'nın üzerinde karboksilik asit, tiyol ve amin fonksiyonel grupları bulunmaktadır. Metot 1'de, MUA kaplamanın SAM oluştururken yoğunlaşma tepkimesine maruz kalmaması ve moleküller arasında oluşan boşluk nedeni ile BSA, hem altın yüzeye (içerdiği tiyol grupları ile) hem de pDNA bağlanmayan amin reaktif gruplara (içerdiği amin grupları ile) bağlanmaktadır. Metot 2'de ise MPS kaplamanın yoğunlaşma tepkimesi gerçekleştirmesinden ötürü yüzeydeki moleküller arasından boşluk oluşmaz. Bu nedenle, BSA yalnızca pDNA bağlanmayan amin reaktif gruplara (içerdiği amin grupları ile) bağlanmaktadır. Bu yapılan işlem ile bir sonraki aşamada gerçekleştirilecek olan tDNA tespiti için ortam hazırlanmış ve tDNA'nın yapabileceği spesifik olmayan bağlantılar önlenmiştir.



Şekil 2.13. BSA'nın altın yüzey ile etkileşimi (Metot 1)



Şekil 2.14. BSA'nın altın yüzey ile etkileşimi (Metot 2)

2.2.2.5.1. BSA Solüsyonunun Hazırlanması ve Uygulanması

BSA solüsyonu, 10 ml PBS içerisine 0,5 mg BSA eklenerek hazırlandı. BSA ölçümü için hassas terazi kullanıldı. Molekül ağırlığı büyük olan BSA'nın, PBS çözeltisi içerisinde homojen bir şekilde dağıldığından emin olana kadar karıştırıldı. 60 dakika boyunca sensör yüzeyine kapalı döngü olacak şekilde peristaltik pompa aracılığıyla verildi. Peristaltik pompanın hızı 100 μ l/sn olacak şekilde ayarlandı.

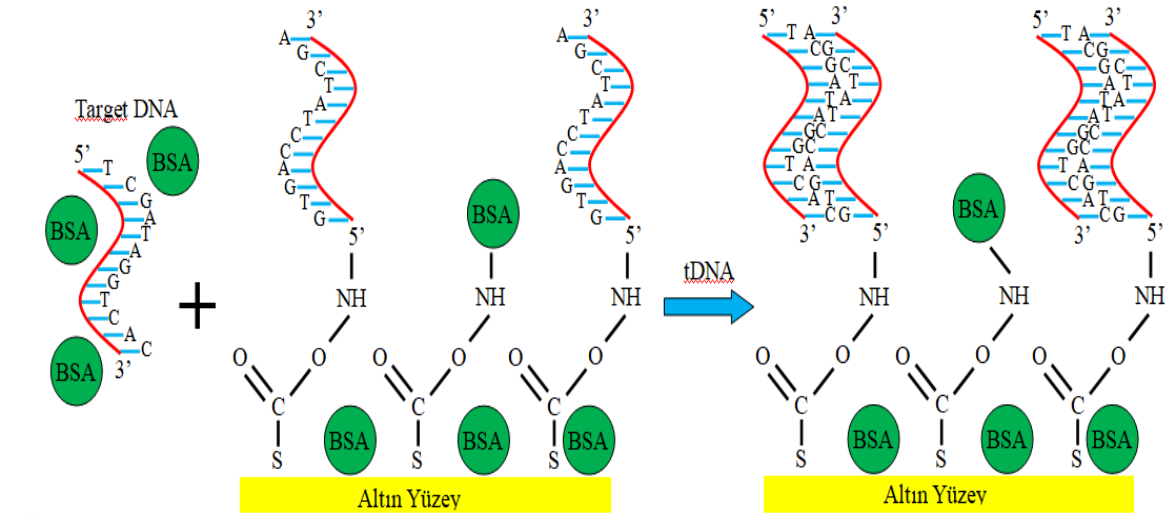
60 dakika olarak gerçekleştirilen BSA bloklama işlemi boyunca QCM cihazından anlık olarak ölçüm alındı. Elde edilen frekans bilgileri kaydedildi. Bu işlem sonunda sensör yüzeyi, % 5 oranında hazırlanan BSA (10 ml PBS içinde 0,5 mg BSA) ile proteine doyurulmuştur.

BSA bloklama işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Her deney sonucunda elde edilen frekans bilgileri QCM sistemi üzerinden kayıt altına alınarak ham veri setlerinin ortalaması alınmıştır. Elde edilen yeni veri setine eğri uydurma işlemi yapılmış ve veri setindeki istenmeyen veriler bastırılmıştır. Bu aşamaların sonunda elde edilen sonuç grafiğine bakıldığında rezonans frekansında kayma gözlenmiştir. Bu durum bize BSA bloklama aşamasının başarı ile gerçekleştiğini ve sensör yüzeyinin tDNA tespiti için hazır olduğu göstermektedir.

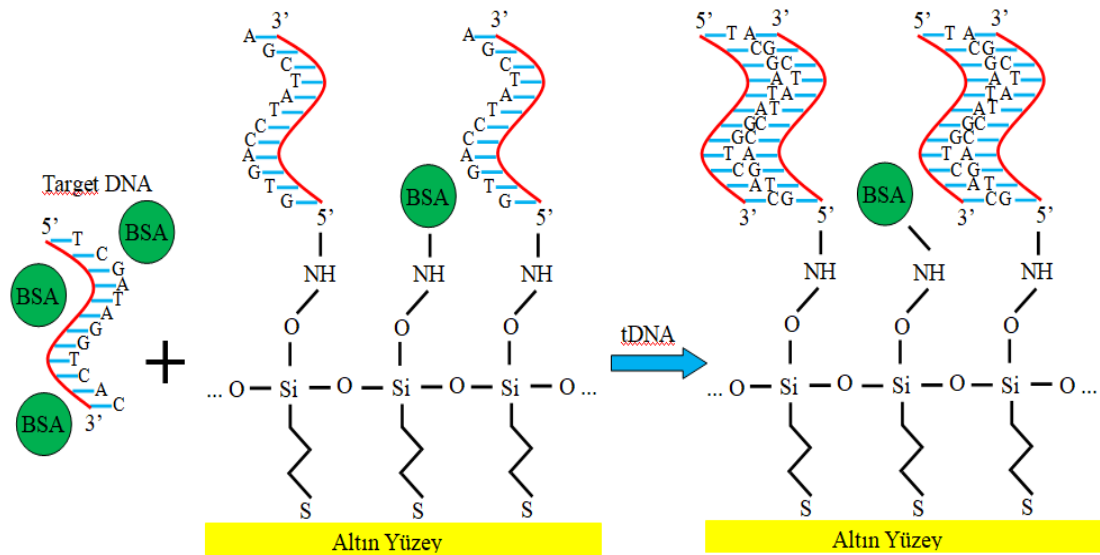
2.2.3. tDNA Tespiti

E. coli bakterisine ait satın alınan sentetik tDNA'lar pDNA ile tamamlayıcı özelliktedir. Tez çalışmasının amacı, model tükürük içerisinde *E. coli* bakterisinin genetik tespitini gerçekleştirmektir. Bu amaç doğrultusunda, MUA-EDC-NHS-pDNA-BSA ve MPS-EDC-NHS-pDNA-BSA aşamaları ile gerçekleştirilen iki farklı metot içinde sensör yüzeyinin modifikasyonu gerçekleştirilmiş ve tDNA tespiti için uygun ortam oluşturulmuştur.

pDNA ile tDNA birbirini tamamlayan iki DNA zinciridir. Sensör yüzeyine önceden bağlantısı gerçekleştirilen pDNA ile bu aşamada sensör yüzeyine verilecek olan tDNA ikili sarmal biçiminde bir araya gelerek hibridizasyona uğrayacaktır. Hibridizasyon sonunca pDNA ile tDNA arasında hidrojen bağları kurulacak ve sensör yüzeyinin ağırlığını değiştirecektir. Sensör yüzeyindeki ağırlığın artması sonucunda rezonans frekansında oluşan değişim, tDNA tespitinin gerçekleşip gerçekleşmediğini ortaya koyacaktır.



Şekil 2.15. Hibridizasyon reaksiyonu (Metot 1)



Şekil 2.16. Hibridizasyon reaksiyonu (Metot 2)

2.2.3.1. tDNA Solüsyonunun Hazırlanması ve Uygulanması

Analitin konsantrasyonunun, tespitte etkisini araştırmak için Metot 1’de, 10^{13} kopya/ml, 10^{10} kopya/ml ve 10^8 kopya/ml olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda tDNA solüsyonları hazırlanarak sensör yüzeyine verilmiştir. Yüzey modifikasyonunun tespitte etkisini araştırmak için ise Metot 2’de, 10^{13} kopya/ml konsantrasyonu için tDNA solüsyonu hazırlanmış ve sensör yüzeyine verilmiştir.

Satın alınan *E. coli* bakterisine ait sentetik tDNA, ilk olarak 1 ml saf su ile açıldı ve 10^{17} kopya/ml stok solüsyonu elde edildi. Bu stok solüsyonu ile kademeli olarak 10^{13} kopya/ml, 10^{10} kopya/ml ve 10^8 kopya/ml tDNA solüsyonları hazırlandı.

Her iki prosedür içinde peristaltik pompa hızı $100 \mu\text{l/sn}$ ayarlanarak 60 dakika boyunca kapalı döngü ile sensör yüzeyine verilmiştir. Bu üç konsantrasyonun dışında kontrol amaçlı olarak 0 kopya/ml içeren tDNA solüsyonu hazırlanarak peristaltik pompa ile sensör yüzeyine uygulandı. Böylelikle 10^{13} kopya/ml, 10^{10} kopya/ml ve 10^8 kopya/ml konsantrasyonlarında gerçekleşen frekans kaymalarının solüsyonların içerisinde bulunan tDNA'dan kaynaklandığı tespit edilmiştir.

tDNA solüsyonu için ilk olarak, 1 ml PBS içerisine 0,05 mg BSA eklenerek model tükürük ortamı oluşturuldu. 10^{13} kopya/ml konsantrasyonuna sahip tDNA solüsyonunu için, hazırlanan çözelti (1 ml PBS içerisine 0,05 mg BSA ilave edilerek hazırlanan çözelti) içerisine $0,1 \mu\text{l}$ tDNA, 10^{10} kopya/ml tDNA solüsyonu için, $0,0001 \mu\text{l}$ tDNA, 10^8 kopya/ml tDNA solüsyonunu için, $0,000001 \mu\text{l}$ tDNA ilave edildi. 10^0 kopya/ml konsantrasyonuna sahip tDNA solüsyonu için 1 ml PBS içerisine 0,05 mg BSA ilave edilerek hazırlanan solüsyon kullanıldı.

