

Veteriner Mikrobiyolojide Hasta/Sürü Yanında Teşhis Yöntemleri

Bengi AKKOYUNLU^{1,a,*}, Barış SAREYYÜPOĞLU^{2,b}

¹Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.

²Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Dışkapı, Ankara, Türkiye.

^aORCID: 0000-0002-0953-3802, ORCID: ^b0000-0002-2212-2610

Geliş Tarihi: 01.04.2021

Kabul Tarihi: 10.06.2021

Özet: Hasta/sürü yanında teşhis yöntemleri, bir hastalığın teşhisinin saha koşullarında hızlı ve doğru bir şekilde yapılmasını amaçlayan yöntemler olarak ifade edilebilir. Geleneksel tanı yöntemleri, yüksek duyarlılık ve özgülüğe sahip olmakla birlikte, uzun tanı süreleri ile iş gücü gereksinimleri ve yüksek maliyetleri nedeniyle, alternatif yöntem arayışlarının doğmasına neden olmuştur. Veteriner Hekimlikte, hayvanlar yoğunlukla merkeze uzak bir konumda bulunduğu için iyi tasarlanmış hasta/sürü yanı teşhis yöntemleri sahada uygulanabilirlik açısından avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, olası bir salgın durumunda hızlı tanının çok kritik bir önemi bulunmaktadır. Bu derlemede hasta/sürü yanında teşhise olanak sağlayan tanı yöntemlerinden ve teknolojilerinden bahsedilmiş, bu yöntemlerin kullanımına ilişkin örnekler sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: Hasta/sürü yanında teşhis, Hızlı tanı, Tanı yöntemleri, Veteriner Mikrobiyoloji.

Point-of-Care Diagnostic Methods in Veterinary Microbiology

Abstract: Point of care testing methods can be expressed as methods to diagnose the disease quickly and accurately in field conditions. Although traditional diagnostic methods have high sensitivity and specificity, they have led to searching for alternative methods due to their long diagnosis times, labor requirements, and high costs. In veterinary medicine, well-designed patient/herd side diagnosis methods provide advantages in terms of applicability in the field since the animals are mainly located far from the center. In addition, rapid diagnosis is of critical importance in the event of a possible epidemic. In this review, diagnostic methods and technologies that allow diagnosis besides the patient/herd are mentioned, and examples of these methods are presented.

Keywords: Diagnostic methods, Point of care testing, Rapid diagnosis, Veterinary microbiology.

Giriş

Hasta/sürü yanı testleri, sorumlu hekime kolaylıkla ulaştırılabilen, hastanın bulunduğu yerde veya hasta yanında, klinik laboratuvar dışında ve kalıcı bir üniteye ihtiyaç duyulmadan, taşınabilir cihazlar kullanılarak gerçekleştirilen tanı testleri olarak tanımlanır (Lamb ve ark., 1995). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre ideal hasta başı testleri; ekonomik, duyarlı, spesifik, kullanıcı dostu (düşük teknik bilgi ve basit birkaç adımlık prosedür ile kullanılabilen), hızlı, özel ekipman gereksinimi bulunmayan ve son kullanıcı için kolay ulaşılabilir testler olmalıdır (Kettler ve ark., 2004).

Hasta/sürü yanında teşhis yöntemleri, laboratuvar tabanlı geleneksel yöntemlere göre büyük avantajlara sahip, umut vaat eden tanı araçlarıdır. Hasta/sürü yanı tanı yöntemlerinin en önemli avantajlarından biri zaman tasarrufu sağlamasıdır. Numunenin toplanması ile tedavi başlangıcı arasındaki süreyi kısaltır. Ayrıca karantina önlemleri gerektiren bulaşıcı hastalıkların hızlı teşhisi ile hastalığın yayılmasını önlemek için gereken önlemlerin en kısa sürede alınabilmesine olanak sağlar. Düşük maliyeti sayesinde özellikle gelişmekte olan ve düşük bütçeye sahip ülkeler için

önemli bir avantaj sağlar. Bu yöntemler veteriner hekimlik alanında kolaylıkla uygulanabilir yapıdadır. Çünkü teste tabi tutulacak hayvanlar tanı laboratuvarının bulunduğu merkeze uzak bir konumda bulunabilir. Numunenin toplanması, laboratuvara gönderilmesi, testin yapılması, sonucun alınması ve gerektiğinde hayvanların tekrar araya toplanması büyük zorluk oluşturabilmektedir (Busin ve ark., 2016).

Bu derleme ile laboratuvar tabanlı geleneksel tanı testlerinin sahip olduğu dezavantajları ortadan kaldırma potansiyeline sahip ve enfeksiyöz hastalıkların tanısının hasta/sürü yanında, hızlı, güvenilir ve daha düşük maliyetle yapılabilmesine olanak sağlayan tanı teknolojilerinin ve bu teknolojilerin güncel kullanımına ilişkin örneklerin sunulması amaçlanmaktadır.

Test Yöntem ve Teknolojileri

1. Dipstik ve Strip Testler: Bu testler immünojenik işaretleme prensibini kullanmaktadır. Özel sıvıların analizi için pedli kâğıt striplerden

yapılmışlardır. Numune bu striplerle muamele edildikten sonra, sonuç renk kodlu grafikler ile karşılaştırılır ve bu şekilde analitin yarı kantitatif tanısı sağlanır (Busin ve ark., 2016).

