

Enfeksiyonların Tanısında Nanopartiküller

Doç. Dr. Emrah Şefik Abamor

Enfeksiyonların Tanısı

Kültürleme

Mikroskopi

Seroloji

Moleküler Yöntemler

Kültür ve Mikroskopi

- Kültür ve mikroskopik yaklaşım, enfekte edici ajanların tespiti için en yaygın stratejidir
- Bu yöntemlerin temeli mikroorganizmaların bir büyüme ortamında kültürlenmesi ve ardından çıplak gözle veya mikroskop altında gözlemlenmesine dayanır

Kültür Yöntemi

Enfeksiyon tanısı
mikroorganizmanın

Boyutuna

Şekline

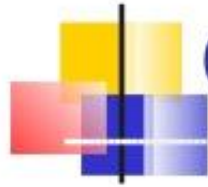
Oluşturduğu koloniye

Koloni rengine göre değişir.



Besiyerleri

- Canlı ve cansız ortamlar olarak ikiye ayrılırlar.
- **Canlı ortamlar;** olarak sıklıkla hücre kültürleri, embriyonlu yumurta ve deney hayvanlarından yararlanılmaktadır.
- **Cansız ortamlar;** genellikle bakterileri izole etme, üretme, ayırıcı tanı yapabilmede kullanılan sıvı veya katı besiyerleridir.



Genel Kullanım Besiyerleri

- **Özel Besiyerleri**
- Üremeleri güçlük gösteren bazı mikroorganizmaların üretilmeleri için hazırlanan besiyerleridir.
- daha kompleks yapıdadırlar.

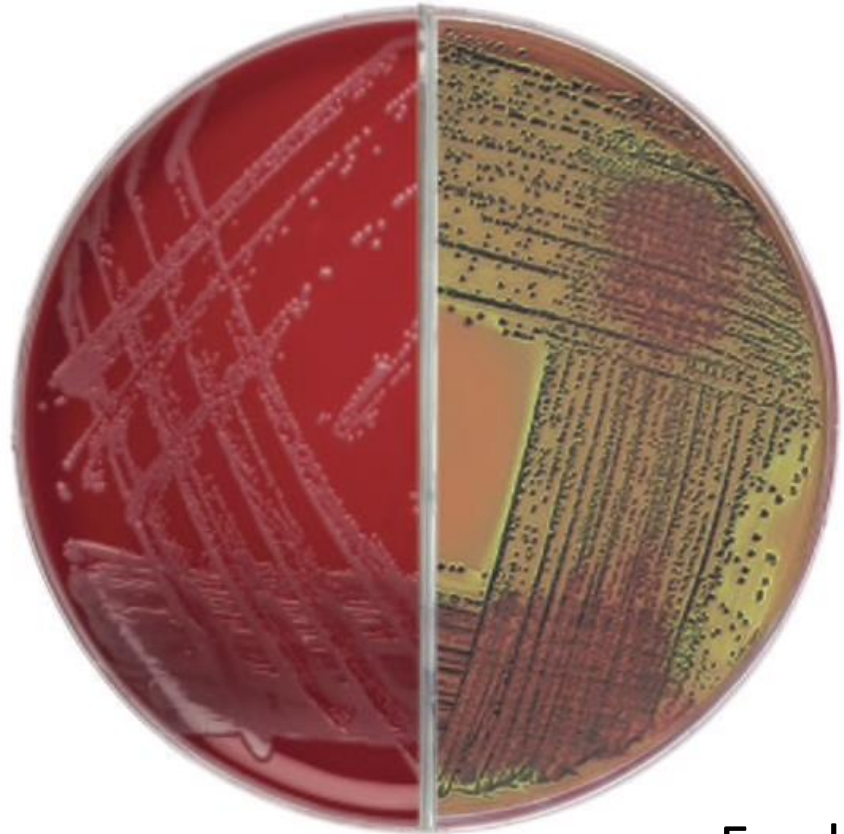


Seçici (selektif) besiyerleri:

- Üretilmesi istenen mikroorganizmayı baskılamayan ancak, normal flora gibi diğer mikroorganizmaların üremesini inhibe eden seçici antimikrobik maddeler yer almaktadır.
- $\div$ rneğin, kolistin nalidiksik asitagar (CNA) besiyeri; Gram negatif mikroorganizmaların üremesini inhibe ederken, Streptokokların üremesini etkilememektedir.

Enterobact eriaceae Familyası

Shigella



E.coli

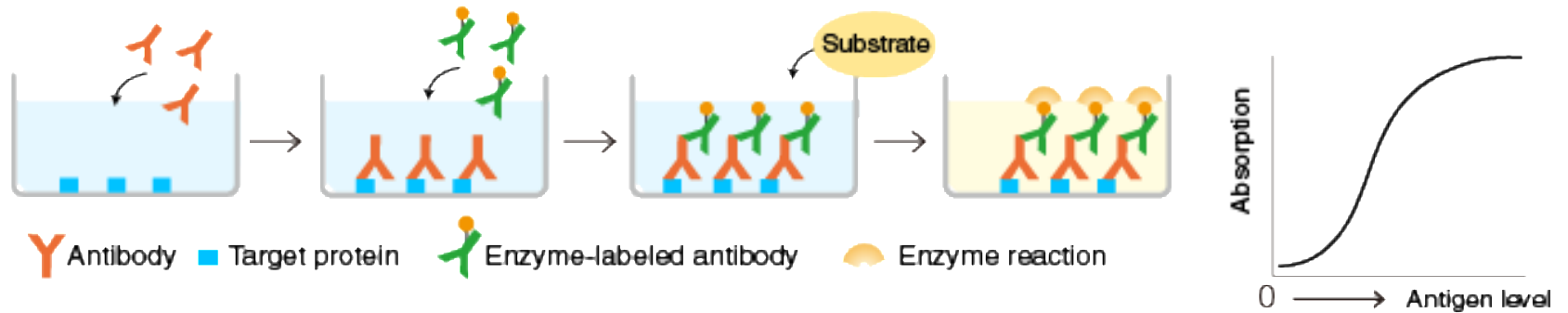
Mikroskopi

- Kültür gerekmeksizin, kan, idrar, balgam örnekleri direkt olarak mikroskopta incelenebilir