Hazırlanan solüsyonlar karıştırıldıktan sonra 60 dakika boyunca peristaltik pompa ile sensör yüzeyine verildi. Kapalı döngü ile verilen tDNA solüsyonları için peristaltik pompa hızı $100 \mu\text{l/sn}$ olarak ayarlandı. 60 dakika boyunca deney sisteminden anlık olarak alınan frekans bilgileri kaydedildi.

tDNA tespiti için belirlenen tüm konsantrasyonlar için deney prosedürü, en az üç kere tekrarlanmıştır. Her deney sonucunda elde edilen her bir konsantrasyona ait frekans bilgileri QCM sistemi üzerinden kayıt altına alınarak ham veri setlerinin ortalaması alınmıştır. Elde edilen yeni veri setlerine eğri uydurma işlemi yapılmış ve veri setindeki istenmeyen veriler bastırılmıştır. Bu aşamaların sonunda elde edilen sonuç grafiklerine (10^{13} kopya/ml, 10^{10} kopya/ml ve 10^8 kopya/ml) ayrı ayrı bakıldığında rezonans frekanslarında azalma gözlenmiştir. Fakat 10^0 kopya/ml konsantrasyonuna sahip tDNA deneylerinin sonuçlarında belirgin bir kayma gözlemlenememiştir. Bu durum bize sistemin sadece içerisinde tDNA numunesi bulunan solüsyona cevap verdiğini, PBS ve BSA ile hazırlanan çözeltiye cevap vermediğini göstermiştir.

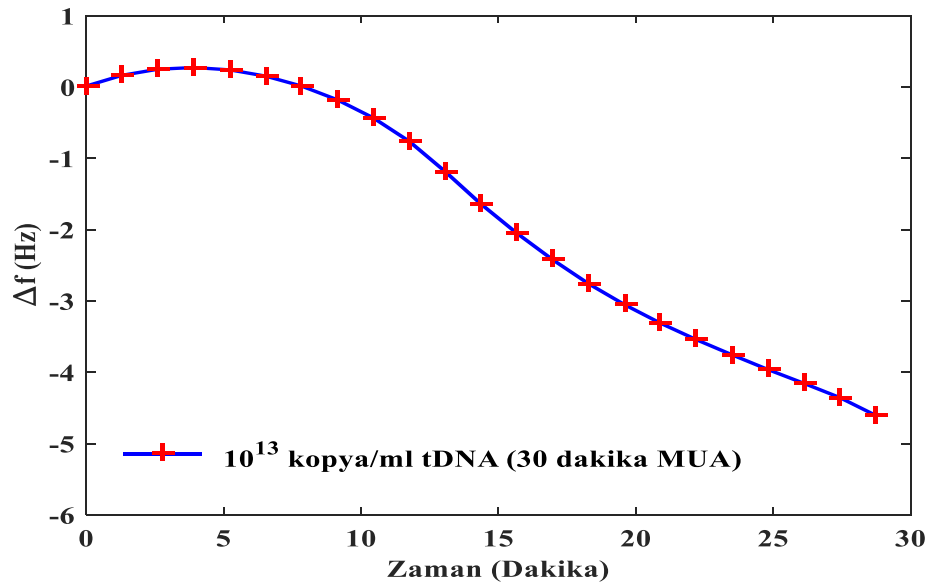
3. BÖLÜM

BULGULAR ve SONUÇLAR

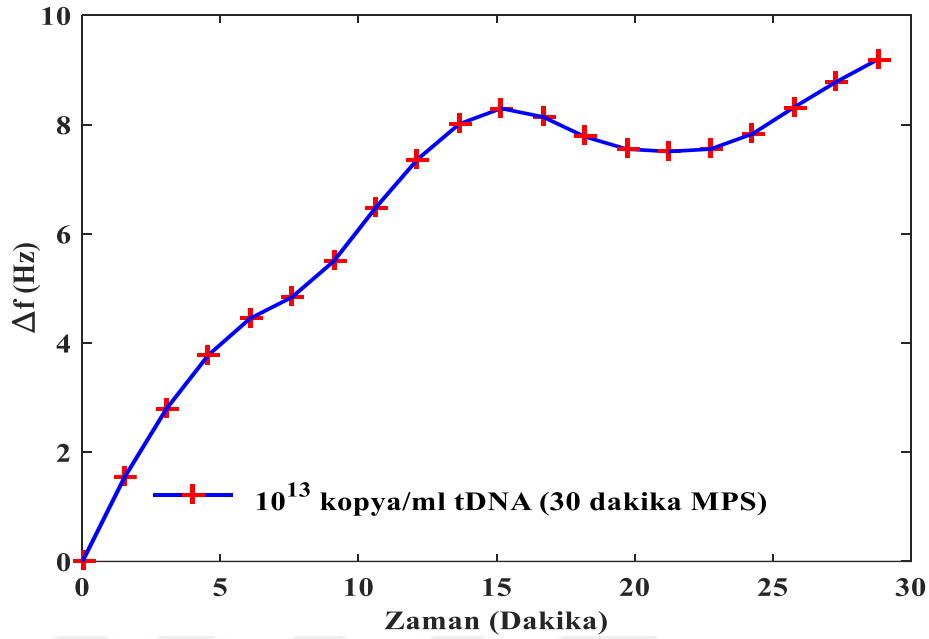
3.1. Deney Aşamalarının Frekans Analizi

3.1.1. 30 Dakikada Gerçekleştirilen Yüzey Modifikasyonlarının QCM ile Takibi

Escherichia coli bakterisinin, genetik tespiti için en uygun yüzey modifikasyonunu belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar, Tablo 2.2.'de verildiği üzere Metot 1 ve Metot 2 olarak ayrıştırılmıştır. Bu iki metodun temel farkı, yüzey modifikasyon aşamasının Metot 1'de MUA kimyasal kaplama ajanı ile Metot 2'de ise MPS kimyasal kaplama ajanı ile yürütülmesidir. Genetik tespitin başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesine olanak sağlayacak en uygun yüzey modifikasyon prosedürünün belirlenmesi için ilk olarak, MUA ve MPS kimyasal kaplama ajanları 30 dakika boyunca peristaltik pompa aracılığı ile sensör yüzeyine verilmiştir.



Şekil 3.1. tDNA (30 dakika MUA) tespitinin QCM ile takibi



Şekil 3.2. tDNA (30 dakika MPS) tespitinin QCM ile takibi

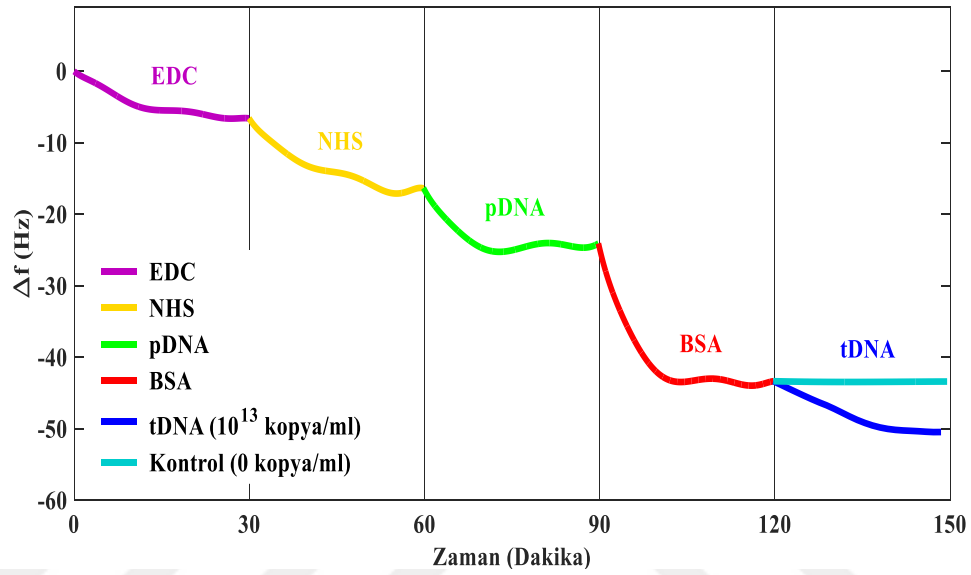
MUA (30 dakika) > EDC/NHS > pDNA > BSA > tDNA (10^{13} kopya/ml) prosedürünün son ve en önemli aşaması olan tDNA tespitinin, sensör yüzeyinde oluşturduğu rezonans frekansındaki değişim Şekil 3.1.'de verilmiştir. Grafığe bakıldığında 10^{13} kopya/ml tDNA'nın (30 dakika MUA) sensör yüzeyine uygulanması sonucunda rezonans frekansında 4.6 Hz'lük azalma görülmüştür.

MPS (30 dakika) > EDC/NHS > pDNA > BSA > tDNA (10^{13} kopya/ml) prosedürünün son ve en önemli aşaması olan tDNA tespitinin, sensör yüzeyinde oluşturduğu rezonans frekansındaki değişim Şekil 3.2.'de verilmiştir. Grafığe bakıldığında 10^{13} kopya/ml tDNA'nın (30 dakika MPS), sensör yüzeyine uygulanması sonucunda rezonans frekansında 9 Hz'lük artış gözlemlenmiştir.

