

PAPER DETAILS

TITLE: Gıda Patojenlerinin Tanısında Kullanılan NanoBoyutlu İmmünosensör Tasarımı

AUTHORS: Hande YEGENOGLU

PAGES: 0-0

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/279377>

Gıda Patojenlerinin Tanısında Kullanılan NanoBoyutlu İmmünoşensör Tasarımı

Hande Yeğenoğlu^{1,*}, Belma Aslım², Uğur Tamer³

¹ *Biyoloji Bölümü, Fen Fakültesi, Gazi Üniversitesi, 06500, Beşevler, Ankara, Türkiye,*

² *Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, Gazi Üniversitesi, 06830, Gölbaşı, Ankara, Türkiye*

³ *Analitik Kimya Bölümü, Eczacılık Fakültesi, Gazi Üniversitesi, 06330, Etiler, Ankara, Türkiye*

Özet

Nanoboyutlu malzemelerin günümüzdeki kullanım alanları giderek artmaktadır. Yapılan birçok çalışmada nanopartiküllerin üzerine çeşitli ligantlar bağlanarak hedefe yönelik gıda patojenlerinin yüksek hassasiyetle teşhis ve ayırım çalışmaları sürdürülmektedir. Ligant olarak nanopartiküllerin yüzeylerine, özel antikor modifikasyonları ile immünolojik yöntemler kullanılarak bakterilerin, virüslerin ya da toksinlerin özgün ve doğru bir şekilde seçilimi hedeflenmektedir. Son yıllarda besinlerdeki bakteri patojenlerinin teşhisi için yüksek hassasiyete sahip sensörler üretilmiştir. Gıda yoluyla bulaşan patojenlerin neden olduğu zehirlenmeler genellikle süt ve süt ürünleri, et ve et ürünlerinin tüketilmesi ile olmaktadır. Gıda patojenleri ile kontaminasyon gıda endüstrisinde karşılaşılan en önemli sorun olmakla birlikte bu organizmaların belirlenmesinde kullanılan protokoller uzun ve yüksek maliyetlidir. Yapılan çalışmalarda nanosensörlerin geliştirilerek bu patojenlerin hızlı ve güvenilir bir şekilde algılanıp tanınması hedeflenmiştir. Bakterilerin hızlı bir şekilde tanımlanması, gıda güvenliğinin sağlanmasının yanı sıra, tıbbi teşhis konulmasında, ilaç üretiminde, terör ile mücadelede de oldukça önemli bir yere sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Nanopartikül, immünoşensörler, antikor

Design of Nanoscale Immunosensor for Detection of Food Pathogens

Abstract

Nowadays, the application areas of nano scale materials are increasing. In many studies the targeted diagnosis and distinguishing of food pathogens by attaching various ligands on nanoparticles are continuing to be investigated. Specially modified antibodies and immunologic methods are employed as ligands to select bacteria, viruses and toxins specifically and accurately to be attached to surfaces of nanoparticles. In recent years highly sensitive sensors have been produced for diagnosis of bacterial pathogens in foods. Poisonings caused by pathogens infecting via foods are generally caused by consumption of milk and its products, and meat and meat products. Even though contamination with food pathogens is a frequent and important problem for food industry, the protocols used for diagnosis of these organisms take a long time and are expensive. In conducted studies have targeted development of nanosensors that can diagnose these pathogens quickly and reliably. Diagnosis of bacteria quickly has important applications in not only food safety, but also in medical diagnosis, drug production, and fight against terror.

Keywords: Nanoparticle, immunosensor, antibody

1. Giriş

Nano boyutlu biyosensörler seçicilikleri, hassasiyetleri (tanıma elemanının seçimine bağlıdır) ve kısa sürede sonuç vermeleri nedenleriyle patojenik mikroorganizmaların algılanmasında ve tanımlanmasında özellikle ilgi çekmektedirler. Biyosensörler karmaşık örnek matrislerinin analizinde

* e-mail: handeyegenoglu@gazi.edu.tr

izin verirler. Korunma sağlamak amacıyla kısa sürede patojenlerin varlığı konusunda uyarı veren biyosensörler çevresel örneklerin analizinde de kullanılabilirler [1, 2].

İmmunosensörlerin kullanım potansiyellerini belirleyen faktörler; genel olarak antijen-antikor reaksiyonunun spesifik ve seçici olmasına ve yöntemin yüksek hassasiyetine bağlıdır [3].

2. NanoYapılar ve İmmunosensörler

Nano ölçüde materyallerin kimyasal algılama, biyomedikal ve biyolojik analizlerde kullanılması verimli görülmektedir [4, 5]. Son yıllarda birçok çalışmada yaygın bir şekilde nanomateryaller; farklı yardımcı yapıların, kompozitlerin ve özellikle çeşitli sensörlerin üretilmesinde başarıyla kullanılmıştır [6]. Nano boyutlarda malzeme sentezlenmesi ve karakterizasyonundaki ilerlemeler, 1 ile 100 nanometre arasındaki boyutlarda şekillendirilmiş yapıların bilim adamlarınca kontrollü üretilmesini sağlamaktadır. Bu kontrollü üretimle boyut bağımlı çok nadir özellikler elde edilebilir ve buda birçok yeni teknolojinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir [7]. Nanometre boyutlarındaki inorganik bileşikler diğer maddelere göre daha farklıdır. Bu bileşiklere “nanopartikül” denir. 1970’lerden beri bilim insanları, nanopartikülleri incelemekte ve nanopartiküllerin özelliklerini belirlemeye çalışmaktadır [8]. Nanomalzemelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinde ince ayarlar yapılabilmesi çok düşük analit konsantrasyonlarını algılayabilen nanoyapı bazlı sensörlerin üretilmesine izin vermekte ve bunlar vücut içine girmeden dejeneratif olmayan biyolojik analizler için, kimyasal ayrıştırmalar ve diğer birçok umut veren uygulamalar için kullanılabilirler [6].