Jacob ve ark. (2016) tarafından köpeklerde üriner sistem enfeksiyonunun tespiti için hızlı immün test stripleri geliştirilmiştir. Köpeklerden alınan idrar örnekleri ile stripler muamele edildikten sonra stripler üzerinde oluşan bantlar ve renk yoğunlukları değerlendirilmiştir. Kontrol bandı dışındaki bantların oluşumu, idrardaki bakterinin tipine göre değişmektedir. Birinci bandın oluşumu (ikinci bant ile birlikte veya onsuz), üriner sistem enfeksiyonunun gram negatif bir bakteriden kaynaklandığını gösterir. Yalnızca ikinci bandın oluşumu ise enfeksiyonun, gram tipi belli olmayan bir bakteriden kaynaklandığını gösterir. Geleneksel bakteriyel kültür sonuçları ile bu hızlı test çıktıları arasında büyük uyum görülmüştür.

2. İmmünokromatografik Kart Testler (Yatay Akışlı İmmüno Testler, Lateral Flow Immunoassay): Numune içindeki hedef antijeni, antikor veya çoğaltılmış gen ürününü, pahalı ve amaca özel bir ekipman kullanmaksızın tarayan basit bir cihazdır (Sahoo ve ark., 2016b). Çoğu immünokromatografik kart testi, kalitatif veya yarı-kantitatifdir (Bahadır ve Sezgintürk, 2016). İmmünokromatografik kart testleriyle idrar, serum, plazma ve tam kan gibi çeşitli biyolojik örnekler taranabilir. Hayvan hastalıkları, patojenler ve toksinler bu test ile tespit edilebilir (Koczula ve Gallotta, 2016).

Analiz edilecek sıvı örnek, kapillar güç ile kartın çeşitli alanlarına doğru hareket eder. İmmünokromatografik kart testi; örnek altlığı, konjugat altlığı, tarama alanı ve emici altlık bölümlerinden oluşmaktadır. Örnek altlığı numunenin uygulandığı alandır. Konjugat altlığında; boyalar, floresan partiküller, altın nano partiküller, lateks topları vb. ile işaretlenmiş hedef analite spesifik antijen veya antikorlar bulunur. Tarama alanında, spesifik biyolojik bileşenler (genellikle antikor ve antijenler) nitroselüloz membranda bulunan çizgiler üzerinde sabitlenmiştir. Bunların rolü, işaretli antikor/antijene bağlı analit ile reaksiyon oluşturmaktır (Koczula ve Gallotta, 2016). Test çizgisinin oluşması, hedef antijen veya antikoron varlığına veya yokluğuna göre değişir. Kontrol çizgisi, kart boyunca sıvı akışının doğru olup olmadığını gösterir. Kontrol çizgisi üzerinde, ikincil antikorlar veya protein G/A gibi spesifik yakalama molekülleri sabitlenmiştir. Hedef analit test edilen örnek içinde olsa da olmasa da kontrol çizgisinin oluşması gerekir. Emici altlık da fazla sıvıyı absorbe eder (Sahoo ve ark., 2016b). Sonucun okunması, farklı yoğunluklarda oluşan çizgiler incelenerek yapılır. Bu çıplak gözle veya bir okuyucu vasıtasıyla yapılabilir (Koczula ve Gallotta, 2016).

İmmünokromatografik kart testleri, kullandığı tanıma elementlerine göre; antikor tabanlı ve nükleik asit tabanlı immünokromatografik kart testleri olmak üzere ikiye ayrılır (Bahadır ve Sezgintürk, 2016).

3. Mikro Akışkan Teknolojileri: Son zamanlarda teşhis alanında en umut verici teknolojilerden biri, mikro akışkan (microfluidics) teknolojisidir. Mikro akışkan teknolojinin ana avantajları arasında, taşınabilir olmaları ve reaktiflerin düşük tüketimi sayılabilir. Ayrıca çok düşük bir numune hacminin kullanılması ve dağılıma mesafesinin kısa olması analiz süresini belirgin bir şekilde azaltır (Rattle ve ark., 2013). Test için gerekli bütün adımların tek araçta performans gösterebilmesi de belirgin bir avantaj sağlar. Numunenin ön hazırlığı, analiz, sinyal çoğaltılması ve taranması aynı araçta gerçekleştirilebilir (Chin ve ark., 2007). Ek olarak, mikro akışkan teknolojinin mobil okuyucular ve elektronik bilgi saklama sistemleri ile kombine edilebilmesi hasta/sürü yanı testlerinin gelecek dönem uygulamaları için güzel bir yaklaşım olabilir (Martinez ve ark., 2008).

Mikro total analiz sistemleri ve mikro akışkan kâğıt tabanlı cihazlar olmak üzere iki ana tip mikro akışkan sistem kullanılmaktadır.

Mikro Total Analiz Sistemleri (μ TAS): Bu sistemlerden biri, çip üzerinde laboratuvar (lab on a chip, LOC) olarak adlandırılan sistemdir. Numune hazırlanması ve tarama gibi bir dizi işlevselliği mikro ölçekte bir çip üzerinde bir araya getirebilmektedir (Hardt ve Schönfeld, 2007). Bir diğer sistem ise disk üzerinde laboratuvar (lab on a disc, LOAD) olarak adlandırılan sistemdir. Numune hazırlama, çözeltinin yer değiştirmesi, reaktif karıştırma, ayırma ve taramayı tek bir cihazda birleştiren bir tür santrifüj mikro akışkandır (Wang ve ark., 2021).