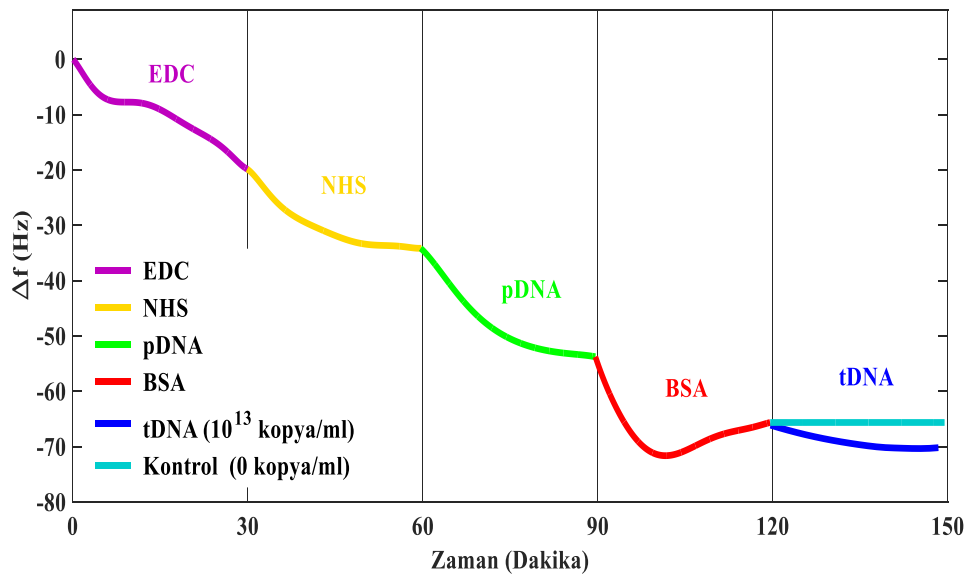
İki prosedür sonucunda elde edilen verilere bakıldığında, MUA ile gerçekleştirilen ilk prosedürde tDNA'nın en yüksek konsantrasyonu olan 10^{13} kopya/ml için rezonans frekansında gerçekleşen kaymanın yetersiz olması ve MPS ile gerçekleştirilen ikinci prosedürde ise rezonans frekansında ters kayma gözlemlenmesi sonucunda MUA ve MPS kimyasal kaplama ajanlarının sensör yüzeyine uygulanma sürelerinin yetersiz olduğu görülmüştür. Literatürdeki çalışmalar da gözden geçirilerek [124,76] MUA ve

MPS kimyasal kaplama ajanlarının sensör yüzeyine uygulanma süreleri bir gece olacak şekilde değiştirilmiştir.

3.1.2. Metot 1 ve Metot 2 Deney Sonuçları



Şekil 3.3. Metot 1'e ait deney aşamalarının QCM ile takibi



Şekil 3.4. Metot 2'e ait deney aşamalarının QCM ile takibi

Metot 1 ve Metot 2'ye ait deneylerin birinci basamağı, sırası ile MUA ve MPS kimyasal ajanları ile sensör yüzeyinin kaplanma işlemidir. MUA kimyasal kaplama ajanının içerdiği tiyol grupları (-SH) altın elektrot ile etkileşime girerek altın yüzeyde karboksilik asit (-COOH) ile işlevselleştirilmiş SAM'lar oluşturur [119] iken MPS kimyasal kaplama ajanı ise hidroksil grupları (-OH) ile işlevselleştirilmiş SAM'lar oluşturmaktadır [127]. Bir gece boyunca bekletilerek gerçekleştirilen yüzey kaplama işleminde, anlık ölçüm alınmadığı için MUA ve MPS yüzey modifikasyon sonuçları yukarıda verilen grafiklerde yer almamaktadır. Fakat gerçekleştirilen tüm deney basamakları birbirleri ile bağlantılı oldukları için bir sonraki basamak bir önceki işlemi doğrular niteliktedir. Bu nedenle Metot 1 ve Metot 2'ye ait EDC sonuçlarında gözlenen frekans kayması MUA ve MPS kaplama işlemlerini doğrulamaktadır.

İkinci ve üçüncü basamakta, 30 dakikalık süreler ile EDC/NHS kaplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu süre boyunca QCM sistemi ile alınan anlık frekans bilgileri neticesinde rezonans frekansında, Metot 1'de EDC için 6.5 Hz, NHS için 9.75 Hz, Metot 2'de ise EDC için 19.8 Hz, NHS için 14.2 Hz frekans kayması gözlemlenmiştir. EDC/NHS kaplama işlemi neticesinde altın yüzey, amin reaktif olarak işlevselleştirilmiş ve amin aktif pDNA immobilizasyonu için hazır hale getirilmiştir.

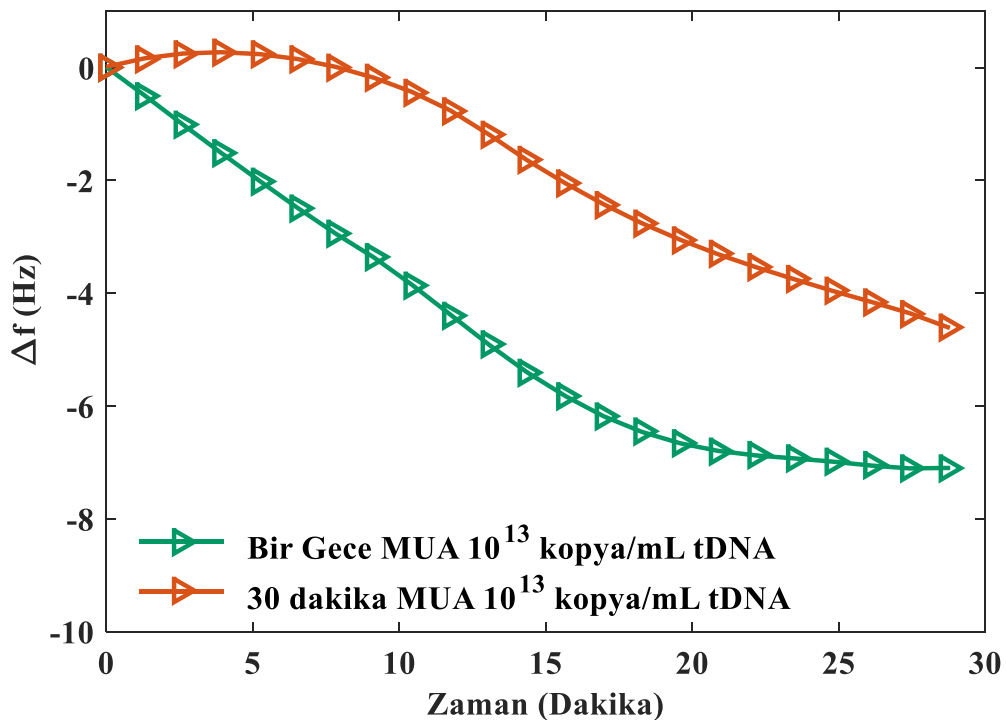
Dördüncü basamakta, pDNA immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yukarıdaki veriler analiz edildiğinde pDNA immobilizasyonu sonucunda rezonans frekansında Metot 1'de 7.7 Hz, Metot 2'de 19.6 Hz frekans kayması gerçekleştiği görülmektedir. Gerçekleştirilen immobilizasyonun sonucunda amin (NH₂) ile aktive edilmiş sentetik pDNA, NHS ester ile tepkimeye girerek kararlı amid bağları oluşturmuştur [125]. pDNA'nın altın yüzeye bağlanması sonucunda rezonans frekansında azalma gözlemlenmesi altın yüzeyde, NHS esterinin varlığını ve EDC/NHS kaplama işleminin başarı ile gerçekleştiğini ortaya koymaktadır.

Beşinci basamakta, BSA bloklama işlemi yapılmıştır. Bloklama sonucunda altın yüzeyin rezonans frekansında, Metot 1'de 19.3 Hz, Metot 2'de 11.9 Hz'lük azalma gerçekleşmiştir. BSA bloklama işlemi, insan tükürüğünde bulunan proteinlerin spesifik olmayan bağlantılar gerçekleştirilmemesi için yapılmıştır. Bu yapılan işlem ile bir sonraki aşamada gerçekleştirilecek olan tDNA tespiti için ortam hazırlanmış ve tDNA'nın yapabileceği spesifik olmayan bağlantılar önlenmiştir.

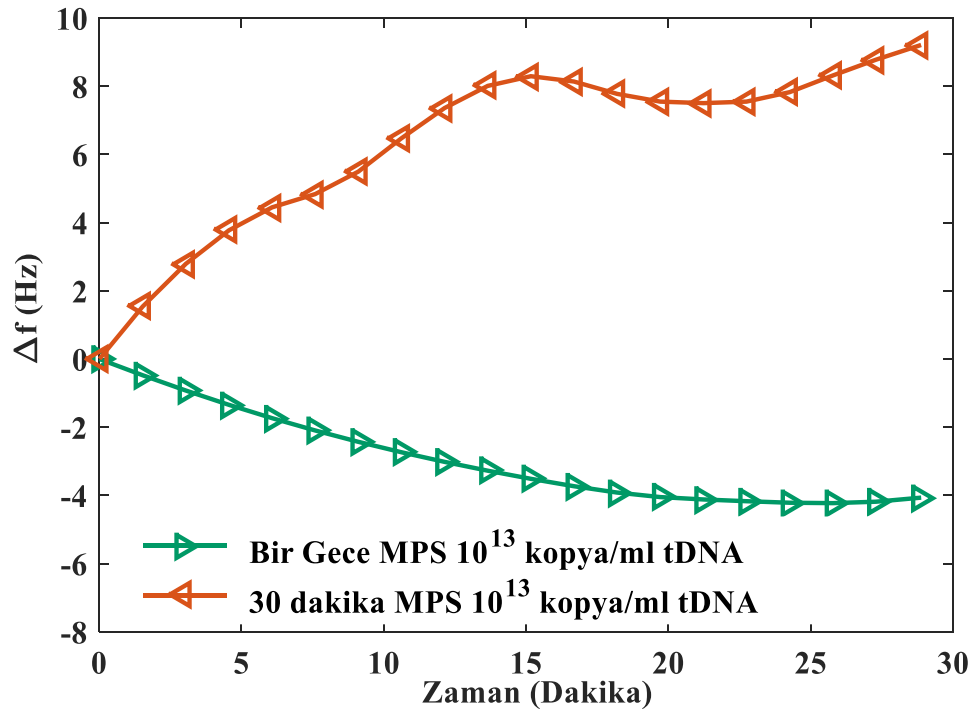
Altıncı basamakta ise kontrol deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu deney için sisteme, içerisinde tDNA bulunmayan solüsyon (1 mL PBS içerisine 0,05 mg BSA) hazırlanarak uygulandı. Kontrol basamağı sonucunda rezonans frekansında görülen azalma, Metot 1’de 0.1 Hz, Metot 2’de ise 0.5 Hz’dir. Bu sonuçlar bize altın yüzeyin, içerisinde tDNA numunesi bulunmayan, PBS ve BSA ile hazırlanan çözeltiye doyduğunu göstermektedir.