Nanopartiküller 100 nm’den küçük ve boyutlarına özgül özelliklere (elektron tutucu etki, geçici mıknatıslık özelliği, yüzey plazmon rezonansı gibi) sahip bileşiklerdir. Boyutları ve bu özellikleri nedeniyle biyolojik sistemlere kolayca entegre olabilirler [9]. Fonksiyon verilebilen bu yapıları; nano parçacıklar, nano çubuklar, nano teller, nano gözenekli yapılar ve çekirdek-kabuk modelleri olarak sınıflandırabiliriz. Bazı nanomateryaller ile çeşitli ligantlar yada biyoaktif gruplar birlikte kullanılarak spesifik analitler için seçici sensörler üretilir. İki veya daha fazla çekirdek-kabuk modeli ve diğer kompozit yapıları nanoyapıların kombinasyonu ile avantajlı, hassasiyeti arttıran ve yanıt süresini azaltan sensör özellikleri elde edilebilir [6]. Özellikle altın ve gümüş partiküllerin boyutlarının kolay kontrol edilebilmesi, uzun süre dayanabilmeleri ve protein, nükleik asit gibi biyolojik makromoleküllerle uyumlulukları nedeniyle etiketleme amaçlı olarak başarı ile kullanılmışlardır [10, 11].

Son yıllarda besinlerdeki bakteri patojenlerinin teşhisi için, yüksek derecede hassasiyete sahip mikroarray tabanlı sensörlerin kullanımı bu süreyi oldukça kısaltmaktadır. Biyosensörlerin çoklu çalışma olanağı sağlaması da bir diğer avantajıdır [12]. İmmunosensörler antijen ve antikor arasındaki etkileşime ve bu etkileşimi algılamak yada ölçmek için ihtiyaç duyulan teknolojiye dayanır. Çok çeşitli immünoanaliz yöntemleri vardır, ve bu teknikler toksikoloji ve patojen algılanması alanlarında dahil geniş olarak kullanılmaktadır [13].

3. Gıda Patojenleri

Yiyeceklerden bulaşan hastalıklar, toplum sağlığı için çok uzun yıllardır tehdit oluşturmuş ve oluşturmaya devam etmektedir. Yalnızca ABD’de 1 yılda 76 milyon hastalık, 325 bin hasta yatırma ve yaklaşık 5 bin ölüm olayı gerçekleşmektedir [14]. Yiyeceklerle bulaşan hastalıklar, *E.coli* ve *Salmonella*

typhimuriumu'da içeren 5 ana patojenden kaynaklanmaktadır. Bu 5 patojenle savaşmak için alınan koruyucu ve tedavi amaçlı önlemlerin yaklaşık maliyeti 2000 yılı için 6.9 milyar dolardır [15]. Endüstrileşmiş ülkelerde gıda kaynaklı hastalıklar arasında özellikle süt ve süt ürünlerinde *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonellaspp.* değişik oranlarda tespit edilmiştir. *Salmonella* süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri ile bulaşan gıda zehirlenmelerine neden olmaktadır. *Salmonella spp.*, *Listeria spp.* ve *S. aureus* gibi patojenlerin kontaminasyonu, gıda endüstrisinde karşılaşılan en önemli sorun olmakla birlikte bu mikroorganizmaların belirlenmesinde kullanılan protokoller uzun ve yüksek maliyetlidir [16].

Listeria monocytogenes; listeriozise ve hamilelerde düşüklere sebep olan, gram pozitif, çubuk şeklinde gıda kaynaklı bir patojendir. Gıdalardaki bu tehlikesinden dolayı *L. monocytogenes* tespiti çok önem taşımaktadır ancak konvansiyonel metodlar iş gücü ve zaman gerektirmektedir ki buda ISO standartlarında 7 gün sürmektedir [17]. Fransa'da gıda zehirlenmelerinde *Salmonella*'dan sonra ikinci olarak en çok salgına bakteriyal patojen *Staphylococcus aureus* neden olmaktadır. Hastalık içindeki bakteri suşlarınca üretilen enterotoksinlerin kirlettiği gıdanın tüketilmesi ile gıda zehirlenmesi ortaya çıkar. Çiğ ve pişmiş et ile süt ve süt ürünleri insanlara patojen bulaşmasının ana yollarıdır [18].