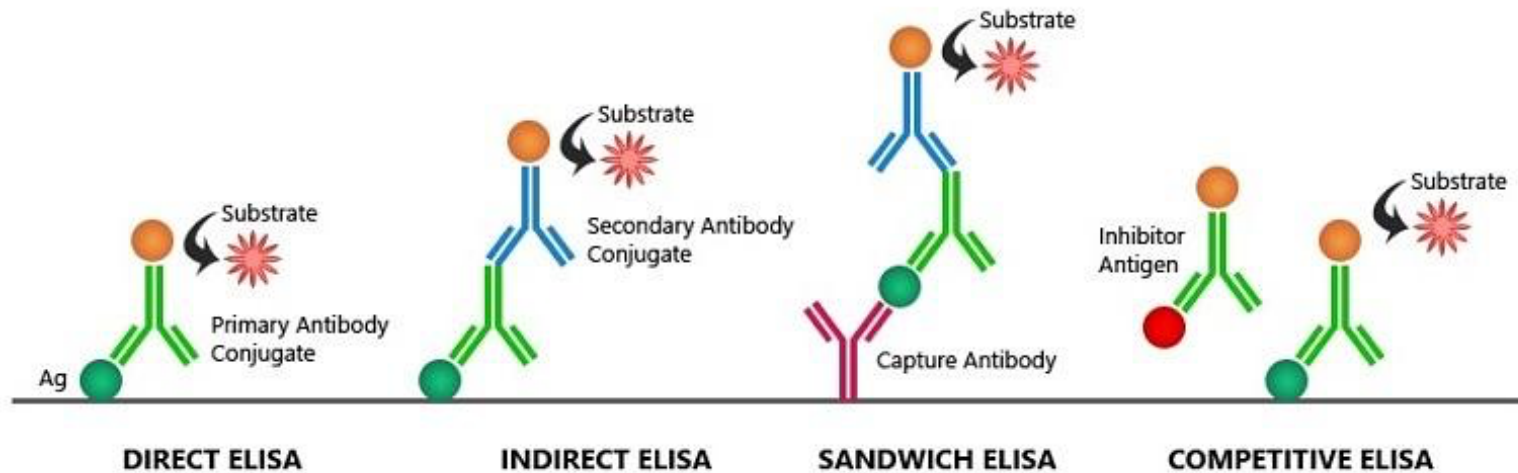


Seroloji

ELISA



ELISA Türleri



Moleküler Yöntemler

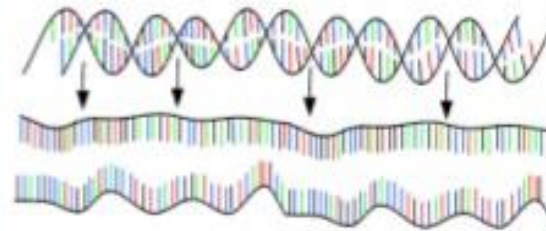
- Son yıllarda, PCR metodu bulaşıcı hastalıkların teşhisi için patojenlerden RNA veya DNA'nın büyütülmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır.
- Tek bir hedefli DNA dizisini 1 saatte 1 milyon kat ile tespit edebilir.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

- PCR is widely used for the identification of microorganisms.
- Sequence **specific primers** are used in PCR for the amplification of DNA or RNA of specific pathogens.
- PCR allows for the detection even if **only a few cells are present** and can also be used on **viable nonculturables**.
- The presence of the **appropriate amplified PCR product** confirms the presence of the organisms.

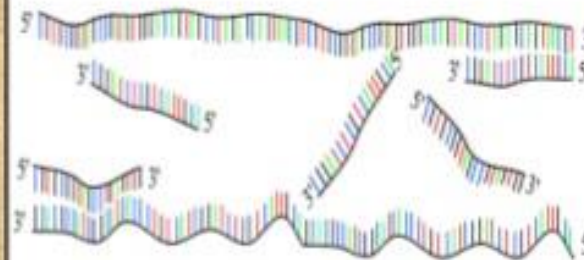
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

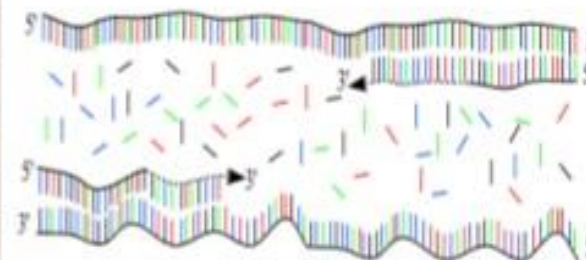
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

only dNTP's

(Andy Vornetzer 1999)

Dezavantajlar

- Birincisi, testler zaman alıcıdır ve bu belirgin bir olumsuz özelliktir. Kültür ve mikroskopi yöntemine gelince, birincil testler 2-3 gün sürebilir ve son test teşhis sonuçlarını doğrulamak için 7-10 gün sürebilir.



Dezavantajlar

- Örnekler tespit edilemez olabilir veya yanlış-negatif sonuçlara yol açabilir.
- Ek olarak, karmaşık ve pahalı işlemlerin gereksinimleri, yüksek maliyet, düşük taşınabilirlik ve potansiyel çapraz kontaminasyon bu geleneksel teşhis yaklaşımları için diğer tipik sınırlamalardır.