Yedinci basamakta ise tDNA tespiti yapılmıştır. Mililitrede 10^{13} tane tDNA kopyası içeren solüsyon, altın yüzeye verilmiştir. Altın yüzeye önceden bağlantısı gerçekleştirilen pDNA ile pDNA’nın tamamlayıcısı olan ve bu aşamada altın yüzeye verilen tDNA, pDNA ile ikili sarmal biçiminde bir araya gelerek hibridizasyon işlemi gerçekleşmiştir. Hibridizasyon ile altın yüzeydeki ağırlığın artması sonucunda rezonans frekansında Metot 1’de 6.95 Hz, Metot 2’de 4.25 Hz azalma gerçekleşmiştir. Her iki sonuç da en yüksek konsantrasyonda (10^{13} kopya/ml) gerçekleştirilen tDNA tespitinin başarı ile tamamlandığını ortaya koymaktadır.

3.1.3. tDNA Tespitinde Yüzey Kaplama Sürelerinin Karşılaştırılması

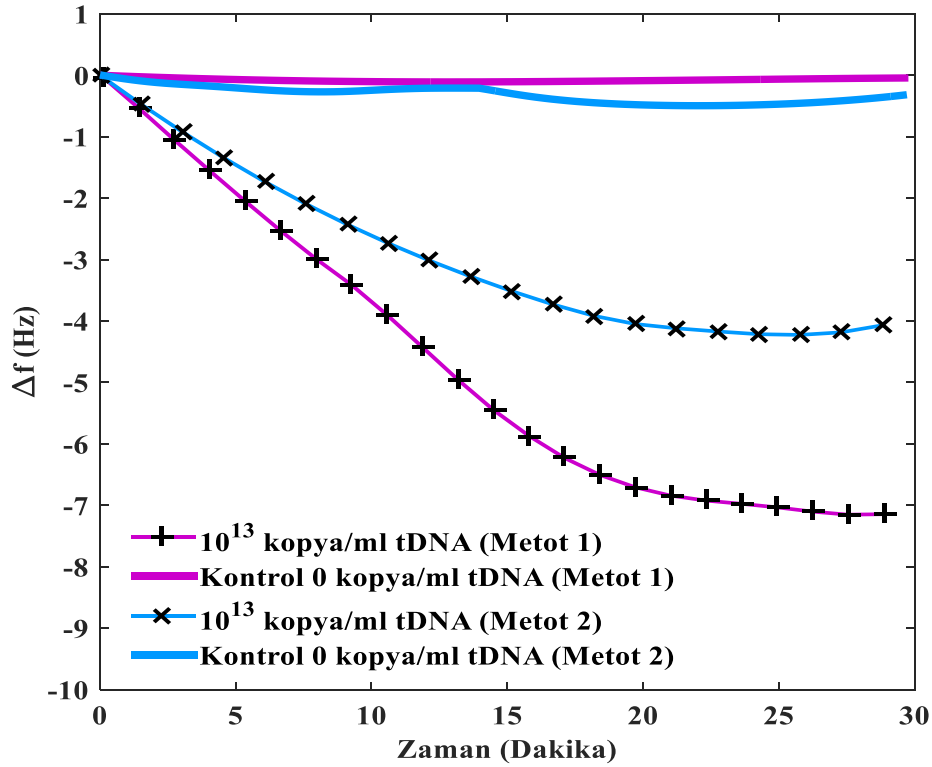


Şekil 3.5. tDNA tespitinde MUA yüzey kaplama sürelerinin karşılaştırılması



Şekil 3.6. tDNA tespitinde MPS yüzey kaplama sürelerinin karşılaştırılması

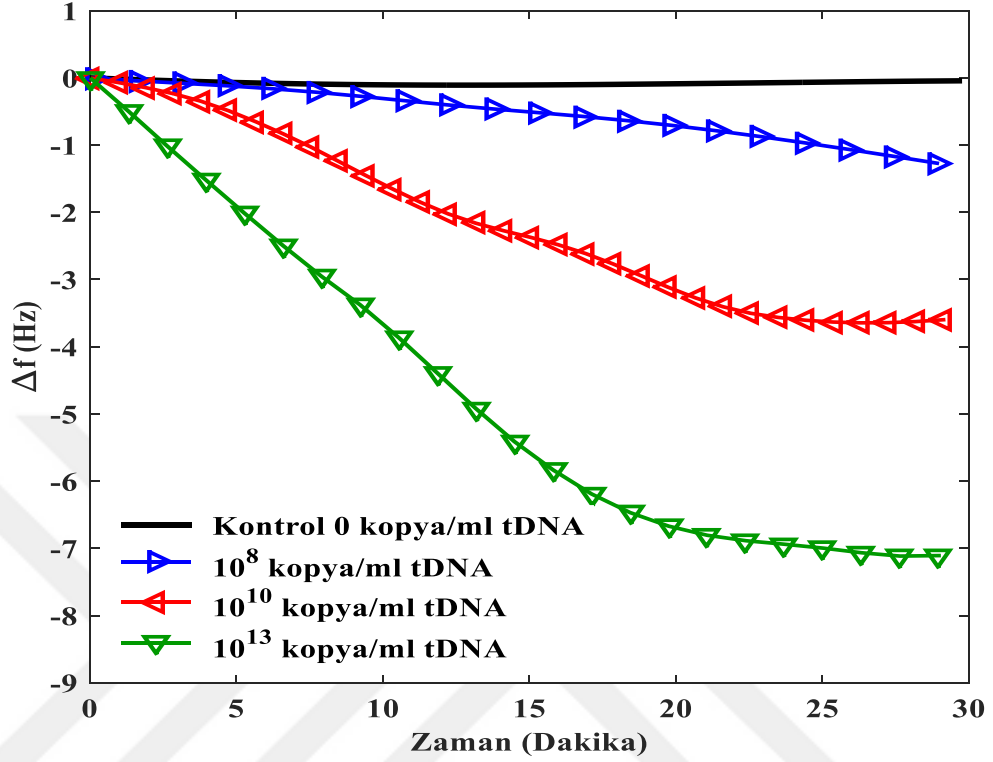
MUA ve MPS kimyasal kaplama ajanları, ilk olarak 30 dakika boyunca sensör yüzeyine verildi. Fakat Şekil 3.1., Şekil 3.2.'de verilen grafiklere ve literatür araştırmalarına dayanarak yüzey modifikasyonu için uygulanan sürenin bir gece olarak uzatılmasına karar verilmiştir. Şekil 3.5.'daki grafiğe bakıldığında MUA kaplamanın 30 dakika olarak uygulandığı deney prosedüründe, tDNA (10^{13} kopya/ml) tespit aşamasında, rezonans frekansında 4.6 Hz azalma görülürken bir gece olarak gerçekleştirilen deney prosedüründe, 6.95 Hz azalma görülmüştür. Şekil 3.6.'deki grafiğe baktığımızda ise MPS kaplamanın 30 dakika olarak uygulandığı deney prosedüründe, tDNA (10^{13} kopya/ml) tespit aşamasında, rezonans frekansında 9 Hz artış gerçekleşirken bir gece olarak gerçekleştirilen deney prosedüründe 4.25 Hz azalma görülmüştür. Elde edilen karşılaştırmalı sonuçlar incelendiğinde deney prosedürünün yüzey modifikasyon aşamasında yapılan değişikliğin tDNA tespiti için en uygun süre olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.7. Metot 1 ve Metot 2'deki tDNA (1013 kopya/ml) frekans kaymalarının karşılaştırılması

Şekil 3.3., Şekil 3.4. ve Şekil 3.7'de verilen grafikler ve yukarı belirtilen açıklamalar incelendiğinde MPS yüzey modifikasyonunu kapsayan Metot 2'nin en yüksek konsantrasyon olan 10^{13} kopya/ml konsantrasyonunda gerçekleştirilen tDNA tespiti sonucunda rezonans frekansındaki azalma, MUA yüzey modifikasyonunu kapsayan Metot 1'e oranla istenilen seviyede gerçekleşmemiştir. Bunun yanı sıra 0 kopya/ml konsantrasyonunda gerçekleştirilen kontrol deneylerinde Metot 1'in Metot 2'ye oranla daha kararlı cevap verdiği Şekil 3.7.'de görülmektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı tDNA konsantrasyon deneyleri kapsamında gerçekleştirilmesi planlanan 10^{10} kopya/ml ve 10^8 kopya/ml konsantrasyonlarına Metot 1 ile devam edilmeye karar verilmiştir.