Mikro Akışkan Kâğıt Tabanlı Analitik Cihazlar (μ PDAS): Polidimetilsiloksan'dan yapılan geleneksel mikro akışkan cihazların oldukça komplike olmaları ve geliştirmekte olan ülkelerde yaygın kullanıma uygun olamayacak kadar pahalı olmaları nedeniyle süreç içerisinde kâğıt tabanlı mikro akışkan cihazlar gündeme gelmiştir (Martinez, 2011; Sia ve Whitesides, 2003). Yeni nesil basit mikro akışkan cihazların yapımı için kâğıdın seçilmesinin nedeni, uygun fiyatlı bir materyal olması ve ek bir güç kaynağına gereksinim duymadan, kapillar güç ile sıvıyı cihaz içinde hareket ettirme özelliğine sahip olmasıdır (Martinez, 2011).

4. Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri: PCR en yaygın kullanılan nükleik asit amplifikasyon tekniğidir (Belák ve Ballagi-Pordány, 1993; Mullis ve Faloona, 1987; Nakajima ve ark., 1992; Sareyyupoglu ve Akan, 2006). Ancak termal döngü cihazı ve uzmanlaşmış personel gereksinimi, rutin tanı laboratuvarlarında büyük bir alan kaplaması

gibi sınırlayıcı faktörler; izotermal nükleik asit amplifikasyonu olarak bilinen yeni bir moleküler-biyolojik tekniğin geliştirilmesini teşvik etmiştir. PCR ve izotermal amplifikasyon arasındaki en büyük fark, reaksiyon ısı gereksinimleri arasındaki farktır. PCR'da belirli sıcaklıklarda termal döngü adımları gerekirken, tüm izotermal amplifikasyon reaksiyonu için tek bir optimal reaksiyon ısı yeterlidir. Bu sayede pahalı ekipman gerekmeksizin uygun reaksiyon koşulları sağlanabilmektedir (Chang ve ark., 2012).

Nükleik asit amplifikasyon tekniklerini mikro akışkan teknoloji ile birleştirmek, moleküllerin düşük konsantrasyonlarını taramak için hızlı, güvenilir ve ekonomik olmalarından dolayı, yeni hasta/sürü yan test teknolojilerinin gelişimi açısından bir fırsat sunmaktadır (Busin ve ark., 2016).

a) İzotermal Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri: Mevcut teknikler; duyarlılık ve özgüllük açısından farklılıklar göstermektedir (Chang ve ark., 2012). Bu tekniklerden biri olan İlimiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon (LAMP) ile ilgili çalışmaların sayısı oldukça fazladır ve diğer birçok izotermal amplifikasyon yönteminin aksine halihazırda çok sayıda ticari test kiti bulunmaktadır (Craw ve Balachandran, 2012; Karthik ve ark., 2014; Kawai ve ark., 2017; Lalande ve ark., 2011; Pal ve ark., 2018; Yamazaki ve ark., 2009). Çoklu Çapraz Yer Değiştirme Amplifikasyonu (MCDA) ise yeni geliştirilen bir diğer izotermal amplifikasyon tekniğidir ve LAMP ile karşılaştırıldığında umut vaat edici sonuçlar elde edilmiştir (Wang ve ark., 2015). Bu nedenlerden dolayı bu iki izotermal amplifikasyon yönteminden özel olarak bahsedilecektir.

İlimiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon (Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP): PCR teknolojisinde, reaksiyon alternatif sıcaklık aşamaları veya döngüleri dizisiyle gerçekleştirilir. Bunun aksine izotermal amplifikasyon sabit bir sıcaklıkta gerçekleştirilir ve termal döngü cihazı gerektirmez. Ayrıca diğer DNA çoğaltma metotları ile karşılaştırıldığında çok düşük miktardaki DNA'yı tespit eder (Sahoo ve ark., 2016a).

Bu teknikte, hedef sekans 60-65 °C arasında sabit bir sıcaklıkta, 2 veya 3 set primer ve yüksek sarmal yer değiştirme aktivitesine ve çoğaltma aktivitesine sahip polimeraz kullanılarak çoğaltılır. Tipik olarak 4 farklı primer, hedef DNA'daki 6 farklı bölgeyi belirlemek için kullanılır, bu durum spesifikiteye katkıda bulunur (Notomi ve ark., 2000). Ek ilmiğe primer (loop primer) çiftlerinin kullanılması reaksiyonu daha da hızlandırır (Nagamine ve ark., 2002). Sonucun değerlendirilmesinde ise farklı teknikler kullanılabilir. Çoğaltılan ürünler, agar jel elektroforezine tabi tutulabilir (Sahoo ve ark.,

2016a). Bulanıklık (türbidite) yoluyla değerlendirilebilir. Bu bulanıklık, amplifikasyon yan ürünü olarak magnezyum pirofosfat miktarının artması ve solüsyonda çökmesi nedeniyle oluşur (Mori ve ark., 2001). Bu durum, özellikle büyük reaksiyon hacimlerinde, kolay bir şekilde çıplak gözle görülebilir. Ayrıca türbitemetreler ile de ölçülebilir. "SYBR Green" gibi DNA bağlayıcı floresan boyalar veya Kalsein ve Hidroksinaftol Mavisi gibi kolorimetrik indikatörler kullanılmasıyla oluşan gözle görülebilir renk değişimi, çıplak gözle pahalı ekipman gerektirmeden değerlendirilebilir (Sahoo ve ark., 2016a; Zhang ve ark., 2014). Çoğaltılan ürünlerin değerlendirilmesi için LAMP tekniğinin, immunokromatografik kart testleri, mikro akışkan cihazlar ve elektrokimyasal biyosensörler ile de birleştirilmesi mümkündür. (Kawai ve ark., 2017; Najian ve ark., 2016; Wang ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2014). LAMP, kısmen işlem görmüş ve/veya görmemiş örneklerden hedef DNA'yı çoğaltma avantajına sahiptir (Sahoo ve ark., 2016a).