Tanıda Kullanılan Yöntemler ve Sınırlamalar

Table II. Diagnostics tests for infectious diseases in developing countries and their limitations.⁴²

Disease	Diagnostic test	Limitations
Acute respiratory infections (ARIs)	Blood/sputum culture	—Culture is time-consuming and costly and results are highly dependent on stringent transport conditions to maintain specimen. —Requires constant supply of reagents, well-maintained equipment, and adequately trained staff.
Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)	—Serology (antigen/antibody detection); detection by PCR amplification of the LTR region of <i>gag</i> gene, <i>env</i> gene, and <i>pol</i> gene	- High rate of false negative and positives. —PCR cannot be performed during the HIV incubation period. —Nucleic acid amplification technologies (NAAT) such as PCR are expensive and may produce many false positives due to contamination
Diarrheal diseases	—Microscopy stool culture	- Microscopy requires well-trained and supervised technologists. —Pathogen culture is time-consuming and costly.
Malaria	Blood film; antigen detection (dipstick); antibody detection (ELISA and Rapid)	Rapid tests help to control disease spreading but have high false positive rates.
Tuberculosis (TB)	Sputum microscopy; pathogen solid and liquid culture; Tuber skin test; PCR-based Gene Xpert	Microscopy requires experts and well-trained staff. Antibody tests, Tuber skin test (tuberculin) may produce false positive result due to allergic reactions.
Visceral leishmaniasis	Direct agglutination test (DAT); serological field test; microscopy/culture of spleen or bone marrow cells	Bone marrow sampling is painful and invasive.

Nanotanı

- Nanotanı (nanodiagnostik) tanısal uygulamalarda nanoteknolojinin kullanımı olarak tanımlanmaktadır.
- Nanodiagnostiklerin, bir çok hastalığın yüksek duyarlılıkla ve erken tanısında önemli bir role sahip olacağı düşünülmektedir.

Nanotanı

- Nanoyapıların yüksek yüzey / hacim oranı, tespit sonuçlarının hassasiyetini artıran çok sayıda hedef molekülün platform yüzeyine tutunmasına imkan sağlamaktadır.
- Nanomalzemelerin veya nanoyapıların sahip oldukları özellikler hastalardan yalnızca çok az miktarda numune kullanılarak hızlı ve gerçek zamanlı algılama kabiliyetine sahip nanotanı platformlarının geliştirilmesine öncülük eder.

Enfeksiyonların
Tanısında
Nanopartiküller

Hızlı

Güvenilir

Düşük maliyetli

Uygulaması kolay

Çok az miktarda örnekle (kan, idrar,
balgam vs.) çalışabilir

Enfeksiyonların Tanısında Nanopartiküller

3 grup
altında
toplanabilir:

- Floresan özellikli nanopartiküller
- Metalik nanopartiküller
- Manyetik nanopartiküller

Floresan Özellikli Nanopartiküller (Quantum dots)

Kuantum noktaları, fotostabilite, yüksek kuantum verimi ve parlaklık gibi birçok önemli özelliğe sahip 1-10 nm boyutlarında yarı iletken floresan nanoyapılardır.

Kuantum noktalarının flüoresans fonksiyonları, boyutlarındaki ve kompozisyonlarındaki değişikliklerle kolayca ayarlanabilir.