3.1.4. Farklı tDNA Konsantrasyonlarının Frekans Analizi

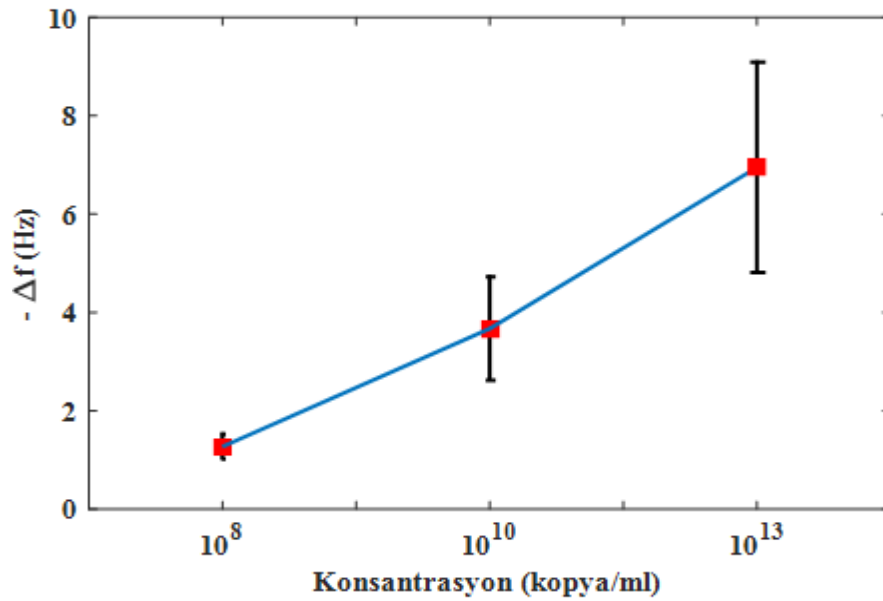


Şekil 3.8. Metot 1'e ait tDNA frekans kaymalarının karşılaştırılması

Şekil 3.8.'de farklı tDNA konsantrasyonlarında hazırlanan solüsyon, altın yüzeye uygulandığında rezonans frekansında gerçekleşen değişimler verilmiştir. İçerisinde tDNA kopyası içermeyen kontrol deneyi sonucunda rezonans frekansındaki azalma 0.1 Hz'dür. Biyosensörler ile başarılı bir tespit işlemi gerçekleştirebilmek için kısaca SNR olarak belirtilen sinyal gürültü oranının 3'ten büyük olması gerekmektedir. En küçük konsantrasyonda gerçekleşen kayma miktarı ve kontrol konsantrasyonunun standart sapması ile hesaplanan SNR oranı, yapılan çalışma için 5.1 olarak hesaplanmıştır. Buradan kullanılan tespit sisteminin, biyosensör alanında kullanılabilecek sinyal gürültü kalitesine sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Diğer konsantrasyonlarda gerçekleştirilen deney sonuçlarında, 10⁸ kopya/ml tDNA için 1.27 Hz, 10¹⁰ kopya/ml tDNA için 3.67 Hz ve 10¹³ kopya/ml tDNA için 6.95 Hz frekans kayması görülmüştür.

10^8 kopya/ml konsantrasyonu sonucunda gerçekleşen rezonans frekansındaki azalmanın, kontrol aşamasında gerçekleşen rezonans frekansındaki azalmadan fazla olması altın yüzeyin, yalnızca içerisinde pDNA'nın tamamlayıcısı olan tDNA'ya cevap verdiğini ortaya koymaktadır. Şekil 3.8.'de de açıkça görüldüğü gibi her konsantrasyon artışında rezonans frekansında gerçekleşen kayma miktarı da sayısal olarak artmıştır. Bu durum elde edilen sonuçların mantıksal çerçevede olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.9. Kalibrasyon eğrisi

Şekil 3.9.'da 3 farklı konsantrasyon için rezonans frekansında elde edilen ölçüm değerleri ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Mililitredeki tDNA konsantrasyonunun artması sonucunda elde edilen eğride de bir artış gözlemlenmektedir.

3.2. İstatiksel Analiz

Yapılan tez çalışmasında, Metot 1'e ait kontrol deneyleri ile mililitrede 10^8 kopyaya sahip en küçük konsantrasyon deneyleri sonucunda elde edilen frekans kaymaları Microsoft Excel programı ile t-Teste tabi tutulmuştur. İki veri setine ait deney sonuçlarının birbirinden anlamlı derecede farklılık içerdiğini görmek amacıyla çift taraflı ve 2 değişken bağımsız t-Testi kullanılmıştır. t-Test sonucunda p değeri, 0.000001 olarak elde edilmiştir. p değeri, 0.05'den oldukça küçük olduğu için değişkenler arasında anlamlı bir fark olduğu istatistiksel olarak ortaya konmuştur.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

İnsan sağlığını tehdit eden, büyük salgınlarda adını duyduğumuz ve dünya çapındaki ölüm oranlarının büyük bir kısmını kapsayan gastrointestinal enfeksiyonlara sebep olan *E. coli* bakterisi, gösterdiği antibiyotik direncinden ötürü bağışıklık sistemi baskılanmış, birden fazla antibiyotik kullanımına maruz kalan kişilerde ve hijyen problemleri yaşanan yerlerde önemli bir risk oluşturmaktadır. Sonucu ölüme kadar giden başta kanlı diyare olmak üzere çeşitli hastalıklara sebep olan bu patojenik bakterinin tespit süresinin kısaltılması, erken tanı sayesinde gerekli tedavi işlemlerine ivedilikle başlanabilmesi amacıyla bu tez çalışmasında, QCM sensör ile model tükürükte *Escherichia coli* bakterisi ATCC 25922 suşunun genetik tespiti yapılmaya çalışılmıştır. QCM sensörü ile *Escherichia coli* bakterisinin genetik tespitinin, herhangi bir DNA izolasyonu, pürifikasyonu ve amplifikasyonuna ihtiyaç duymadan, klinik test araçlarının hassasiyet seviyesinde, hızlı ve yerinde gerçekleştirilebilmesi amaçlanmıştır. Yapılan genetik tespit işleminin, tükürük sıvısı ile sağlanması ise hem hasta konforu hem işlem maliyeti hem de sağlık personel ihtiyacının oluşmaması açısından oldukça avantaj sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında ilk olarak, literatür çalışması yapılmıştır. Kapsamlı bir şekilde yürütülen bu literatür çalışmasında ilk olarak *E. coli* bakterisi ve bakteri tespiti için kullanılan yöntemler araştırılmıştır. Elde edilen bilgiler neticesinde olumlu ve olumsuz yönleri bulunan, hali hazırda kullanılan yöntemlere karşı alternatif bir yöntemin nasıl olabileceği üzerine tekrar araştırmalar yapıldı. Tamamlanan literatür araştırmaları sonucunda, özellikle DNA izolasyonu, pürifikasyonu ve amplifikasyonuna gerekmemesi, güvenilir ve hassasiyetinin yüksek olması, uzman personel gerektirmemesi, yerinde ve hızlı tespit yapabilmesi gibi pek çok sebepten ötürü QCM sensör ile çalışmaya karar verilmiştir.

Escherichia coli bakterisi ATCC 25922 suşunun genetik tespitini en hassas ve kararlı bir şekilde gerçekleştirebilmek için MPS, MUA ve diğer kullanılan kimyasalların etkisi incelendi. DNA tespitinin kalitesini ve hassasiyeti, altın yüzeyin kimyasal ve morfolojik özellikleri ile doğrudan ilişkilidir. Bu doğrultuda temelde 2, toplamda 4 farklı yöntem deneyerek DNA tespiti için en uygun yüzey modifikasyonu ve bu yüzey modifikasyonu için en uygun süre belirlenmeye çalışılmıştır. Yüzey işlevselleştirmesi için MUA ve MPS kimyasal kaplama ajanları ile ilk olarak yüzey modifikasyon süresinin belirlenmesi yönünde çalışmalar yapıldı. Bu doğrultuda, 30 dakika ve bir gece olacak şekilde iki yüzey modifikasyon süresi karşılaştırıldı. 3. Bölümde verilen grafikler ve açıklamalar ile MUA ve MPS kimyasal kaplama ajanlarının, sensör yüzeyine 30 dakika uygulanma sürelerinin yetersiz olduğu, bir gece uygulanma süresinde daha başarılı sonuçlar elde edildiği ortaya konmuş ve MUA, MPS kimyasal kaplama ajanlarının sensör yüzeyine uygulanma süreleri bir gece olacak şekilde değiştirilmiştir. Sonuçlar neticesinde belirlenen yüzey modifikasyon süresi literatürde yer alan çalışmalar ile bağdaşmaktadır [124,76]

DNA tespiti için en uygun yüzey modifikasyonunu belirleme çalışmaları, MUA ve MPS kimyasal ajanları ile sensör yüzeyinin bir gece boyunca kaplanmasına dayanmaktadır. Yapılan deney sonuçlarında elde edilen veriler incelendiğinde MUA yüzey modifikasyonunun, MPS yüzey modifikasyonuna nazaran DNA tespit işlemi daha başarılı ve negatif kontrol deneylerinde daha kararlı olduğu sonucuna varılmıştır. Bu nedenle tDNA konsantrasyon deneyleri, Metot 1 ile gerçekleştirilmiştir.

Gerçekleştirilen tüm deneyler en az 3 tekrarlı olarak yapılmış, elde edilen frekans kaymaları analiz edilerek sinyal işleme işlemlerinden sonra 3. Bölümde grafikler halinde sunulmuş ve yorumlanmıştır.

Çalışmanın en küçük konsantrasyonu olan 10^8 kopya/ml tDNA ile yürütülen deneyler sonucunda sistemin rezonans frekansında gözlemlenen kaymalar, kontrol deneyleri baz alındığında en küçük konsantrasyon için dahi *E. coli* bakterisinin genetik tespitinin başarılı bir gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Elde edilen DNA algılama hassasiyeti, literatürde yapılan benzer çalışmalar ile kıyaslanırsa: Xiaofan ve arkadaşları yaptığı çalışmada, MHDA, EDC ve NHS ile sensör yüzeyini modifiye ederek *E. coli* bakterisinin tespiti için tespit limiti 1.46×10^3 CFU/ml olan QCM aptasensörü

geliştirmeye çalışmışlardır [126]. Xiaole Mao ve arkadaşları, QCM sistem ile *E. coli* bakterisini tespit etmek için DNA sensörü geliştirmiş ve tespit limitini 10^{-12} M (1 pM) olarak açıklamışlardır [131]. Dingzhong Wang ve arkadaşları, tek bazlı DNA için yeniden kullanılabilir ve tespit limiti 0.8 nM olan QCM biyosensörü geliştirilmişlerdir [132]. Başka bir çalışmada ise araştırmacılar, QCM sisteminden farklı bir yöntem kullanarak 3 pM hassasiyette DNA tespiti yapmışlardır [133]. Bu tez çalışmasında ise 10^8 kopya/ml (0.2 pM) hassasiyette DNA tespiti gerçekleştirilmiş.