Çoklu Çapraz Yer Değiştirme Amplifikasyonu (Multiple Cross Displacement Amplification, MCDA): Sarmal yer değiştirme polimerizasyon reaksiyonunu temel alan bir izotermal amplifikasyon stratejisidir. Bu teknikte, hedef sekansta 10 ayrı bölgeyi tanıyan 10 adet primerden oluşan bir set kullanılmaktadır. Reaksiyon prosesinde kullanılan enzim, sarmal yer değiştirme yeteneğine sahip bir polimerazdır. Amplifikasyon reaksiyonu 61-65 °C arasında sabit bir sıcaklıkta gerçekleştirilmektedir. Amplifiye ürünler, LAMP tekniğinde bahsedilen yöntemlerle tespit edilebilir. Floresan tarama reaktiflerinin kullanıldığı kolorimetrik metotlar ile 40 dk içerisinde pozitif amplifikasyonun görsel ayrımının yapılabildiği ifade edilmektedir (Wang ve ark., 2015).

b) Minyatürize Edilmiş PCR Cihazları: Mikro akışkanların, mikro elektro-mekanik sistemler ile kombinasyon halinde ortaya çıkışı, PCR prosesinin bir çipte minyatürize edilmiş şekilde yapılabilmesine olanak sağlamıştır. Fakat, geleneksel PCR süreçlerinde, termal döngüyü gerçekleştirmek için hassas ısıtma ve soğutma kontrol modüllerinin zorunluluğu nedeniyle, minyatürize edilmiş PCR sistemlerinde, termal özellikleri optimize etmek için daha özel bir tasarım gerekliliği doğmuş ve bu durum maliyeti artırmıştır.

Kantitatif PCR (qPCR)'in ortaya çıkışı ile elektroforez veya hibridizasyon adımları olmaksızın tek bir adımda nükleik asit amplifikasyonu ve kantitatif gerçek zamanlı tarama gerçekleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra, hızlı nükleik asit amplifikasyon testini gerçekleştirmek amacıyla geleneksel PCR süreçlerinin basitleştirilmesi ve kısaltılması için, çözülmesi gereken iki temel zorluk ortaya çıkmıştır. Bunlar, geleneksel PCR sistemlerinin

ısıtma/soğutma oranlarının saniyede yalnızca birkaç santigrat derece olması ve tüm PCR prosesinin tamamlanması için 1-2 saatlik bir süre gerekmesidir. Bu durum, hızlı tanı için oldukça yavaştır ve iyileştirilmesi gerekmektedir. İyileştirme için numune hacminin azaltılması seçeneği, düşük maliyeti ve artan ısıtma/soğutma oranları nedeniyle en cazip seçenektir ve mikro akışkanların PCR ile kombinasyonunda çok küçük hacimli numunelerin işlenebilmesi olanağını sağlar (Wang ve ark., 2021).

5. Biyosensörler: Biyolojik, kimyasal veya biyokimyasal bir sinyali, ölçülebilir ve işlenebilir bir elektriksel sinyale dönüştüren kimyasal veya fiziksel dönüştürücü ile bağlanmış biyolojik algılama elemanı içeren cihazlar biyosensör olarak adlandırılır (Li, 2006). Enzimler, antikorlar, hücreler ve nükleik asitler temel biyolojik algılama elemanları olarak kullanılmaktadır (Leva-Bueno ve ark., 2020). Biyosensörlerin mikro akışkan cihazlar, nükleik asit amplifikasyon teknikleri ve yapay zekâ teknikleri ile kusursuz entegrasyon potansiyeli sayesinde, iş gücü gereksinimini sınırlayan ve “akıllı” teşhise olanak sağlayan hasta/sürü yanı teşhis yöntemlerinin gelişimindeki ilerlemenin hızlanacağı görülmektedir (Wang ve ark., 2021).

a) Optik Biyosensörler: Optik biyosensörün yüzeyine bağlanan hedef analit, sensör yüzeyinin absorpsiyon, lüminesans, floresans gibi optik özelliklerini değiştirerek bir optik sinyal oluşturur ve bu sinyal değerlendirilerek hedef analitin varlığı veya yokluğu saptanır (Ahmed ve ark., 2014). Optik biyosensörler, floresan temelli (indirekt) ve etiketleme gerektirmeyen (direkt) olarak iki kategoriye ayrılır (Ahmed ve ark., 2014; Li, 2006). Floresan temelli optik biyosensörler, hedef moleküller ya da biyolojik algılama moleküllerinin, floresan etiketlerle işaretlenmesi prensibini kullanır. Etiketleme gerektirmeyen optik biyosensörlerde ise hedef moleküller, floresan etiketlerle işaretlenmez veya üzerinde değişiklik yapılmaz ve doğal formlarında tespit edilir (Fan ve ark., 2008).

Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR) Tabanlı Biyosensörler: Etiketleme gerektirmeyen optik bir tarama yöntemidir. Bir yüzey plazmon dalgası aracılığıyla, metal yüzeydeki moleküller etkileşimlerin neden olduğu ışığın kırılma indisindeki değişiklikleri ölçer. Bu biyosensörler, gerçek zamanlı tarama, laboratuvarından bağımsız olma, düşük maliyet, yüksek yeniden kullanım performansı ve tekrarlanabilirlik özellikleri sayesinde hasta/sürü yanı teşhis uygulamaları için en güvenilir tespit yöntemlerinden biri haline gelmiştir. Bununla birlikte sıvı numune hacimlerinin ve güç tüketim miktarının hala fazla olması nedeniyle iyileştirilmesi gereken tarafları bulunmaktadır (Wang ve ark., 2021).

Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Saçılması Tabanlı Biyosensörler (Surfaced Enhanced Raman Scattering, SERS): Raman saçılması, saçılan fotonun frekansının gelen fotonun frekansından farklı olduğu durumlarda, fotonların inelastik saçılması olgusudur. Raman saçılmasının yüzey zenginleştirilmesi, biyolojik parçaların metal nano partiküllerin yüzeyinde hareketsiz hale getirilmesiyle elde edilebilir ve bu olgu, yüzey zenginleştirilmiş Raman saçılması olarak bilinir. Bu teknik, Raman saçılması spektrumlarındaki değişimi izleyerek biyolojik etkileşimleri tanımlamak için kullanılır (Chatterjee ve ark., 2019). Raman saçılması spektrumlarındaki bu değişim büyük ölçüde bakteriyel hücre duvarına (peptidoglikan, lipopolisakaritler, membran proteinleri vb.) ve hücre içi küçük molekül salgılarına bağlanmaktadır (Galvan ve Yu, 2018). Raman saçılması tabanlı optik biyosensörler, hedef moleküllerin işaretlenmemesi yönüyle, etiketleme gerektirmeyen optik tarama yöntemlerine benzerken, Raman saçılmasının algılama için kullanılması yönüyle floresan tabanlı optik biyosensörlere benzemektedir (Fan ve ark., 2008).

b) Elektrokimyasal Biyosensörler: Enzimatik reaksiyon sonucunda veya antikor-antijen etkileşimi nedeniyle bir tampon çözeltisinin elektriksel özelliklerinde oluşan değişim çeşitli elektrokimyasal biyosensörler ile ölçülebilmektedir (Bahadır ve Sezgintürk, 2014).

Amperometrik Biyosensörler: Elektro aktif biyolojik bir elementin oksidasyonundan veya redüksiyonundan kaynaklanan akımın ölçülmesini temel alan bağımsız cihazlardır (Sadeghi, 2013).

Potansiyometrik Biyosensörler: Elektrokimyasal potansiyel dönüştürücüye bağlı bir biyolojik algılama elemanı içeren cihazlar olarak tanımlanabilir (Sadeghi, 2013). Bu sensörlerde iyon-seçici elektrot kullanılır. Analitin, çalışan elektrot tarafından tanınması sonucu oluşan potansiyel değişimini ölçerler (Ahmed ve ark., 2014).

İmpedimetrik Biyosensörler: DNA, antikor, aptamer ve çeşitli sentetik afinite proteinleri gibi analite spesifik olarak bağlanan biyolojik algılayıcılar kullanılır (Leva- Bueno ve ark., 2020). Spesifik hedef molekülleri, medyum içerisinde biyolojik algılayıcılar tarafından yakalandığında, moleküler etkileşimler, sensörün impedansında değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler impedimetrik parametreler izlenerek tespit edilir, ölçülür ve analiz edilir (Etayash ve ark., 2014).

c) Manyetik Biyosensörler: Mikro akışkan kanallar içindeki manyetik mikro ve nano partiküllerin magnetodirenç etkisi kullanılarak aranan bakterinin tespit edilmesi temeline dayanan bu biyosensörler, hassasiyet ve boyut bağlamında gelecek vaat etmektedir. Manyetik nano

partiküllerin biyolojik olarak aktif hale getirilmesi için hedef bakteriyi tanıyabilecek antikorlar kullanılır. Pahalı optik bileşenleri ortadan kaldırması ve manyetik alan kullanarak, örnek hazırlama süresini azaltması nedeniyle düşük maliyetli ve gelişmiş tarama etkinliğine sahip biyosensörlerdir. Biyolojik numunelerin ihmal edilebilir manyetik arka plan sinyali nedeniyle, yüksek özgüllük ve duyarlılık sergilemektedirler (Duarte ve ark., 2016; Li, 2006; Wang ve ark., 2021).

d) Mekanik Biyosensörler

Kuartz Kristal Mikrobalans Sensörler: Analitin bağlanmasından dolayı, sensör yüzeyinde artan kütleden kaynaklanan rezonans frekans değişimlerini ölçer. Etiketleme gerektirmeyen bir tespit yöntemidir (Ahmed ve ark., 2014).

Tablo 1'de hasta/sürü yanı teşhis yöntemlerinin kullanımına ilişkin çeşitli örnekler sunulmuştur.

Tablo 1. Hasta/sürü yanında teşhis yöntemlerinin kullanımına ilişkin örnekler.