Quantum Dots

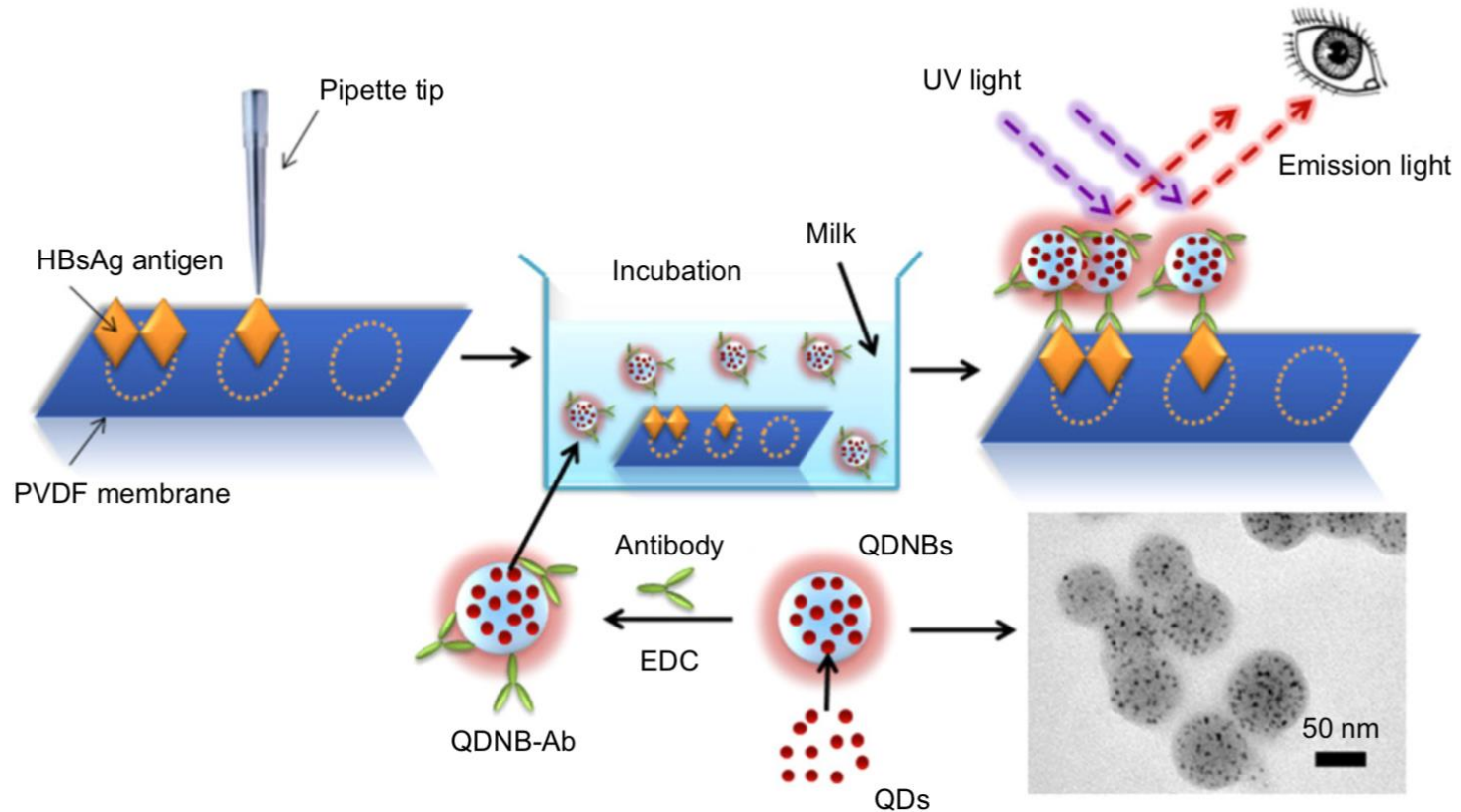


Figure 1 Schematic illustration of the detection of HBsAg using QDNBs for the diagnosis of hepatitis B.

Notes: Reprinted by permission from Zhang P, Lu H, Chen J, Han H, Ma W. Simple and sensitive detection of HBsAg by using a quantum dots nanobeads based dot-blot immunoassay. *Theranostics*. 2014;4(3):307–315. Copyright © 2014 Ivyspring International Publisher. Creative Commons license available at: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>.⁴⁴

Abbreviations: Ab, antibody; EDC, 1-ethyl-3-(3-di-methylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride; HBsAg, hepatitis B surface antigen; PVDF, polyvinylidene difluoride; QDs, quantum dots; QDNB, quantum dots nanobead; UV, ultraviolet.

Quantum Dots Görüntüleme Basamakları



Kuantum dotların içerisine pek çok kuantum parçacık yerleştirilebilir ve gelen floresan sinyalin şiddeti arttırılabilir.



Kullanılacak porlu membranların içerisine enfeksiyon şüpheli örnek damlatılarak immobilize edilir



Daha sonra bu membranlar yüzeyi antijene spesifik antikor ile konjuge edilmiş kuantum dotlar ile inkübe edilir



Daha sonra floresan özellikli quantum noktacıklar UV ışık altında incelenir.

Metalik Nanopartiküller

- Tanı uygulamalarında en çok kullanılan metalik nanoparçacıklar, altın ve gümüş nanoparçacıklarıdır. Bu metalik nanopartiküller, elektromanyetik radyasyonla uyarıldıklarında yoğun absorpsiyon yayabilir.

Altın Nanopartikülleri

- Altın nanopartikülleri, genellikle tuzlar gibi basit reaktiflerin eklenmesi ile agrege olduktan sonra görünür ışık altında kırmızıdan mora renk değişimine uğrar.
- Bu durum altın nanopartiküllerin tanıda kullanılmasına yardımcı olur



Altın Nanopartikülleri

Enfeksiyon hastalıkların tanısında altın nanopartikülleri 3 farklı şekilde kullanılabilir:

1. Tek zincirli DNA'lar ile hibridizasyon sonrası biyolojik örneklerde spesifik nükleik asit sekanslarının tayini

2. Yüzeyinin antikorlar ile kaplanması sonucunda fonksiyonelleşmiş nanoprobolar olarak antijen tanısında kullanım

3. Sinyal arttırıcı olarak Raman spektroskopisine katılım

Visual detection of *Brucella* in bovine biological samples using DNA-activated gold nanoparticles

Fig 1

Schematic representation of the visual detection of *Brucella* based on salt induced aggregation.

a) positive reaction; and b) negative reaction. After hybridisation of the AuNP-probe with the specific DNA (positive sample), the negative charge surrounding the AuNPs is increased. After adding salts (here HCl), the negative charges surrounding the unhybridised AuNP are neutralised resulting in the aggregation of AuNP (change to purple colour), whereas in the case of a positive sample (with more negative charge), the negative charges are not neutralised completely resulting in the non-aggregation of AuNP (the colour remains red).