E. coli bakterisinin hızlı ve doğru tespiti, morbidite ve mortalite oranlarını oldukça etkileyecektir. Bu tez çalışmasında, gelecekte bir kişinin, tükürük numunesine bakılarak QCM sensör aracılığı ile hızlı bir şekilde birçok genetik tespitin gerçekleştirilmesine yardımcı olacak çalışma ve sonuçlar sunulmuştur.

KAYNAKÇA

1. Yoder, S.M., Kindel T.L., Tso P., 2010. Vitamins & Hormones, Chapter Eight Using the Lymph Fistula Rat Model to Study Incretin Secretion. Elsevier, Cilt (84): 221-249.
2. Barwick R.S., Levy D.A., Craun G.F., 2000. Surveillance for waterborne-disease outbreaks. Morbidity and Mortality Weekly Report, 49: 1-35.
3. Keithlin J., Sargeant J.M., Thomas M.K., Fazil, A., 2015. Systematic review and meta-analysis of the proportion of non-typhoidal Salmonella cases that develop chronic sequelae. **Epidemiology and infection**, **143** (7) : 1333–51.
4. Gastrointestinal Panel, 2018. (<http://www.acmegénomics.com/our-tests>) (Erişim tarihi: Mayıs 2020).
5. Hansman, G.S., Oka, T., Katayama, K., 2007. Human sapoviruses: genetic diversity, recombination and classification. *Reviews in Medical Virology*, 17, 133-141.
6. Schlenker, C., Surawicz, C. M., February 2009. Emerging infections of the gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, **23** (1): 89-99.
7. Walker, C.E., 2008. *Escherichia coli* O157:H7 in Beef Cattle: Prevalence in Gut Contents at Slaughter and The Effect of Neomycin Supplementation in Feed on Fecal Shedding in Experimentally Inoculated Cattle. Kansas State University, Master's Thesis, Kansas, 81 s.
8. Lawson, J.M., 2004. Update on *Escherichia coli* O157:H7. **Current Gastroenterology Report**, **6** (4): 297-301.
9. Nataro, J.P., Kaper, J.P., 1998. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, **11** (1): 142.
10. Münnich, A., Lübke-Becker, A., 2004. *Escherichia coli* infections in newborn puppies: clinical and epidemiological investigations. **Theriogenology**, **62** (3-4): 562-575.
11. Söyletir, G., Topçu, A.W., 1996. Akut Bakteriye İshaller: Enfeksiyon Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, s. 608-9.
12. Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, **2** (2): 123–140.

13. Croxen, M.A., Finlay, B.B., 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, **8** (1): 26–38.
14. Ertaş, N., Yıldırım, Y., Karadal, F., Al, S., 2013. Hayvansal gıdalarda *Escherichia coli* O157:H7'nin önemi. **Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi**, **10** (1): 45- 52.
15. <https://www.biocote.com/blog/five-facts-e-coli/> (Erişim tarihi: Mayıs 2020).
16. Tosun, H., Gönül, Ş.A., 2003. E. coli O157: H7'nin aside tolerans kazanması ve asidik gıdalarda önemi. **Orlab OnLine Mikrobiyoloji Dergisi**, **10** (1): 10-17.
17. Scheutz, F., Strokbine, A.N., 2005. *Escherichia*, In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. East Lansing, Springer, Second Edition: 607-25 pp.
18. Edberg, S., Rice, E., Karlin, R., Allen, M., 2000. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. Symposium series (Society for Applied Microbiology), (29): 106–116.
19. Han, M.J., Lee, S.Y., 2006. The *Escherichia coli* proteome: past, present, and future prospects. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, **70** (2): 362–439.
20. Manning, S.D., 2010. *Escherichia coli* infections, consulting, 1-99. Eds: H. Babcock, D.L. Heymann. Chelsea House Publishers, New York.
21. Nataro, J.P., Kaper, J.P., 1998. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, **11** (1): 142.
22. Emery, D.A., Nagaraja, K.V., Shaw, D.P., Newman, J.A., Eells, D.G., 1992. Virulence factors of *Escherichia coli* associated with coli septicemic chickens. *Avian Diseases*, 36: 504-11.
23. Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T., 2004. Pathogenic schema of diarrhoeagenic *E.coli*. **Nature Reviews Microbiology**, (2): 123-140.
24. Wasteson, Y., 2002. Zoonotic *Escherichia coli*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43 (1): 79-84.
25. Cortés, C., De la Fuente, R., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Dhabi, G., Mora, A., Justel, P., Contreras, A., Sánchez, A., Corrales, J.C., & Orden, J.A., 2005. Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairy goats in Spain. **Veterinary microbiology**, **110** (1-2): 67–76.

26. Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R., 2005. Mandell ,Douglas and Bennett's Principles and Practise of Infectious Diseases. Philadelphia: Churchill Livinstone 2567-2587 pp.
27. Batzing, B.L., 2002. Microbiology an İntroduction. Stamford, Brooks/ Cole Thomson Learning, 472- 476 pp.
28. Levent, B., 2009. *Escherichia, Shigella ve Salmonella*, 670-677.. In: Klinik Mikrobiyoloji (A. Başustaoğlu, A. Kubar, Ş.T. Yıldırım, M. Tanyüksel). Ankara, Atlas Kitapçılık, Ankara, 9. Baskı.
29. Nataro, J.P., Kaper, J.B., Robins, B.R., Prado, V., Levine, M.M., 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatric Infection Diseases Journal**, **6**: 829-831.
30. Gülhan, T., İlhan, Z., Aksakal, A., Solmaz, H., Ekin, İ.H., 2009. Hayvan orijinli *Escherichia coli* suşlarının enterotoksin tiplerinin (LT, ST) belirlenmesi. **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, **20**: 27 – 31.
31. Qadri, F., Svennerholm, A.M., Faruque, A.S., Sack, R.B., 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clinical Microbiology Reviews**, **18** (3): 465–483.
32. Donnenberg, M.S., 2005. Enterobacteriaceae, 2567-2587. In: Mandell ,Douglas and Bennett's Principles and Practise of Infectious Diseases (G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin). Philadelphia: Churchill Livinstone.
33. Kotloff, K.L., Winickoff, J.P., Ivanoff, B., Clemens, J.D., Swerdlow, D.L., Sansonetti, P.J., Adak, G.K., & Levine, M.M., 1999. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bulletin of the World Health Organization**, **77** (8): 651–666.
34. Pupo, G.M., Lan, R., Reeves, P.R., 2000. Multiple independent origins of Shigella clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **97** (19): 10567–10572.
35. Maurelli, A.T., 2013. *Escherichia Coli*, Chapter 7, Shigella and enteroinvasive *Escherichia coli* Paradigms for pathogen evolution and host–parasite interactions. Elsevier.

36. Tran Van Nhieu, G., Bourdet-Sicard, R., Duménil, G., Blocker, A., Sansonetti, P.J. 2000. Bacterial signals and cell responses during *Shigella* entry into epithelial cells. **Cellular microbiology**, **2** (3): 187–193.
37. Savarino, S.J., Fasano, A., Watson, J., Martin, B.M., Levine, M.M., Guandalini, S., Guerry, P., 1993. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **90** (7): 3093–3097.
38. Kang, G., Hart, A., Shears, P., 2014. Bacterial Enteropathogens: Manson's Tropical Infectious Diseases. Saunders Ltd., Elsevier, Sayfa 319-336 pp.
39. Bernet-Camard, M.F., Coconnier, M.H., Hudault, S., Servin, A.L., 1996. Pathogenicity of the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845: F1845 adhesin-decay accelerating factor interaction, brush border microvillus injury, and actin disassembly in cultured human intestinal epithelial cells. **Infection and Immunity**, **64** (6): 1918–1928.
40. Scaletsky, I.C., Fabbriotti, S.H., Carvalho, R.L., Nunes, C.R., Maranhão, H.S., Morais, M.B., Fagundes-Neto, U., 2002. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. **Journal of clinical microbiology**, **40** (2): 645–648.
41. From the Centers for Disease Control and Prevention, 2002. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating ground beef. United States, Morbidity and Mortality Weekly Report, 51: 637-9.
42. Guth, B.E., Chinen I., Miliwebsky, E., Cerqueira, A.M., Chillemi, G., Andrade, J. R, Baschkier, A., Rivas, M. 2003. Serotypes and Shiga toxin genotypes among *Escherichia coli* isolated from animals and food in Argentina and Brazil. **Veterinary Microbiology**, **92**: 335-49.
43. Irino, K., Kato, M.A., Vaz, T.M., Ramos, I.I., Souza, M.A., Cruz, A.S., Gomes, T.A., Vieira, M.A., Guth, B.E., 2005. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Veterinary microbiology**, **105** (1): 29–36.
44. Timm, C.D., Irino, K., Gomes, T.A., Vieira, M.M., Guth, B.E., Vaz, T.M., Moreira, C.N., Aleixo, J.A., 2007. Virulence markers and serotypes of Shiga toxin-

- producing *Escherichia coli*, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, **44** (4): 419–425.
45. Willshaw, G.A., Cheasty, T., Smith, H.R., *Escherichia Coli*, 1444. In: The Microbiological Safety And Quality Of Food (Eds: B.M. Lund, T.C. Baird-Parker, G.W. Gould). Maryland, Aspen Publishers.
46. Ho, J., Tambyah, P.A., Paterson, D.L., 2010. Multiresistant Gram-negative infections: a global perspective. **Current opinion in infectious diseases**, **23** (6): 546–553.
47. Wise, R., 2002. Antimicrobial resistance: priorities for action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **49**: 585-586.
48. Bell, J.M., Turnidge, J.D., Gales, A.C., Pfaller, M.A., Jones, R.N., SENTRY APAC Study Group, 2002. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-99). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, **42** (3): 193–198.
49. Kaya, O., Akcam, F.Z., Gonen, I., Unal, O., Ceylan, T., 2013. Risk factors for bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a Turkish hospital. **Journal of Infection in Developing Countries**, **7** (7): 507-512.
50. Wang, A.X., 2015. The fringtening spread of antibiotic resistance around the World, visualized. (<https://qz.com/505556/the-frightening-spread-of-antibiotic-resistance-around-the-world-visualized/>), (Ocak 2019).
51. Coyle, M. B., Lampe, M. F., Aitken, C. L., Feigl, P., Sherris, J. C., 1976. Reproducibility of control strains for antibiotic susceptibility testing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **10** (3): 436-440.
52. Diaz-Arnold, A.M., Marek, C. A., 2002. The impact of saliva on patient care: A literature review. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, **88** (3): 337–343.
53. Lamkin, M.S., Oppenheim, F.G., 1993. Structural features of salivary function. *Critical reviews in oral biology and medicine: An official publication of the American Association of Oral Biologists*, **4** (3-4): 251–259.
54. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 1993. **4**: 251-259.
55. <https://glenrosefamilydental.com/uncategorized/five-fascinating-facts-about-saliva/>, (Erişim tarihi: Mart 2020).