Patojenik bakterilerin hızlı bir şekilde tanılanması ve teşhisi için araçlar geliştirilmektedir. Kültür yöntemleri "altın" standart olarak devam etmekte, nükleik asit bazlı analizler kullanılabilmekte ve üçüncü bir yol olarak immünoanalizler tercih edilmektedir [19, 20]. Ancak immünoanalizler diğer ikisine göre çok daha hızlıdır. Kültür metodları 24-48 saat veya daha fazla sürebilmektedir. Örneğin *M. tuberculosis* gibi bazı bakterilerin teşhisi 7-14 günlük bir süre almaktadır [21]. Bu patojenleri daha esnek ve güvenilir şekilde hedefleyebilmek amacıyla nanopartiküllerin potansiyellerinin araştırılması ve biyosensör sistemlere dahil edilmesi konularında araştırmalar teşvik edilmektedir.

4. Bakteri Tayini İçin İmmünoensör Modelinin Tasarlanması

Nanopartiküllerin optik, elektrokimyasal ve manyetik özellikleri teşhis yöntemlerinin hızını ve başarı oranlarını arttırabilir. Bunların çeşitli konfigürasyonlarda kullanılabilmeleri hasta başı sistemlerin ya da çok amaçlı cihazların geliştirilmelerini sağlayabilir [22]. Ayrıca klinik teşhisi, gıda analizi ve çevre gözlemlemesi gibi çeşitli alanlarda patojen bakterilerin teşhis edilmesi için alternatif enzim ve immünoensörlerin geliştirilmesi konularında ilerlemeler kaydedilmektedir. Enzim, nükleik asit ve antikor gibi kullanılan biyolojik elemana bağlı olarak çeşitli biyosensörler geliştirilebilir [2].

Nano yapıdaki partiküllerin boyları ayarlanabilir özelliktedir. Bu durum biyosensör üretimi için oldukça önemlidir. Hedef biyolojik parçaların yüksek tanılama, yüksek seçicilik ve yüksek hassasiyet ile teşhisi için en uygun biyofonksiyonlu manyetik partikül boyutlarının belirlenmesinde iki basit prensip kullanılabilir. (1) partikül yüzeyinde birden çok ligant bulunabilmesi ve bu sayede çok yönlü etkileşimlere izin verilmesi için partikül boyutu yeterince büyük olmalıdır. (2) Yüksek yüzey alanı-hacim oranları, iyi kolloid stabilite ve yüksek bağlanma için hızlı hareket sağlayacak kadar boyut küçük olmalıdır. Örneğin; proteinlerin ayrılmasında nanopartiküllerin boyutları biyomakromoleküllerin boyutlarına yakın olmalıdır. Hücrelerin yakalanmasında nanopartikül boyutu 8-10 nanometre çapında olmalıdır [23].

Nanosensörler iki geniş kategoriye ayrılabilirler: Hedef analitin doğrudan teşhisi için sensörler ve dolaylı teşhis yapan (etiketlenmiş) sensörler. Doğrudan teşhis sensörleri bir biyospesifik reaksiyonu bir kompleks formasyon ile ortaya çıkan fiziksel değişikliklerin ölçülmesi yoluyla anında ve doğrudan belirler. Dolaylı teşhis biyosensörlerinde, önceden gerçekleşen bir biyokimyasal reaksiyonun ortaya çıkardığı ürünler daha sonra bir sensör tarafından algılanır [2].

4.1. Nanopartiküllerin antikor ile fonksiyonlandırılması

Antikorlarginoproteinlerin immünoglobülin süpergen familyasındadırlar. Bir antikor molekülü “Y” şeklinde bir molekül olup birbirinin aynısı iki polipeptid zincirinden oluşur. Bu iki zincire hafif ve ağır zincirler denir. Disülfid bağlarıyla birleştirilirler. Hafif ve ağır zincirlerdeki iki değişken bölge hedef antijenin tanınmasını ve bağlanmasını sağlar. Bu bölgedeki aminoasit dizisi çok değişkendir, bu sayede antikolar çok sayıda hedef molekülü tanıma gücüne sahip olurlar. Pratik nedenlerle immünanaliz uygulamaları için bazı sınıf antikolar dengelilikleri, bağlanma güçleri ve düşük çapraz reaksiyonları nedeniyle çok tercih edilirler [24].