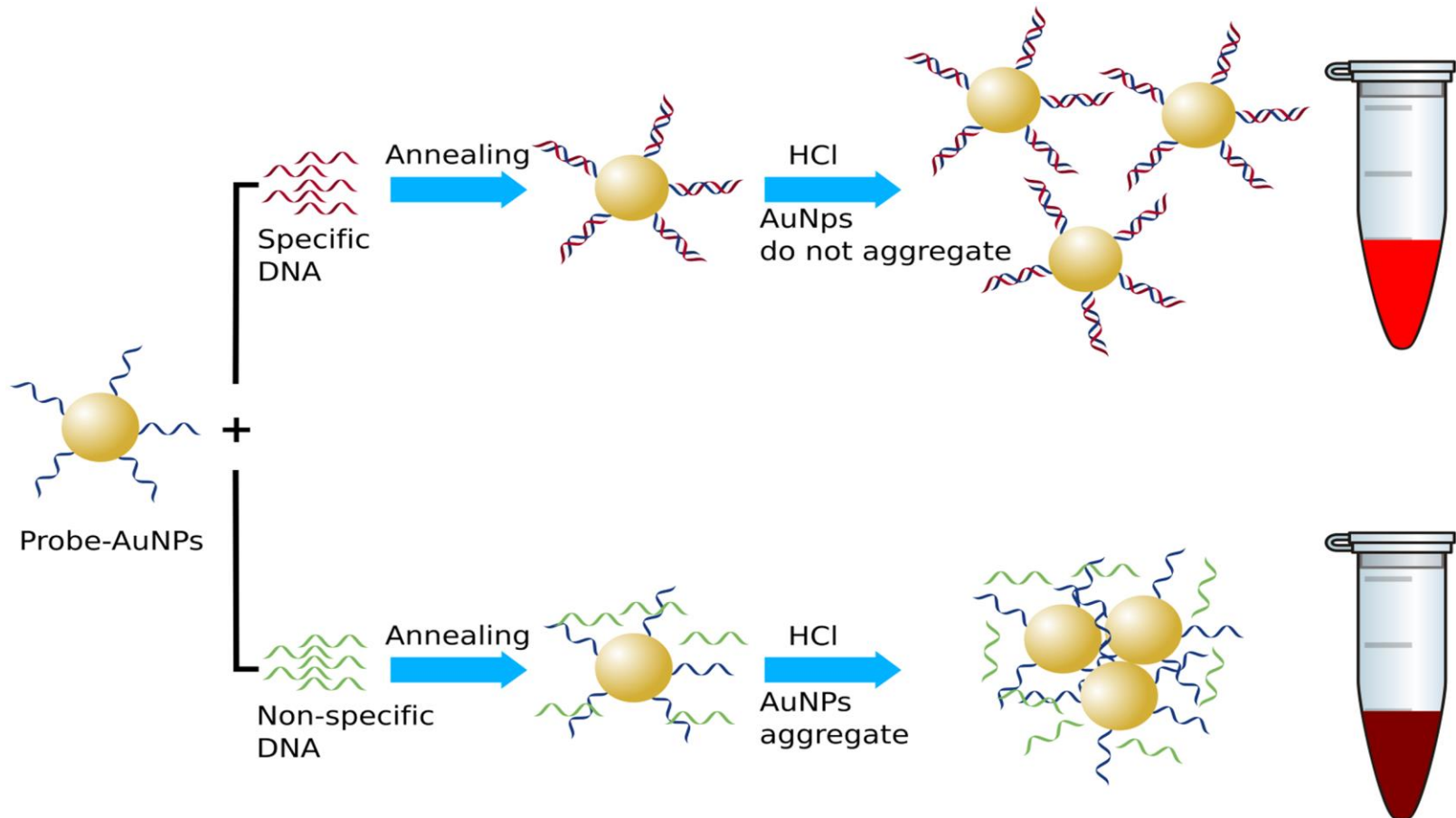
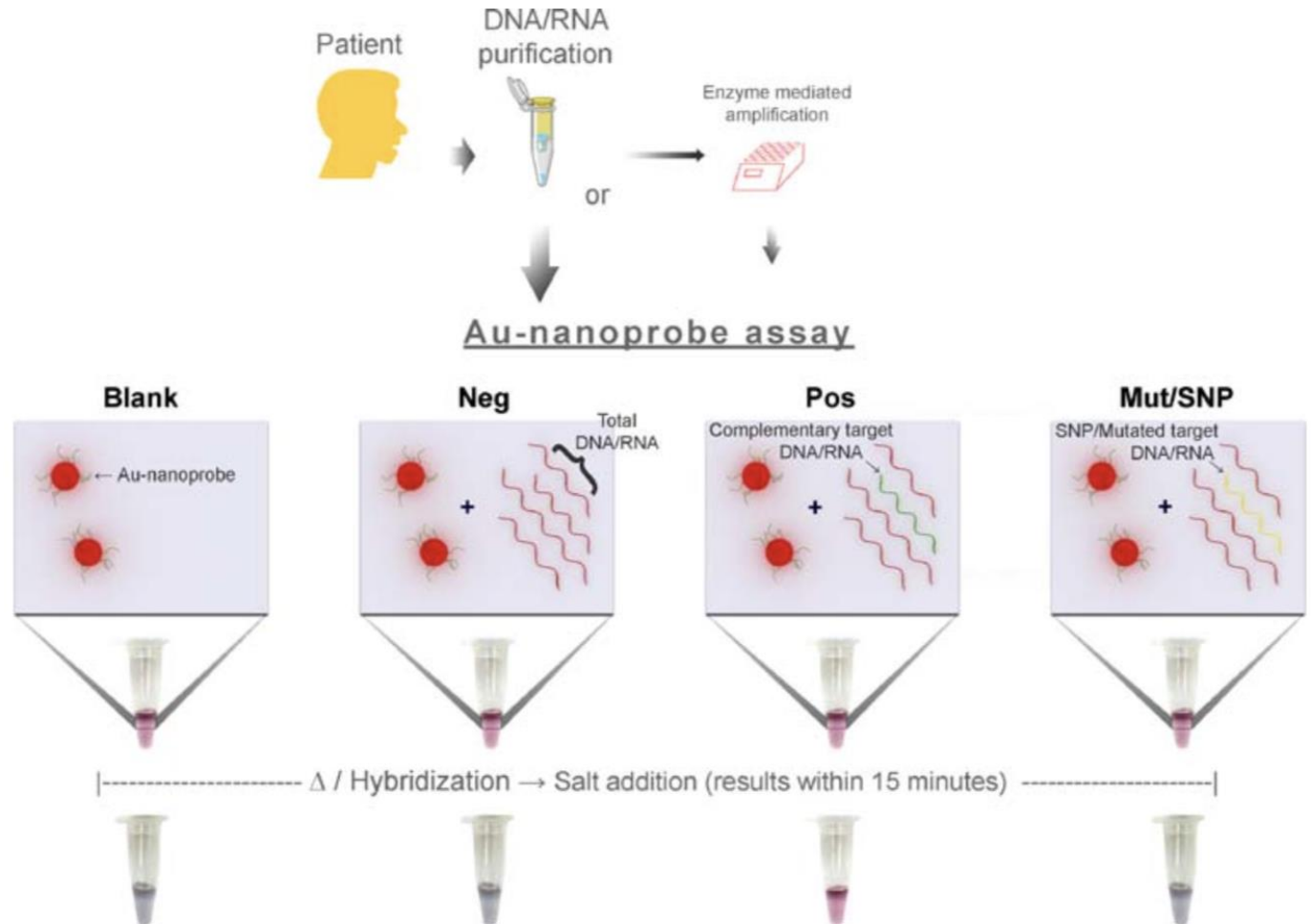
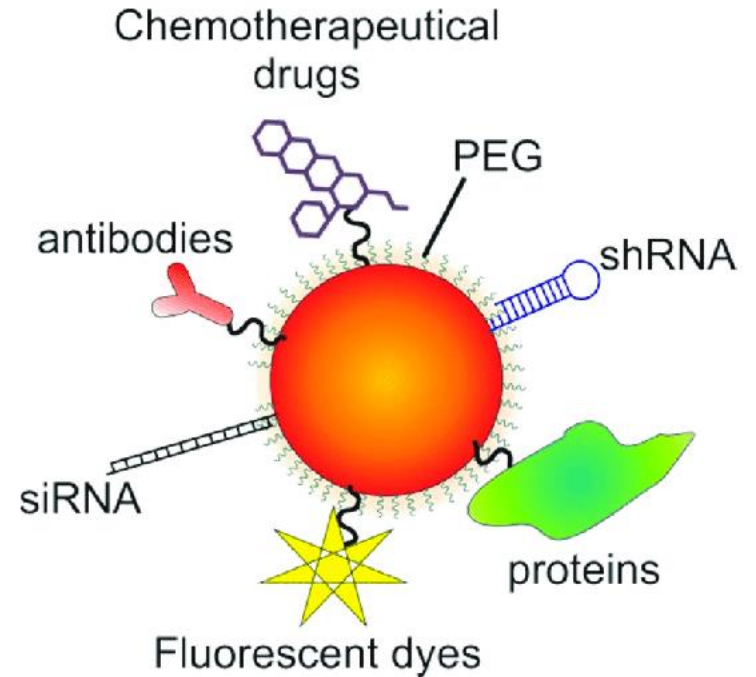