56. Matsuo R., 2000. Role of saliva in the maintenance of taste sensitivity. *Critical reviews in oral biology and medicine: An official publication of the American Association of Oral Biologists*, **11** (2): 216–229.
57. Eliasson, L., Birkhed, D., Osterberg, T., Carlén, A., 2006. Minor salivary gland secretion rates and immunoglobulin A in adults and the elderly. *European Journal of Oral Sciences*, **114** (6): 494–499.
58. Babademez, M.A.. Tükürük bezi tümörleri. (<https://www.mehmetalibabademez.com/tukuruk-bezi-tumorleri-2/>), (Erişim tarihi: Mart 2020).
59. Teeuw, W., Bosch, J.A., Veerman, E.C., & Amerongen, A.V., 2004. Neuroendocrine regulation of salivary IgA synthesis and secretion: implications for oral health. *Biological chemistry*, **385** (12): 1137–1146.
60. Dawes, C., 1970. Effects of diet on salivary secretion and composition. *Journal of Dental Research*, **49** (6): 1263–1273.
61. Lagerlöf, F., Oliveby, A., 1994. Caries-protective factors in saliva. *Advances in Dental Research*, **8** (2): 229–238.
62. Ihalin, R., Loimaranta, V., Tenovu, J., 2006. Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **445** (2): 261–268.
63. Emekli, N., Yarat, A., Kadir, T., Akbay, T., Çorak, A., Pişiriciler, R., 2008. Some proteins and enzymes in saliva, 225-270. In: *Tükürük: Histolojisi Fizyolojisi Mikrobiyolojisi ve Biyokimyası* (Eds: N. Emekli, A. Yarat). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
64. Kaufman, E., Lamster, I.B., 2002. The diagnostic applications of saliva--a review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, **13** (2): 197–212.
65. Wagner, P.D., Verma, M., Srivastava, S., 2004. Challenges for biomarkers in cancer detection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1022**, 9–16.
66. Yang, B.L., Yeh, C., Kwong, W.G., Lee, S.D., 2015. A novel one-step Helicobacter pylori saliva antigen test. *Journal of the Chinese Medical Association*, **78** (2): 96-100.
67. Javaid, M.A., Ahmed, A.S., Durand, R., Tran, S.D., 2016. Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, **6** (1): 66-75.

68. Wong, L.J., Lueth, M., Li, X.N., Lau, C.C., Vogel, H., 2003. Detection of mitochondrial DNA mutations in the tumor and cerebrospinal fluid of medulloblastoma patients. *Cancer Research*, 63 (14): 3866–71.
69. Kocík, M., Vymetalová, Y., Málek, I., 2007. Volná (nebunená) lidská DNA v tělních tekutinách--možnosti klinického využití [Cell-free human DNA in body fluids--potential for clinical applications]. *Casopis Lekarů Ceských*, 146 (2): 96–101.
70. Pink, R., Simek, J., Vondrakova, J., Faber, E., Michl, P., Pazdera, J, et al., 2009. Saliva as a diagnostic medium. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 153 (2): 103-10.
71. Rajapaksha, P., Elbourne, A., Gangadoo, S., Brown, R., Cozzolino, D., Chapman, J.A., 2019. Review of methods for the detection of pathogenic microorganisms. *Analysis*, 144: 396–411.
72. Ibekwe, A.M., Grieve, C.M., 2003. Detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in environmental samples by real-time PCR. ***Journal of Applied Microbiology***, 94 (3): 421–31.
73. Shen, Z., Hou, N., Jin, M., Qiu, Z., Wang, J., Zhang, B., Wang, X., Wang, J., Zhou, D., Li, J., 2014. A novel enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immunomagnetic and beacon gold nanoparticles. *Gut pathogens*, 6, 14.
74. Tahir, Z.M., Alocilja, E.C., 2003. Fabrication of a disposable biosensor for *Escherichia coli* O157:H7 detection. ***IEEE Sensors Journal***, 3 (4): 345-351.
75. Wang, Y., Ye, Z., Si, C., & Ying, Y., 2013. Monitoring of *Escherichia coli* O157:H7 in food samples using lectin based surface plasmon resonance biosensor. ***Food Chemistry***, 136 (3-4), 1303–1308.
76. Yu, X., Chen, F., Wang, R., Li, Y., 2018. Whole-bacterium SELEX of DNA aptamers for rapid detection of *E.coli* O157:H7 using a QCM sensor. ***Journal of Biotechnology***, 266: 39-49.
77. Frederick, M.A., 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Chapter 16.
78. Devrim, A.K., Kaya, N., 2004. Polimeraz zincir reaksiyonu. ***Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi***, 10 (2): 209-214.

79. Erlich, H.A., 1989. PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplifications. Stockton Press, NY. 246 pp.
80. Özdoğan, M., 2020. Polimeraz zincir reaksiyonu. (<https://www.drozdogan.com/polimeraz-zincir-reaksiyonu-nedir-pcr-tarihcesi-nasil-yapilir/>), (Erişim tarihi: Mart 2020).
81. ELISA testi, 2015. (<https://doktorumnedio.com/immunoloji/elisa-testi-nedir/>), (Erişim tarihi: Nisan 2020).
82. Engvall, E., Perlman, P., 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Immunochemistry*, 8: 871-9.
83. Grattarola, M., Massobrio, G., 1998. *Bioelectronics Handbook* MOSFETs, Biosensor and Neurons. Chapter 10.
84. Wagner, T., Werner, C.F., Miyamoto, K., Schöning, M.J., Yoshinobu, T., 2012. Development and characterisation of a compact light-addressable potentiometric sensor (LAPS) based on the digital light processing (DLP) technology for flexible chemical imaging. **Sensors and Actuators B: Chemical**, **170**: 34–39.
85. Abdel-Hamid, D., Ivnitski, P., Atanasov, E.W., 1999. Flow-through immunofiltration assay system for rapid detection of *E. coli* O157: H7. **Biosensors and Bioelectronics**, **14**: 309-316.
86. Chemburu, S., Wilkins, E., Abdel-Hamid, I., 2005. Detection of pathogenic bacteria in food samples using highly-dispersed carbon particles. **Biosensors & Bioelectronics**, **21** (3), 491–499.
87. Ercole, C., Gallo, M., Mosiello, L., Baccella, S., Lepidi, A., 2003. *Escherichia coli* detection in vegetable food by a potentiometric biosensor. **Sensors and Actuators B Chemical**, **91**: 163-168.
88. Gehring, A.G., Patterson, D.L., Tu, S.I., 1998. Use of a light-addressable potentiometric sensor for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. **Analytical Biochemistry**, **258** (2): 293–298.
89. Muhammad-Tahir, Z., Alocilja, E.C., 2003. A conductometric biosensor for biosecurity. **Biosensors and Bioelectronics**, **18** (5-6): 813–819.
90. Dinçkaya, E., 1999. Enzim sensörleri, 81-142. In: *Biyosensörler* (Eds: A. Telefoncu). Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir.

91. Dey, D., Goswami, T., 2011. Optical biosensors: a revolution towards quantum nanoscale electronics device fabrication. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 348218.
92. Damborský, P., Švitel, J., Katrlík, J., 2016. Optical biosensors. Essays in biochemistry, 60 (1): 91–100.
93. Waswa, J., Irudayaraj, J., DebRoyDirect, C., 2007. Detection of *E-Coli* O157: H7 in selected food systems by a surface plasmon resonance biosensor. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**, **40**: 187-192.
94. Simpson, J.M., LimRapid, D.V., 2005. PCR confirmation of *E. coli* 0157: H7 after evanescent wave fiber optic biosensor detection. **Biosensors and Bioelectronics**, **21**: 881-887.
95. Yin, M., Gu, B., Zhao, S., Qian, J., Zhang, A., 2011. Highly sensitive and fast responsive fiber-optic modal interferometric pH sensor based on polyelectrolyte complex and polyelectrolyte self-assembled nanocoating. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, **399**: 3, 623 – 3631.
96. Curie, J., Curie, P., 1880. Développement, par pression, de l'électricité polaire dans les cristaux hémihédres faces ' inclinées. C R Acad Sci Gen, 91: 294–295.
97. Jaffe, B., Roth, R.S., Marzullo, S., 1954. Piezoelectric properties of lead zirconate-lead titanate solid-solution ceramic ware. **Journal of Applied Physics**, **25**: 809–810.
98. Whatmore, R., 2017. Ferroelectric Materials. In: Springer Handbook of Electronic and Photonic Materials, (Eds: S. Kasap, P. Capper). Springer, Cham.
99. Lukasz Krzyszt, M., 2016. Concept, Implementation And Analysis Of The Piezoelectric Resonant Sensor/Actuator For Measuring The Aging Process Of Human Skin. De L'université De Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse, Doctorat Thèse, Toulouse.
100. Zhou, D., 2003. Experimental Investigation of Non-linear Constitutive Behaviour of PZT Piezoceramics. Forschungszentrum Karlsruhe, Wissenschaftliche Berichte, FZKA 6869, PhD Thesis.
101. Exelis: Electro-Ceramic Products and Material Specification, 2013. (<https://www.harris.com/sites/default/files/downloads/solutions/harris-electro-ceramic-products-and-material-specification-es.pdf>), (Erişim Tarihi: Nisan 2020).