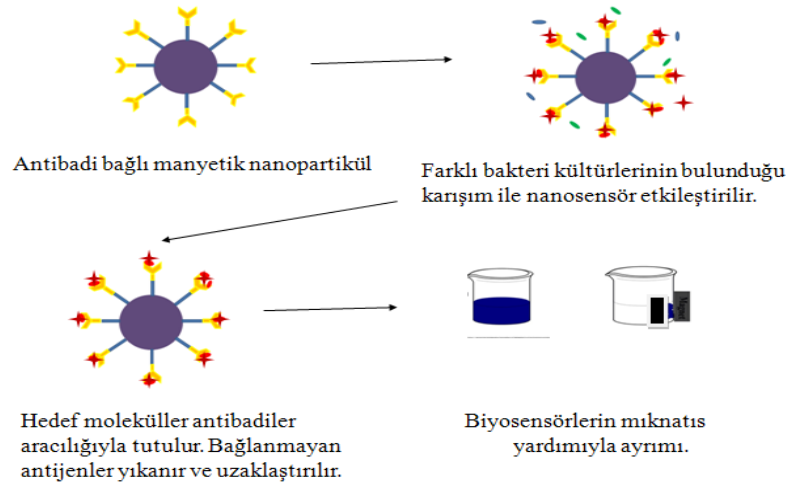
Antikoların kompleks bir karışımında bile özel antijenik bölgelere (epitoplara) yüksek güçle bağlanması ve hedefi tanınması, antijenlerin kalitatif ve kantitatif ölçümleri için kullanılmaktadır [24]. Bir immünosensörün başarıyla tasarlanması için uygun antikorun üretilmesi ve seçilmesi zorunlu olup, poliklonal veya monoklonal antikor seçimi proteinlere ve göreceli maliyete bağlı olarak değişecektir [25]. Bir poliklonal antikor, içeriğinde çeşitli sınıf ve alt sınıflardan antikor karışımları bulunabilir ve birden çok antijeni ya da aynı antijenin üzerinde bulunan birden çok epitopu tanıyabilirler. Aksine bir monoklonal antikor, sadece bir antijen üzerindeki özel bir epitopu tanıır. Poliklonal antikolar bakterileri tanılamak için üretilirler ve bir antijeni karakterize etmek için çeşitli epitoplarla etkileşebilme yetenekleri nedeniyle ilk immünolojistler ve mikrobiyolojistlerce çok kullanılmışlardır. Çoğu ticari analiz yöntemlerinde poliklonal antikolar kullanılır ve bunların analiz formatı çökelme veya enzim-bağlı immünosorbent analizi (ELISA)’dır. Poliklonal antikolar monoklonal antikolar hedef molekülleri yakalama ve konsantre etme bakımından daha üstündür ve immüno-manyetik veya immüno-küre bazı yakalama için kullanılmaktadır [26].

Hedefe özel antikolar *Salmonella*, *Listeria*, *E. coli*, *Clostridium*, *Staphylococci*, *Pseudomonas* gibi bakterilerin hücrelerinin veya toksinlerinin tanınması için geliştirilirler. Hücre tanınması için ısı ile öldürülmüş hücreler [27, 28], hücresel antijenler [29], flagella gibi yüzey antijenleri [30], yüzeyde ifade edilen virülans proteinleri [31], hücre duvarındaki lipopolisakkaritler [32], hücre yüzey antijenleri, antijen olarak monoklonal antikor üretiminde kullanılmıştır. *L. monocytogenes*’ e karşı özel bir monoklonal antikor geliştirmek için antijendeki istenmeyen epitopları bloke edecek bir antikor kullanarak epitop-maskeleymesi başarıyla kullanılmıştır [33].

4.2. İmmünosensör tasarımında manyetik partiküllerin önemi

Sentezlemedeki gelişmelerle, 2-20 nm çapındaki manyetik nanopartiküllerin boyutlarında kesin olarak kontrol yeteneği elde edilmiştir [34]. Antikolarla kaplanan paramanyetik kürecikler bakteriyal hücrelerin kompleks çevre örneklerinden algılanmasında ve konsantresinde kullanılmaktadır (Şekil 1). Paramanyetik kürecikler ancak bir manyetik alan içinde manyetik özellik kazanır ve bu manyetik alan

kaldırıldığında manyetizmalarını kaybederler. Bu özellik sayesinde sıvı süspansiyon içinde manyetik kürecikler hedef antijenlerle serbestçe etkileşebilecek ancak birbirlerine manyetik güçle çekilmeyeceklerdir.



Şekil 1. Antikor kaplanmış paramanyetik küreciklerin kompleks çevre örneği içerisinde hedefe yönelimi ve bunların ortamdaki ayrımı

Nanoteknoloji ve nanobilimin en önemli araştırma alanlarından birisi; çeşitli mikroorganizmaların kontrolü ve tayinidir [35]. Manyetik nanopartiküller analitik biyokimya, sağlık ve biyoteknoloji alanlarında protein, enzim ve diğer biyoaktif ajanların immobilizasyonunda, gittikçe artan, uygulama alanları bulan ve en çok kullanılan materyaldir [36]. Manyetik nanopartiküller, moleküllerin ve spesifik hücrelerin ayırımında, arındırılmasında, tanımlanmasında çeşitli konsantrasyonlarda kullanılabilmektedirler [37].

İmmünomanyetik ayırma ile yiyecek süspansiyonu içeren matrislerden mikroorganizmaların %10-70' i yakalanabildiği için sıklıkla yiyecek süspansiyonlarının bakteri sayısını arttırmak için ön zenginleştirme veya seçme işlemi gereklidir. Yakalanan mikroplar daha sonra besleyici/seçici agar tabakalara yerleştirilerek PCR, immüanaliz yöntemleri, flow stometri, ve kemilüminisans uygulanır [38].

5. İmmünosensörler İle Yapılan Biyoanaliz Çalışmaları

Antijen-antikor reaksiyonları, yani bir hücresel komponent bazlı teknoloji, özel mikroorganizmaları veya hücresel komponentleri algılamak için kullanılabilir. Bu tür sistemler patojen algılanması için yararlıdır ve tanımlama için de kullanılabilir. Bazı durumlarda sistemler, algılanan hücrelerin canlı olup olmadığını ayırt edemeyebilir [39]. ELISA gibi çeşitli patojen algılama kitleri patojen türüne bağlı olarak elde edilebilmektedir.