Fig. 1 Au-nanoprobe assay method. After DNA purification from clinical samples, the Au-nanoprobe method can be directly applied to the isolated DNA or to an enzyme mediated amplified product. The method relies on visual comparison of test solutions before and after salt-induced Au-nanoprobe aggregation. *Blank*, Au-nanoprobe alone; *Neg*, negative sample in the presence of non-complementary DNA/RNA; *Pos*, positive sample in the presence of complementary DNA/RNA; *SNP/Mut*, in the presence of DNA harboring SNP or single point mutation



Altın Nanopartiküllerin Fonksiyonelleşmesi

- Altın nanopartiküllerinin fonksiyonelleşmesi için yüzeyine antikorlar veya çeşitli biyomoleküller bağlanır ve enfeksiyon ajanının membran dışında yer alan spesifik antijenleri tanınması beklenir



Lateral Flow Kitler

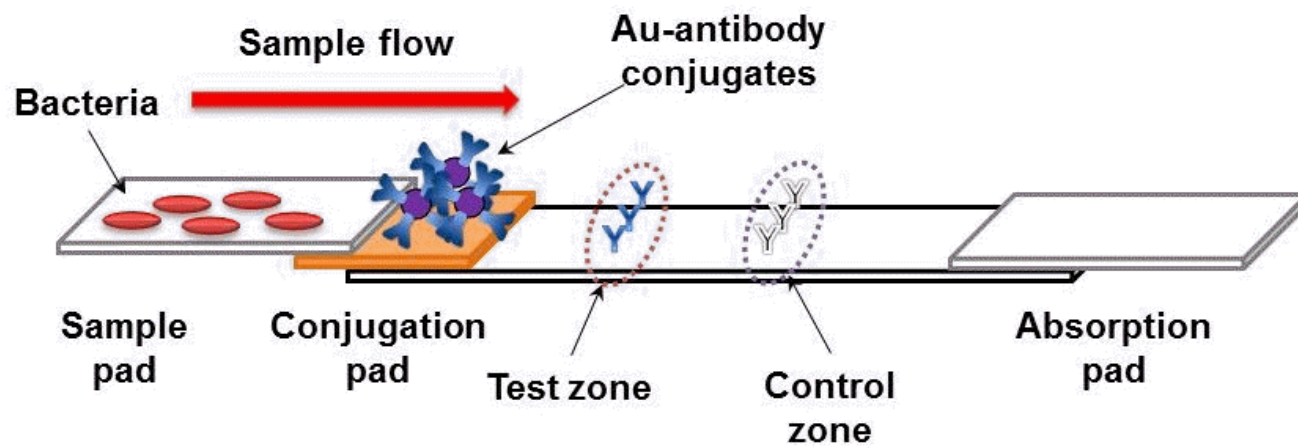
- Bu sistemde, test kiti üç reaksiyon bölgesine sahiptir. Birinci kuyucuk hedef antijenle reaksiyona girecek antikorları içerir.
- Bu antikorlar altın partikülleri ile bağlanmıştır. Sıvı formdaki örnek bu kuyucuğa eklenir eğer örnekte aranan organizma varsa antikorlarla reaksiyona girecektir.
- Oluşan kompleksler kapiller hareket ile ikinci bölgeye lateral olarak yığılacaktır.

Lateral Flow Kitler

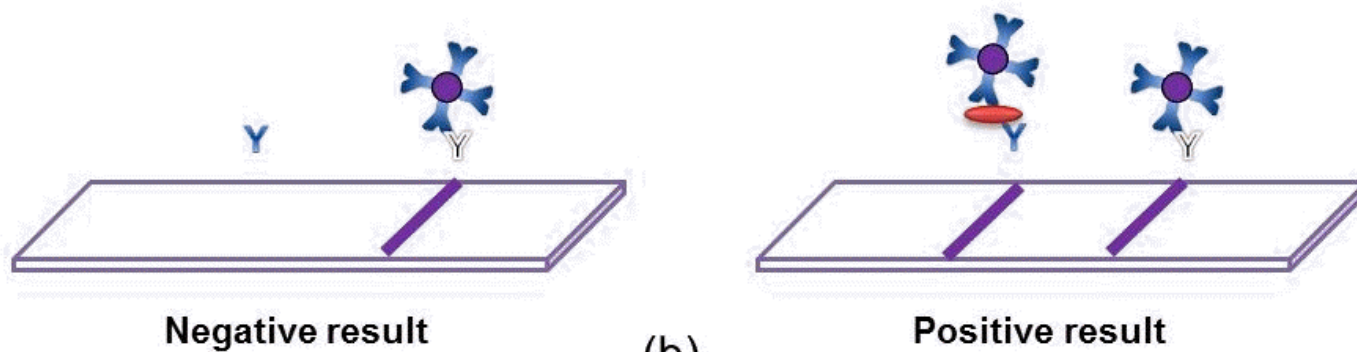
- İkinci bölge, hedef antijen ile reaksiyona girebilecek şekilde düzenlenmiş ikinci bir antikor grubu içerir. Eğer aranan mikroorganizma örnekte varsa oluşan kompleksler bu ikinci antikor grubunca kaplanacaktır ve birinci antikor grubunun renk partikülleri ile kaplı olmasından dolayı kırmızı bir çizgi hattı oluşacaktır. Fazla antikorlar üçüncü bölgeye yığılmaya devam edeceklerdir.