102. <https://www.slideshare.net/prashanttripathi12/sensor-and-transducers-lect-1>, (Erişim tarihi: Nisan 2020).
103. Piezoelectric generators: applications. (<https://www.americanpiezo.com/piezo-theory/generators.html>), (Erişim tarihi: Nisan 2020).
104. Yang, Y., Tu, Y., Wang, X., Pan, J., Ding, Y., 2015. A label-free immunosensor for ultrasensitive detection of ketamine based on quartz crystal microbalance. **Sensors (Basel)**, **15** (4): 8540-8549.
105. Scarano, S., Stefano, M., Minunni, M., 2016. Label free Affinity sensing: application to food analysis. *Acta Imeko*. 5.
106. İpekoğlu, B., 1999. Kuvars, Kuvarsit, Kuvars Kumu. İstanbul Maden İhracatçıları Birliği, Türkiye Endüstriyel Mineraller Envanteri, 102-106.
107. Kocabaş, H. Kristal kuvars ailesi. (http://hasankocabas.com.tr/icerik-51-kristal_kuvars_aile.html), (Erişim tarihi: Nisan 2020).
108. O'Sullivan, C.K., Guilbault, G.G., 1999. Commercial quartz crystal microbalances – theory and applications. **Biosensors and Bioelectronics**, **14** (8,9): 663-670.
109. Swann, M.J., 2019. The Principles of QCM-I. QCM sensors SCIENTIFIC PUBLICATIONS.
110. Sauerbrey, G., 1959. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. **Zeitschrift Für Physik**, **155** (2), 206-222.
111. King, W.H., 1964. Piezoelectric Sorption Detector, *Analytical Chemistry*, **36**: 1735–1741.
112. Shons, A., Dorman, F., Najarian, J., 1972. The piezoelectric quartz immunosensor. **Journal of Biomedical Materials Research**, **6**: 565-570.
113. Fawcett, N.C., Evans, J.A., Chen, L.C., Drozda, K.A., Flowers, N., 1988. A quartz crystal detector for DNA. *Analytical Letters*, **21**, 1099-1110.
114. Ito, K., Hashimoto, K., Ishimori, Y., 1996. Quantitative analysis for solid phase hybridization reaction and binding reaction of DNA using a quartz crystal microbalance. **Analytica Chimica Acta**, **327**: 29-35.
115. Su, X.L., Li, Y., 2005. A QCM immunosensor for Salmonella detection with simultaneous measurements of resonant frequency and motional resistance. **Biosensors and Bioelectronics**, **21** (6): 840-848.

116. Wu, V.C.H., Chen, S.H., Sheng, C., 2007. Real-time detection of *Escherichia coli* O157:H7 sequences using a circulating-flow system of quartz crystal microbalance. **Biosensors and Bioelectronics**, **22** (12), 2967-2975.
117. Wu, T.H., Liao, S.C., Chen, Y.F., Huang, Y.Y., Wei, Y.S., Tu, S.J., Chen, K.S., 2013. Determination of functionalized gold nanoparticles incorporated in hydrophilic and hydrophobic microenvironments by surface modification of quartz crystal microbalance. *Applied Surface Science*, Elsevier, 274: 418-424.
118. Su, X.L., Li, Y., 2004. A self-assembled monolayer-based piezoelectric immunosensor for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7. **Biosensors and Bioelectronics**, **19** (6): 563-574.
119. Xue, Y., Li, X., Li, H., Zhang, W., 2014. Quantifying thiol-gold interactions towards the efficient strength control. *Nature communications*, 5, 4348.
120. Huang E., Satjapipat M., Han S., Zhou F., 2001. Surface structure and coverage of an oligonucleotide probe tethered onto a gold substrate and its hybridization efficiency for a polynucleotide target. **Langmuir**, **17**: 1215- 1224.
121. Chow, E., Hibbert, D.B. and Gooding, J.J., 2005. Electrochemical detection of lead ions via the covalent attachment of human angiotensin I to mercaptopropionic acid and thiocetic acid self-assembled monolayers. **Analytica Chimica Acta**, **543**: 167-176.
122. Gates, B. D., Xu, Q., Stewart, M., Ryan, D., Willson, C. G., Whitesides, G. M., 2005. New approaches to nanofabrication: molding, printing, and other techniques. **Chemical Reviews**, **105** (4): 1171–1196.
123. Wickramathilaka, M. P., Tao, B. Y., 2019. Characterization of covalent crosslinking strategies for synthesizing DNA-based bioconjugates. **Journal of Biological Engineering**, **13**: 63.
124. Tsai, T.C., Liu, C.W., Wu, Y.C., Ondevilla, N.A.P., Osawa, M., Chang, H.C., 2019. In situ study of EDC/NHS immobilization on gold surface based on attenuated total reflection surface-enhanced infrared absorption spectroscopy (ATR-SEIRAS). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, **175**: 300-3051.
125. <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/amine-reactive-crosslinker-chemistry.html>, (Erişim tarihi: Mayıs 2020).

126. Soylu M.Ç., Keskin M., Keser K., Ceran K., Köşker F.B., “Kuvars Kristal Mikroterazi ile Genetik Tespitte Yüzey Kaplama Etkisi”, International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology, Ankara, Türkiye, 22-23 Kasım 2018, pp.163.
127. Soylu, M.C., Shih, W.H. and Shih, W.Y., 2013. Insulation by solution 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPS) coating: Effect of ph, water, and mps content. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, **52** (7): 2590-7.
128. Icoz, K., Soylu, M.C., Canikara, Z., Unal, E., 2018. Quartz-crystal microbalance measurements of CD19 antibody immobilization on gold surface and capturing B lymphoblast cells: effect of surface functionalization. **Electroanalysis**, **30** (5): 834-841.
129. Lichtenauer, M., Nickl, S., Hoetzenecker, K., Mangold, A., Mitterbauer, A., Hacker, S., Zimmermann, M., Ankersmit, H., 2011. Effect of PBS solutions on chemokine secretion of human peripheral blood mononuclear cells. *American Laboratory*, 43 (1): 30-33.
130. https://en.wikipedia.org/wiki/Bovine_serum_albumin, (Erişim tarihi: Haziran 2020).
131. Mao, X., Yang, L., Su, X.L., Li, Y., 2006. A nanoparticle amplification based quartz crystal microbalance DNA sensor for detection of Escherichia coli O157:H7. **Biosensors and Bioelectronics**. **21** (7): 1178-1185.
132. Wang, D., Chen, G., Wang, H., Tang, W., Pan, W., Li, N., Liu, F., 2013. A reusable quartz crystal microbalance biosensor for highly specific detection of single-base DNA mutation. **Biosensors and Bioelectronics**, **48**: 276-280.
133. Ngo, H.T., Gandra, N., Fales, A.M., Taylor, S.M., Dinh, T.V., 2016. Sensitive DNA detection and SNP discrimination using ultrabright SERS nanorattles and magnetic beads for malaria diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, **81**: 8-14.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Kübra EROĞLU
Uyruğu: Türkiye (T.C.)
Doğum Tarihi ve Yeri: 12.10.1995 - Kayseri
Medeni Durum: Evli
e-mail: k.ceran18@gmail.com
Yazışma Adresi: Ege mahallesi 779. sokak Aygar Park Vadi Evleri 23/43
Mamak/ANKARA

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği Ana Bilim Dalı	2020
Lisans	Erciyes Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği	2017
Lise	Mustafa Koyuncu Anadolu Öğretmen Lisesi, Kayseri	2013

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2019- Halen	MEB-Abidinpaşa Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi	Öğretmen

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1. Tabkara M., Latifoğlu, F., Ceran K., Cavga S.H., Yaprak M., Altıntop Ç., “Elektrookülografi Tabanlı Yazı Tipi ve Punto Analizi”, Tıp Teknolojileri Kongresi (TıpTekno'17), Trabzon, Türkiye, 12-14 Ekim 2017, ss.320-323.
2. Soylu M.Ç., Köşker F.B., Keskin M., Keser K., Ceran K., “Biyosensör Uygulamaları için 3-Mercaptopropylmethoxysilane Tabanlı Kaplama Yöntemlerinin İncelenmesi”, Tıp Teknolojileri Kongresi (TıpTekno'18), Gazi Magosa, Kıbrıs, 8-10 Kasım 2018, ss.192-195.
3. Soylu M.Ç., Keskin M., Keser K., Ceran K., Köşker F.B., “Kuvars Kristal Mikroterazi ile Genetik Tespitte Yüzey Kaplama Etkisi”, International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology, Ankara, Türkiye, 22-23 Kasım 2018, 163 s.
4. Soylu M.Ç., Keskin M., Keser K., Ceran K., Köşker F.B., Akyol M., Akar A.S., Şahin H., “Basit Bir Biyosensör Tasarımı: Piezo Disk Element”, International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology, Ankara, Türkiye, 22-23 Kasım 2018, 170 s.
5. Ceran K., Köşker F.B., Al-tairi A., Soylu M.Ç., “Evulation of Surface Modifications with Quartz Crystal Microbalance Sensor for Genetic Detection”, European Conference on Science Art and Culture (ECSAC), Ankara, Türkiye, 28-29 Eylül 2019.
6. Al-tairi A., Köşker F.B., Ceran K., Soylu M.Ç., “The Direct Detection of *Escherichia Coli* Bacteria in Simulated Saliva Based on Quartz Crystal Microbalance (QCM) Sensor”, European Conference on Science Art and Culture (ECSAC), Ankara, Türkiye, 28-29 Eylül 2019.