Etken	Tanı Yöntemi	Tarama Limiti	Örnek Türü	Referanslar
<i>Brucella canis</i> (Antikor)	İmmüno-kromatografik kart testi	-	Serum	Cortina ve ark. (2017)
<i>Salmonella Typhimurium</i> ve <i>Salmonella Choleraesuis</i>	Entegre Mikro Akışkan Elektrokimyasal DNA Çipi	~100 cfu/ml	Kan	Patterson ve ark. (2013)
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Boncuk-Temelli Mikro Akışkan İmmün Test	-	Serum	Wadhwa ve ark. (2012)
<i>Borrelia burgdorferi</i> (İnsan çalışması)	Mikro akışkan İmmün Test	-	Kan	Nayak ve ark. (2016)
<i>Coxiella burnetii</i>	LAMP	10 pg DNA/ µl (PCR ile aynı)	Abortif materyal	Raele ve ark. (2015)
<i>Brucella abortus</i>	LAMP	7 pg/µl DNA	Fötüs mide içeriği, kan	Karthik ve ark. (2014)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Disk üzerinde laboratuvar formatında LAMP	10 ³ cfu/ml	Balgam	Loo ve ark. (2016)
<i>Leptospira interrogans</i>	MCDA	10 genomik eşdeğer	Saf kültür	Li ve ark. (2019)
<i>Escherichia coli</i>	Mikro Akışkan PCR cihazı	0.7 ng/ µl	Saf kültür	Salman ve ark. (2020)
<i>Vibrio cholerae</i>	SPR Temelli İmmüno-sensör	43 hücre/ml	Saf Kültür	Taheri ve ark. (2016)
<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> ve <i>MRSA</i>	SERS Temelli Biyosensör	5×10 ² hücre/ml	Saf Kültür	Wang ve ark. (2018)
<i>M. tuberculosis</i>	Amperometrik Biyosensör	100 cfu/ml	Balgam	Hiraiwa ve ark. (2015)
<i>E. coli</i>	Potansiyometrik Biyosensör	6 cfu/ml	Süt	Zelada-Guillén ve ark. (2010)
<i>Listeria monocytogenes</i>	İmpedimetrik Biyosensör	10 ³ cfu/ml	Saf kültür	Etayash ve ark. (2014)
<i>S. Typhimurium</i>	Kuartz Kristal Mikrobalans Biyosensörü	10-20 cfu/ml	PBS	Salam ve ark. (2013)

Sonuç

Sonuç olarak hasta/sürü yanı testleri saha koşullarında kısa sürede patojenin tespitine olanak sağlayarak hızlı tanıya ve buna bağlı olarak, hızlı ve doğru tedaviye imkân vermektedir. Bu teknolojilerin ilk çıkış noktası beşerî hekimlik alanıdır. Ancak, veteriner hekimlik alanında da yaygın olarak kullanılan testler olacıkları görülmektedir. Hasta/sürü yanı tanı testleri, uygulayıcının enfekte olma riskini artırması, ikili ya da çoklu enfeksiyonların kültür yöntemine kıyasla gözden kaçması ve kalite kontrol için performans ölçümü gerektirmesi (Reinert, 2007) gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Ancak test teknolojilerinin gelişim süreçleri hala devam etmektedir ve ortaya çıkabilecek her yeni teknolojik gelişmeyle birlikte, test yöntemlerinin sahip olduğu çeşitli kısıtlamaların aşılması veya çok farklı prensiplere dayanan test teknolojilerin ortaya çıkması söz konusu olabilecektir.

Veteriner hekimlik alanında günümüz şartları değerlendirildiğinde, ilk akla gelen ve en güvenilen teşhis yöntemleri hasta/sürü yanı testleri değildir.

Ancak bu tanı yöntemleri ile ilgili çeşitli kalite standartları belirlendiğinde, analitik performansları ile ilgili daha çok veri elde edildiğinde ve bu verilerin altın standart olarak kabul edilen tanı yöntemleri ile gösterdikleri uyum daha yüksek olduğunda, hekimlerin bu testlere olan güveninin artacağı ifade edilebilir. Hasta/sürü yanı testlerinin geliştirilmesi aşamasında, biyo-mühendis ve veteriner hekimlerin birlikte çalışmaları oldukça önemlidir. Gelecekte hasta/sürü yanı testlerinin tanı alanında çok önem arz edecekleri öngörülmektedir.

Kaynaklar

- Ahmed A, Rushworth JV, Hirst NA, Millner PA, 2014: Biosensors for whole-cell bacterial detection. *Clinical Microbiology Reviews*, 27 (3), 631-646.
- Bahadır EB, Sezgintürk MK, 2016: Lateral flow assays; Principles, designs and labels. *Trends Analy Chem*, 82, 286-306.
- Bahadır EB, Sezgintürk MK, 2014: A review on impedimetric biosensors. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 44 (1), 248-262.