Lateral Flow Kitler

- Üçüncü bölge ilk antikorlar ile reaksiyona girebilen diğer bir sekonder antikora sahiptir. Böylece üçüncü bölgede ikinci bir kırmızı hat oluşacaktır.
- Bu çizgiye “kontrol” çizgisi denilmektedir ve sistemin çalıştığını göstermektedir

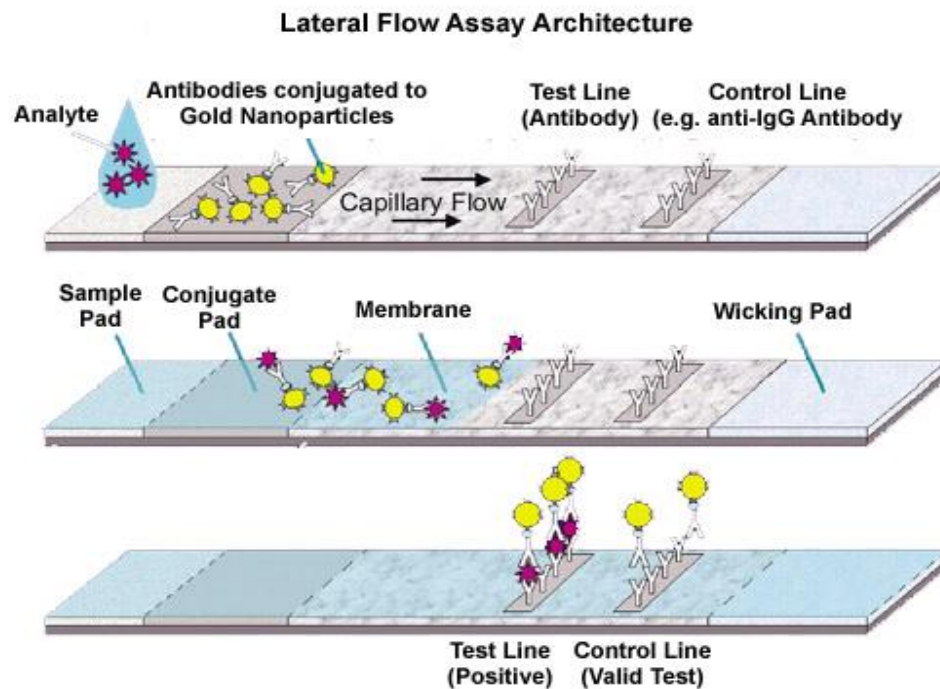


(a)



(b)