Çeşitli karmaşıklık düzeylerindeki serolojik analizler bakteri tanılaması için sıklıkla kullanılan testlerdir. Antijen-antikor reaksiyonları; bağlanma, çöktürme, renk değişimi (ELISA gibi), veya immünofloresans şeklinde algılanırlar. Otomatikleştirilmiş immüanaliz yöntemleri belirlenmiş bakterileri tanımlamak için ticari olarak satışa sunulmuş araçlardır [13].

5.1. Biyoanaliz çalışmalarında teşhis edilecek örneğin hazırlanması

Teşhis süreçlerinde özellikle kantitatif ölçümlere göre uygun bir örnek almak zor bir adımdır. Her bir tanılama yönteminin ihtiyaçlarına göre örnek hazırlanması prosedürün önemli bir kısmıdır ve bu

nedenle son algılama örneğine doğru özelleştirilmelidir. Yinede göz önüne alınması gereken bazı temel gereksinimler vardır. Mikrobiyolojik incelemelerde kullanılması planlanan örnek hazırlama süreçlerinin tanınabilecek hedeflerin sayısını artırırken engelleyici ya da hedefle karıştırılabilecek maddelerin sayısını azaltmalıdır. Ayrıca, örnek hazırlanmasının kısa sürede yapılabilmesi için hızlı tanımlama yöntemlerinin kullanılmasındaki avantajları kaybetmemek gereklidir. Büyük miktarlarda, örneğin yüksek hacimli, analizlerle işlenmesini sağlamak için işlenecek örnek boyutu küçültülmelidir. PCR, ELISA, biyoçipler ya da biyosensör bazlı yöntemler mikro ölçek formatında uygulanırlar. Bu nedenle örnek yoğunlaştırılması ihtiyacı açıktır. Filtreleme ya da santrifüj gibi fiziksel yöntemlerin yanı sıra manyetik partikül bazlı ayırıştırma geniş şekilde uygulanarak son 20 yıl içinde çeşitli zorlu problemlerin çözülmesini sağlamıştır [40].

5.2. Biyoanaliz çalışmaları için kullanılan bazı yöntemler

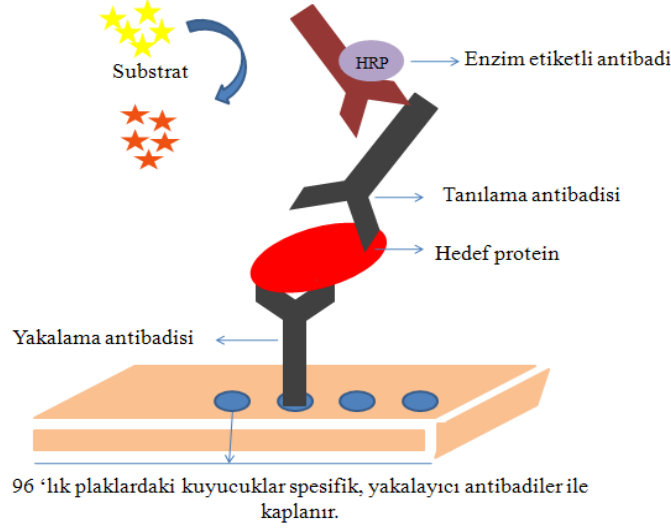
Hassas manyetik immüno analiz yöntemlerin taşıdığı çok büyük bir avantaj, ihtiyaç duyulan örnek ve ajanların hacmidir. Bu, özellikle sahada ve mümkünse taşınabilir bir cihaz içinde hızlı bir patojen testi yapılması gereken durumlar için faydalıdır. Taşınabilir teknolojilerin bulunmasına rağmen düşük maliyetli, hassas, elde taşınabilen cihazlarla biyolojik hedeflerin kantitatif algılanmasında hala zorluklar bulunmaktadır. Yakın zamanda çip-üstünde-laboratuvar, nanomanyetik partiküller, ve kuantum noktaları biyo-algılama için kullanan biyosensörler başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bunun anlamı biyolojik hedeflerin hızlı algılanmasının, gelecekte uygulanabilecek yüksek hassaslıkta immün tanımla birlikte yüksek etkinlikte immünomanyetik ayırım kullanan taşınabilir bir cihaz geliştirilebilir olmasıdır. Sonuç olarak, immünomanyetik patojen algılama teknolojileri özel üretilmiş nanomanyetik partikülleri ve minimal ajan hacimlerini kullanan hızlı ve hassas bir algılama sistemi aracılığıyla maliyet düşürücü bir yol göstermektedir. Bu sistem birden fazla patojenin test edilmesi için ayarlanabilmekte ve bu nedenle tıbbi teşhis ve çevre koruması gibi diğer alanlarda da kullanılabilen bir platform oluşturmaktadır [41].

5.2.1. ELISA yöntemi

ELISA hücresel komponent bazlı bir teknolojidir. Bu teknoloji özel mikroorganizmaları ya da hücresel komponentleri algılamak için bir antijen-antikor reaksiyonunu kullanır [42]. İmmünoanaliz yöntemleri genellikle proteinlerin antijen-antikor etkileşimi ile hedefin varlığının ölçülmesinde kullanılırlar. Algılama sinyali radyoaktif, kolorimetrik veya floresan olabilir. İmmünoanalizlerin hassasiyeti ve seçiciliği kullanılan antikorla ilişkilidir. ELISA tekniği en güvenilir kantitatif algılama metodudur. ELISA antijenin veya antikoru katı yüzey üzerine yerleştirilmesine göre farklı şekillerde uygulanır; 1. Yarışmalı ELISA, 2. Dolaylı ELISA, 3. Sandviç ELISA [24].