- Belák S, Ballagi-Pordány A, 1993: Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Vet Res Commun*, 17, 55-72.
- Busin V, Wells B, Kersaudy-Kerhoas M, Shu W, Burgess STG, 2016: Opportunities and challenges for the application of microfluidic Technologies in point-of-care veterinary diagnostics. *Mol Cell Probes*, 30, 331-341.
- Chang CC, Chen CC, Wei SC, Lu HH, Liang YH, Lin CW, 2012: Diagnostic Devices for Isothermal Nucleic Acid Amplification. *Sensors*, 12, 8319-8337.
- Chatterjee B, Kalyani N, Das S, Anand A, Sharma TK (2019). Chapter 2- Nano-realm for point-of-care (POC) bacterial diagnostics In: *Methods in Microbiology*, Gurtler V, Ball AS, Soni S (Ed), 19-42, Academic Press, London. Web sayfası: Anonim (1) <https://www.sciencedirect.com>, Erişim tarihi; 11.03.2021.
- Chin CD, Linder V, Sia SK, 2007: Lab-on-a-chip devices for global health: past studies and future opportunities. *Lab Chip*, 7 (1), 41-57.
- Cortina ME, Novak A, Mellini LJ, Elena S, Corbera N, Romero JE, Nicola AM, Ugalde JE, Comerchi DJ, Ciocchini AE, 2017: Development of improved enzyme-based and lateral flow immunoassays for rapid and accurate serodiagnosis of canine brucellosis. *Vet Microbiol*, 208, 174-180.
- Craw P, Balachandran W, 2012: Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab Chip*, 12, 2469-2486.
- Duarte C, Costa T, Carnerio C, Soares R, Jitariu A, Cardoso S, Piedade M, Bexiga R, Freitas P, 2016: Semi-quantitative method for Streptococci magnetic detection in raw milk. *Biosensors*, 6 (2), 19.
- Etayash H, Jiang K, Thundat T, Kaur K, 2014: Impedimetric Detection of Pathogenic Gram-Positive Bacteria Using an Antimicrobial Peptide from Class IIa Bacteriocins. *Anal Chem*, 86, 1693-1700.
- Fan X, White IM, Shopova SI, Zhu H, Suter JD, Sun Y, 2008: Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Anal Chim Acta*, 620, 8-26.
- Galvan DD, Yu Q, 2018: Surface-enhanced raman scattering for rapid detection and characterization of antibiotic-resistant bacteria. *Adv Healthcare Mater*, 7, 1701335.
- Hardt S, Schönfeld F, 2007: *Microfluidic Technologies for Miniaturized Analysis Systems*. Springer, Boston, USA.
- Hiraiwa M, Kim JH, Lee HB, Inoue S, Becker AL, Weigel KM, Cangelosi GA, Lee KH, Chung JH, 2015: Amperometric immunosensor for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis. *J Micromech Microeng*, 25, 055013.
- Jacob ME, Crowell MD, Fauls MB, Griffith EH, Ferris KK, 2016: Diagnostic accuracy of rapid immunoassay for point-of-care detection of urinary tract infection in dogs. *Am J Vet Res*, 77 (2), 162-166.
- Karthik K, Rathore R, Thomas P, Arun TR, Viswas KN, Agarwal RK, Manjunathackar HV, Dhama K, 2014: Loop mediated isothermal amplification (LAMP) test for specific and rapid detection of Brucella abortus in cattle. *Vet Q*, 34 (4), 174-179.
- Kawai K, Inada M, Ito K, Hashimoto K, Nikaido M, Hata E, Katsuda K, KIKU Y, Tagawa Y, Hayashi T, 2017: Detection of bovine mastitis pathogens by loop-mediated isothermal amplification and an electrochemical DNA chip. *J Vet Med Sci*, 79 (12), 1973-1977.
- Kettler H, White K, Hawkes S, 2004: Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections. WHO/TDR, Geneva, Switzerland.
- Koczula MK, Gallotta A, 2016: Lateral flow immunoassay. *Essays Biochem*, 60 (1), 111-120.
- Lalande V, Barrault L, Wadel S, Eckert C, Petit JC, Barbut F, 2011: Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of Clostridium difficile infections. *J Clin Microbiol*. 49 (7), 2714-2716.
- Lamb LS, Parrish RS, Goran SF, 1995: Current nursing practice of point-of-care laboratory testing in critical care units. *Am J Crit Care*, 4 (6), 429-434.
- Leva-Bueno J, Peyman SA, Millner PA, 2020: A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. *Med Microbiol Immunol*, 209, 343-362.
- Li S, Liu Y, Chen X, Wang M, Hu W, Yan J, 2019: Visual and Rapid Detection of Leptospira interrogans Using Multiple Cross-Displacement Amplification Coupled with Nanoparticle-Based Lateral Flow Biosensor. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 19 (8), 604-612.
- Li Y, 2006: Section 2.3. Biosensors In: *CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI Information Technology*. Munack A (Ed), 52-93, American Society of Agricultural Engineers, Michigan. Web sayfası: Anonim (1) <https://cigr.org>, Erişim tarihi; 21.02.2021.
- Loo JFC, Kwok HC, Leung CCH, Wub SY, Lawa ILG, Cheungd YK, Cheunge YY, Chine ML, Kwand P, Huie M, Konga SK, Hob HP, 2016: Sample-to-answer on molecular diagnosis of bacterial infection using integrated lab-on-a-disc. *Biosens and Bioelectron*, 93, 212-219.
- Martinez AW, 2011: Microfluidic paper-based analytical devices: from POCKET to paper-based ELISA. *Bioanalysis*, 3(23), 2589-2592.
- Martinez AW, Phillips ST, Carrilho E, Thomas SW, Sindi H, Whitesides GM, 2008: Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. *Anal Chem*, 80 (10), 3699-3707.
- Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T, 2001: Detection of loop mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 289 (1), 150-154.
- Mullis KB, Faloona FA, 1987: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol*. 155, 335-350.
- Nagamine K, Hase T, Notomi T, 2002: Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes*, 16 (3), 223-229.
- Najian ABN, Syafirah EAR, Ismail N, Mohamed M, Yean CY, 2016: Development of multiplex loop mediated isothermal amplification (m-LAMP) label-based gold nanoparticles lateral flow dipstick biosensor for