ELISA mikrobiyologlar arasında yiyecek, su, ve çevresel veya klinik örneklerde hassas ve kantitatif olarak bakterilerin veya toksinlerinin algılanmasında popüler olarak kullanılmaktadır [19, 43, 44]. ELISA endosporlar, kapsüller, yada endospor oluşturan bakterilerin hücre duvarları komponentlerini algılamak için kullanılabilir. ELISA testlerinde birkaç adım olup, bağlanmamış bileşikler atmak için yıkamayı da içerir. İlk önce bir çoklu plağın katı yüzeyine bir antikor bağlanır. Daha sonra bütün mikroorganizmaları veya endosporları içeren bir antijen süspansiyonu test edilmek üzere antikor kaplanmış yüzeye uygulanır. Antikor antijeni yakalayarak yüzeye bağlar. Bir enzim ile bağlanmış bir

antikor antijene bağlanır ve uygun bileşik eklendiğinde enzim kataliz görevi görerek onu oksitleyerek renkli ya da floresan bir bileşiği spektrofotometre gibi uygun bir cihazla algılanabilecek şekilde üretir (Şekil 2). Tipik ELISA algılama limitleri endospor ve tüm hücre algılaması için 10^4 - 10^6 bakteri aralığındadır [45, 46].



Şekil 2. Tipik bir ELISA testinde uygulanan basamaklar.

5.2.2. RAMAN spektroskopisi tekniği

Raman spektroskopisi, sağlam bir mikroorganizmanın benzersiz spektral işaretlerini üretebilen bir tekniktir. On yıldan fazla süren çalışmalar bu bütün organizma işaretlerinin bakteriler, maya ve sporlar dahil patojenlerin belirlenmesine suş düzeyinde birbirine çok benzeyen mikroorganizmalar üzerinde bile başarıyla kullanılabildiğini göstermiştir. Raman mikroskopi ve yüzeyde kuvvetlendirilmiş Raman dağılımı (SERS) gibi yeni bulunan teknikler sinyalin büyüklüğünü arttırarak tek bir hücre hassasiyetinde Raman işaretlemesinin yapılabilmesini sağlamıştır. Bununla patojenlerin ve toksinlerinin karmaşık örneklerden, etiketsiz, örneğin ön işleme veya kültürü yapılmadan hızla belirlenmesi yapılabilmektedir. İşaret tanıma teknikleri ile birleştirilebilen örnek toplanması, konsantrasyonu ve işlenmesi için yaratıcı yöntemler gözden geçirilmektedir. Ayrıca bakterilerin, sporların ve toksinlerin kompleks örnekler içinde belirlenebilmesi için mikroSERS analizindeki son gelişmeler sunulmakta; canlı veya cansız mikroorganizmaların ayırt edilmesi; mikrobiyal fenotiplerin üreme koşullarının belirlenmesi yakalama biyomolekülleri için seçicilikleri/ilgileri değerlendirilebilmektedir [47].

Yapılan bir çalışmada Temur ve arkadaşları, 2010 yılında yüzeyde genişletilmiş Raman saçılması ile yüksek hassasiyette *Escherichia coli* sayımını gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada küresel ve çubuk şekilli altın nanopartiküller ilk olarak 5.5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DNTB) ile Raman için işaretlenmiş daha sonrada moleküler tanıyıcı ile etkileştirilmiştir. *E. coli*'nin farklı konsantrasyonlarına karşı DTNB'nin 1.333 cm^{-1} simetrik NO_2 sıçramalarının SERS sinyallerlerinin şiddetinden oluşan bir grafik elde edilmiştir [48].

5.2.3. Floresan tanılama yöntemi

Sensörlerde floresan görüntüleme ile bakteri immobilizasyon tespiti, hem patojenlere karşı tanıma spesifikliğinin hemde sensörlerin kantitatif yanıtlarının doğrulanmasına olanak sağlar. Yapılan bir

çalışmada Boujday ve arkadaşları altın bazlı immünosensörleri *Staphylococcus* algılaması için kullanmışlardır. Bu çalışmada floresan tanılama yönteminde konfokal lazer taramalı mikroskop, immünosensörlerde bakteri hücrelerinin tayini için kullanılmıştır. Biyosensörlerdeki immobilize bakteri hücreleri görüntülenmiş ve nükleik asitlerindeki acridine orange kullanılarak floresan işaretleme ile miktar tayini yapılmıştır [18].

6. Sonuç

Son yıllarda kimyasal ve biyokimyasal bileşiklerin algılanmasında kullanılan nano boyutlu malzemelerin ayarlanabilir ve birçok geliştirilebilir özelliğe sahip oldukları ispatlanmıştır. Bu nedenle nano boyutlu malzemelerin biyoalgılamada kullanılmak üzere sentezlenmesi, karakterizasyonu ve geliştirilmesi konuları en önemli araştırma alanlarından biri olmuştur.

Nano boyutlu sensörler ile çeşitli gıda patojenlerinin hızlı ve güvenilir olarak ölçümü mümkündür. Bu sensörler hedef bakteri ile seçici olarak etkileşebildiği için bakteri tanımlamasına kullanılabilir ve ayrıca gelişmiş sensör modelleri tasarlanarak bu nanosensörler tıp, çevre, gıda analizlerindeki kullanılabilir.

Antikorlar biyoalgılama ve tanılama için kullanılan en önemli moleküllerdir. Yüksek oranda kaliteli ve seçici özellikteki antikorlar için analiz yöntemlerinin geliştirilmesi ve bunların sensör olarak kullanılabilmesi konusunda dünyada gittikçe artan bir talep söz konusudur. Ancak bu analiz yöntemleri daha az insan gücü gerektiren, minimum hatalı hassas sonuçlar verebilen daha hızlı ve daha ucuz olan yöntemler olmalıdır. Ayrıca eş zamanlı patojen bakterinin tanımlanabilmesi biyoanalitik immünosensörlerin gıda ve farmasotik endüstrilerde kullanılmasında da çok yararlı olacaktır.

7. Kaynaklar

- [1] Hobson N.S., Tothill I.E., Turner A.P.F., Microbial detection. *Biosens. Bioelectron.*, 11, 455-477, 1996.
- [2] Ivnitiski D., Abdel-Hamid I., Atasanov P., Wilkins E., Biosensors for detection of pathogenic bacteria, *Biosens. Bioelectron.*, 14, 599-624, 1999.
- [3] Alocilja E., Muhammad-Tahir Z., "Label-Free Microbial Biosensors" in principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems, (Ed) Zourob, M., Elwary, S., Turner, A., Springer, New York, USA, 377-413, 2008.
- [4] Shimizu K., Chinzei I., Nishiyama H., Kakimoto S., Sugaya S., Yokoi H., Satsuma, A., Hydrogen sensor based on WO₃ subnano-clusters and Pt co-loaded on ZrO₂. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 134, 618-624, 2008.
- [5] Schultes G., Koppert R., Goettel D., Freitag-Weber O., Probst A.C., Werner U., New perspectives for pressure and force sensors thin films combining high gauge factor and low TCR. *Smart Sensors Actuators and MEMS*, 4, 7790-7797, 2009.
- [6] Asefa T., Duncan C.T., Krishna K.S., Recent advances in nanostructured chemosensors and biosensors. *Analyst*, 134, 1980-1990, 2009.
- [7] Marquis B.J., Love S.A., Braun K.L., Haynes C.L., Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. *Analyst*, 134, 425-439, 2009.

- [8] Portakal O., Bioassays and nanoparticles. *Turk.J. Biochem.*, 33, 35-38, 2008.
- [9] Handley D.A., Colloidal gold, principles, methods and applications. Academic Press, (Ed) Hayat, M.A., Academic Press, San Diego, 1989.
- [10] Daniel M., Astruc D., Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev.*, 104, 293–346, 2004.
- [11] Jain K.K., Nanodiagnostics: application of nanotechnology in molecular diagnostics. *Expert. Rev. Mol. Diagn.*, 3, 153–161, 2003.
- [12] Patel P.D., Overview of affinity biosensors in food analysis. *J. AOAC.*, 89, 805-818, 2006.
- [13] Yousef A.E., “Detection of bacterial pathogens in different matrices: Current practices and challenges ” in principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems, (Ed) Zourob, M., Elwary, S. and Turner, A., Springer, New York, USA, 31-48, 2008.
- [14] Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe, R.V. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 5, 607–625, 1999.
- [15] Wang C., Irudayaraj J., Gold nanorod probes for the detection of multiple pathogens. *Birk and NCN Publications*, 12, 2204-2208, 2008.
- [16] Suo Z., Yang X., Avci R., Deliorman M., Rughelmore P., Pascaul D.W., Idzerda Y: Antibody selection for immobilizing living bacteria. *Anal. Chem.*, 60, 7571-7578, 2009.
- [17] ISO. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogens*. Part 1, 11290-11291, 1996
- [18] Boujday S., Briandet R., Salmain M., Herry J.M., Marnet P.G., Gautier, M., Pradier, C.M., Detection of pathogenic *Staphylococcus aureus* bacteria by gold based immunosensors. *Microchim. Acta*, 163, 203-209, 2008.
- [19] Gracias K.S., McKillip J.L., A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Can. J. Microbiol.*, 50, 883–890, 2004.
- [20] (Ed) Amass, A. K., Detection of significant bacterial pathogens and toxins of interest. *Advances in Homeland Security*, Purdue University Press, 1, 109-149, 2006.
- [21] Cheng V.C.C., Yew W.W., Yuen K.Y., Molecular diagnostics in tuberculosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 24, 711–720, 2005.
- [22] Sanvicens N., Pastells C., Pascual N., Marco M.P., Nanoparticle-based biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Trac-Trend Anal. Chem.*, 28, 1243-1252, 2009.
- [23] Gu H., Xu K., Xu C., Xu B., Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection. *Chem. Commun. (Camb)*, 7, 941-949, 2006.
- [24] Banada P.P., Bhunia A.K. “Antibodies and immunoassays for detection of bacterial pathogens” in Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems, (Ed) Zourob, M., Elwary, S. and Turner, A., Springer, New York, USA, 567-602, 2008.
- [25] Liddell E., “Antibodies” in the immunoassay handbook, (Ed) Wild, D., 3ed., Elsevier, 2005.
- [26] Kovacs-Nolan J., Marshall P., Mine, Y., Advances in the value of egg and egg components for human health. *J. Agric. Food. Chem.*, 53, 8421–8431, 2005.