- detection of pathogenic *Leptospira*. *Anal Chim Acta*, 903, 142-148.
- Nakajima H, Inoue M, Mori T, Itoh K, Arakawa E, Watabane H, 1992: Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and Pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved Polymerase Chain Reaction method. *J Clin Microbiol*. 30 (9), 2484-2486.
- Nayak S, Sridhara A, Melo R, Richer L, Chee NH, Kim J, Vincent L, Steinmiller D, Sia SK, Gomes-Solecki M, 2016: Microfluidics-based point-of-care test for serodiagnosis of Lyme disease. *Sci Rep*, 6 (1), 35069.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watabane K, Amino N, 2000: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 28 (12), E63.
- Pal V, Saxena A, Singh S, Goel AK, Kumar JS, Parida MM, 2018: Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Burkholderia mallei*. *Transbound Emerg Dis*. 65, e32-e39.
- Patterson AS, Heithoff DM, Ferguson BS, Soh HT, Mahan MJ, Plaxcoa KW, 2013: Microfluidic chip-based detection and intraspecies strain discrimination of *Salmonella* serovars derived from whole blood of septic mice. *Appl Environ Microbiol*, 79 (7), 2302-2311.
- Raele DA, Garofolo G, Galante D, Cafiero MA, 2015: Molecular detection of *Coxiella burnetii* using an alternative loop-mediated isothermal amplification assay (LAMP). *Vet Ital*, 51 (1), 73-78.
- Rattle S, Hofmann O, Price CP, Kricka LJ, Wild D (2013). Lab-on-a-chip, micro- and nanoscale immunoassay systems and microarrays In: *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*, Wild D (Ed), 175-202, Elsevier, Oxford. Web sayfası: Anonim (1) <https://www.sciencedirect.com>, Erişim tarihi; 06.03.2021.
- Reinert RR, 2007: Rapid streptococcal antigen detection tests. *J Lab Med*. 31 (6),280-293.
- Sadeghi SJ, 2013: Amperometric biosensors In: *Encyclopedia of Biophysics*, Roberts GCK (Ed), 61-67, Springer, Berlin. Web sayfası: Anonim (1) <https://link.springer.com>, Erişim tarihi; 25.02.2021.
- Sahoo PR, Sethy K, Mohapatra S, Panda D, 2016a: Loop mediated isothermal amplification: An innovative gene amplification technique for animal diseases. *Vet World*, 9 (5), 465-469.
- Sahoo PR, Mishra SR, Kar D, 2016b: Lateral flow assay-A new platform for diagnosis of livestock disease. *Int J Livest Res*, 6 (2), 1-9.
- Salam F, Uludag Y, Tothill IE, 2013: Real-time and sensitive detection of *Salmonella Typhimurium* using an automated quartz crystal microbalance (QCM) instrument with nanoparticles amplification. *Talanta*, 115, 761-767.
- Salman A, Carney H, Bateson S, Ali Z, 2020: Shunting microfluidic PCR device for rapid bacterial detection. *Talanta*, 207, 120303.
- Sareyyupoglu B, Akan M, 2006 Restriction fragment length polymorphism typing of infectious bursal disease virüs field strains in Turkey. *Avian Dis*, 50, 545-549.
- Sia SK, Whitesides GM, 2003: Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis*, 24 (21), 3563-3576.
- Taheri RA, Rezayan AH, Rahimi F, Mohammadnejad J, Kamali M, 2016: Development of an immunosensor using oriented immobilized antiOmpW for sensitive detection of *Vibrio cholerae* by surface plasmon resonance. *Biosens and Bioelectron*, 86, 484-488.
- Wadhwa A, Foote RS, Shaw RW, Eda S, 2012: Bead-based microfluidic immunoassay for diagnosis of John's disease. *J Immunol Methods*, 382 (1-2), 196-202.
- Wang Y, Wang Y, Ma AJ, Li DX, Luo LJ, Liu DX, Jing D, Liu K, Ye CY, 2015: Rapid and sensitive isothermal detection of nucleic-acid sequence by multiple cross displacement amplification. *Sci Rep*, 5, 11902.
- Wang Y, Li H, Wang Y, Zhang L, Xu J, Ye C, 2017: Loop-mediated isothermal amplification label-based gold nanoparticles lateral flow biosensor for detection of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol*, 8, 192.
- Wang C, Gu B, Liu Q, Pang Y, Xiao R, Wang S, 2018: Combined use of vancomycin-modified Ag-coated magnetic nanoparticles and secondary enhanced nanoparticles for rapid surface-enhanced Raman scattering detection of bacteria. *Int J Nanomedicine*, 13, 1159-1178.
- Wang C, Liu M, Wang Z, Li S, Deng Y, He N, 2021: Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices. *Nano Today*, 37, 101092.
- Yamazaki W, Taguchi M, Ishibashi M, Nukina M, Misawa N, Inoue K, 2009: Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Campylobacter fetus*. *Vet Microbiol*. 136, 393-396.
- Zhang X, Lowe SB, Gooding JJ, 2014: Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosens and Bioelectron*, 61, 491-499.
- Zelada-Guillén GA, Bhosale SV, Riu J, Rius FX, 2010: Real-Time Potentiometric Detection of Bacteria in Complex Samples. *Anal Chem*, 82, 9254-9260.

*Yazışma Adresi: Bengi AKKOYUNLU

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.

e-mail: bengi_trkr@hotmail.com