- [27] Bhunia, A.K., Antibodies to *Listeria monocytogenes*. *Crit. Rev.Microbiol.*, 23, 77–107, 1997.
- [28] WarschkauH., Kiderlen, A.F., A monoclonal antibody directed against the murine macrophage surface molecule F4/80 modulates natural immune response to *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.*, 163,3409-3416, 1999.
- [29] Zhao Z.J.,Liu, X.M., Preparation of monoclonal antibody and development of enzyme-linked immunosorbent assay specific for *Escherichia coli* O157 in foods. *Biomed. Environ.Sci.*, 18, 254–259, 2005.
- [30] Kim S.H., Park M.K., Kim J.Y., Chuong P.D., Lee Y.S., Yoon B.S., Hwang K.K., Lim Y.K., Development of a sandwich ELISA for the detection of *Listeria* spp. using specific flagella antibodies.*J. Vet. Sci.*, 6, 41–602005.
- [31] Hearty S., Leonard P., Quinn J., O’Kennedy R.,Production, characterisation and potential application of a novel monoclonal antibody for rapid identification of virulent *Listeria monocytogenes*. *J.Microbiol.Methods*, 66, 294–312, 2006.
- [32] Thirumalapura N.R., Morton R.J., RamachandranA.,Malayer J.R.,Lipopolysaccharide microarrays for the detection of antibodies. *J.Immunol. Methods* , 298, 73–81, 2005
- [33] Bhunia A.K., Johnson M.G.,Monoclonal antibody specific for *Listeria monocytogenes* associated with 66-kDa cell surface antigen.*Appl. Environ.Microbiol.*,58, 1924–1929, 1992.
- [34] Sun S., Zeng H.,Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 8204, 2002.
- [35] Luo P.G., Stutzenberger F.J.,Nanotechnology in the detection and control of microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.*, 63, 145-181, 2008.
- [36] Yang H.H., Zhang S.Q., Chen X.L., Zhuang Z.X., Xu J.G., Wang X.R.,Magnetite-containing spherical silica nanoparticles for biocatalysis and bioseparations,*Anal. Chem.*, 76, 1316-1321, 2004.
- [37] Hnaiein M., Hassen W.M., Abdelghani A., Fournier-Wirth C., Coste J., Bessueille., F., Leonard D., Jaffezic-Renault N.A.,A conductometric immunosensor based on functionalized magnetite nanoparticles for *E. coli* detection, *Electrochem.Comm.*, 10, 1152-1154, 2008.
- [38] Yang H., Qu L., Wimbrow A.N., Jiang X.,Sun Y.,Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by nanoparticle-based immunomagnetic separation and real-time PCR, *Int. J. Food Microbiol*,118,132-138, 2007.
- [39] Pharmeuropa. In,Alternative methods for control of microbiological quality. 16, 555–565, 2004.
- [40] Kretzer J.W., Biebl M., Miller S., “Sample preparation: An essential prerequisite for high quality Bacteria detection” in Principles ofbacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems, (Ed) Zourob, M., Elwary, S. andTurner,A., Springer, New York, USA, 15-30, 2008.
- [41] Haik Y., Sawafta R., Ciubotani I., Quablan A., Tan E.L., Ong K.G., “Magnetic techniques for rapid detection of pathogens” in Principles ofbacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems, (Ed) Zourob, M., Elwary, S. andTurner,A., Springer, New York, USA, 415-458, 2008.

- [42] Moldenhauer J., Yvon P., “Environmental monitoring using Scan RDI Polym’air” in, *Environmental Monitoring: A Comprehensive Handbook* (Ed) Moldenhauer, J., 2, 249-260, 2005.
- [43] Yeh K.S., Tsai C.E., Chen S.P., Liao C.W., Comparison between VIDAS automatic enzyme-linked fluorescent immunoassay and culture method for *Salmonella* recovery from pork carcass sponge samples. *J. Food Prot.*, 65, 1656–1659, 2002.
- [44] Haggerty T.D., Perry S., Sanchez L., Perez-Perez G., Parsonnet J., Significance of transiently positive enzyme linked immunosorbent assay results in detection of *helicobacter pylori* in stool samples from children. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 2220–2223, 2005.
- [45] Speight S.E., Hallis B.A., Bennett A.M., Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of airborne microorganisms used in biotechnology. *J. Aerosol Sci*, 28, 483–492, 1997.
- [46] Rowe C.A., Tender L.M., Feldstein M.J., Array biosensor for simultaneous identification of bacterial, viral, and protein analytes. *Anal. Chem.*, 71, 3846–3852, 1999.
- [47] Grow A.E., “Label free fingerprinting of pathogens by raman spectroscopy techniques” in *Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems*, (Ed) Zourob, M., Elwary, S. and Turner, A., Springer, New York, USA, 525-564, 2008.
- [48] Temur E., Boyacı İ.H., Tamer U., Ünsal H., Aydoğan N., A highly sensitive detection platform based on surface-enhanced Raman scattering for *Escherichia coli* enumeration. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397, 1595-1604, 2010.