Lateral Flow Kitler



MaxSignal® Salmonella Test Strip Kit



RAMAN SPEKTROSKOPİSİ

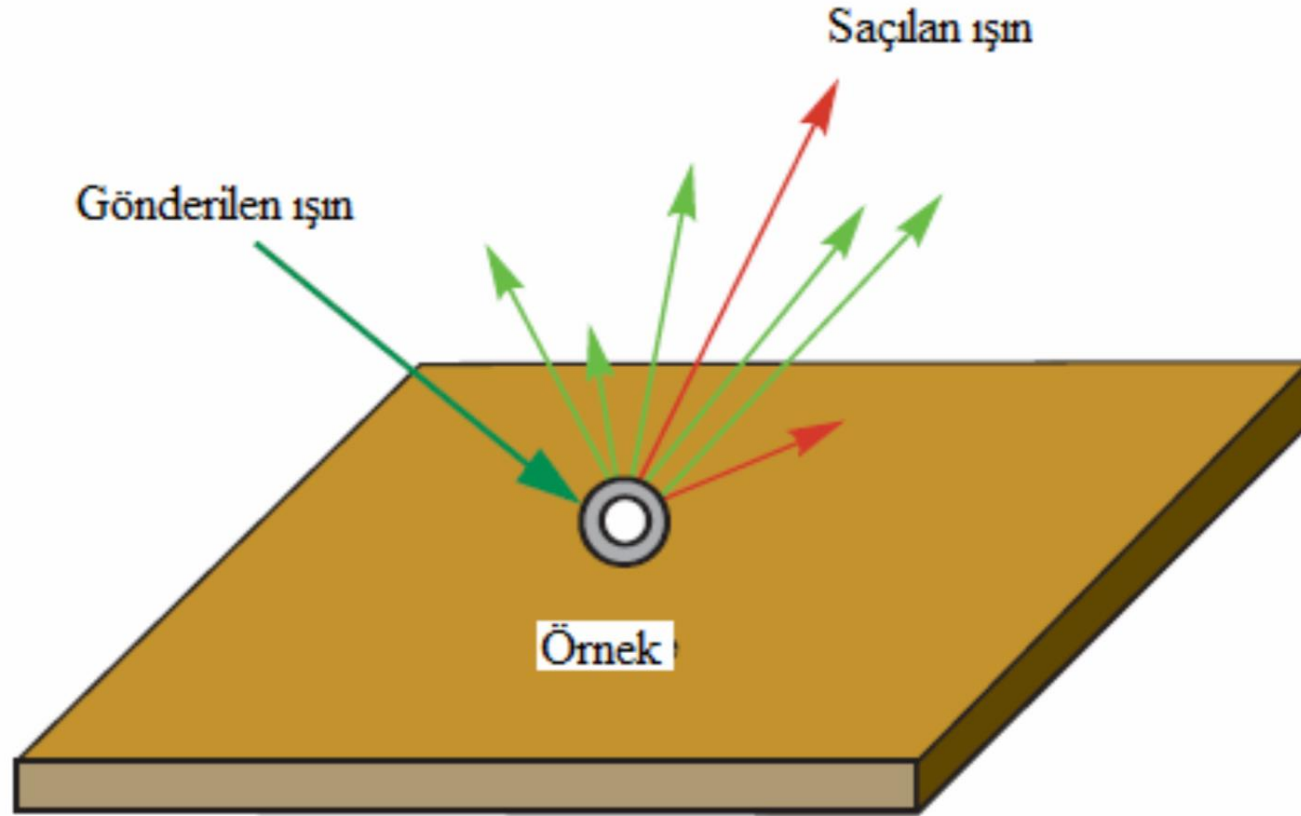
Lazer Raman Spektroskopisi

✓ Moleküller ile etkileştirilen ışığın kaynağı olarak son yıllarda genellikle lazer türü kaynaklar kullanıldığından bu yöneme *Lazer Raman Spektroskopisi* adı da verilir.



Dayandığı Temel

- ✓ Örnek moleküllerinin güçlü bir lazer kaynağıyla ışınlanmasıyla saçılan ışının belirli bir açıdan ölçümüne dayanmaktadır (Meurens, 2003).
- ✓ Raman spektroskopisi molekülün polarlığının değişmesi üzerine kurulmuştur (Gündüz 2002).

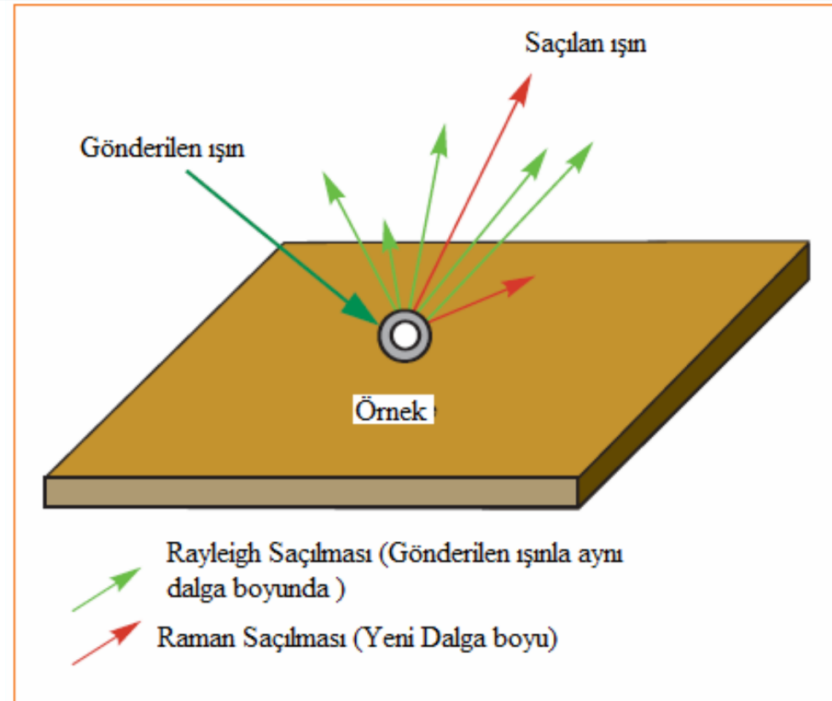


-  Rayleigh Saçılması (Gönderilen ışınla aynı dalga boyunda)
-  Raman Saçılması (Yeni Dalga boyu)

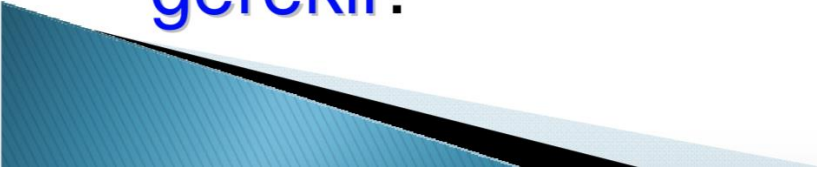
✓ **Rayleigh saçılması** (*Gönderilen ışınla aynı dalga boyunda*): Elastik saçılma olayı

□ Raman saçılmasına göre **104 - 105 kez daha şiddetli** bir saçılmış ışık oluşur. **Ancak Rayleigh saçılması tek bir pik verir ve titreşim geçişleri hakkında bilgi vermez.**

✓ **Raman saçılması**: Elastik olmayan saçılma olayı

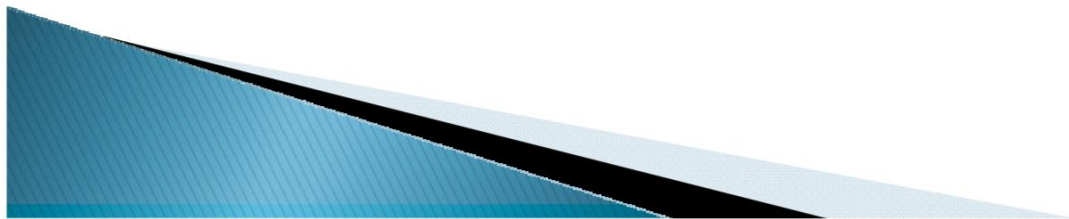


Raman Aktif Moleküller

- ✓ Raman saçılmasının spektroskopik incelenmesi ile **moleküllerin titreşim enerji düzeyleri** hakkında bilgi edinilebilir.
 - ✓ Bir titreşimin Raman aktif olabilmesi için, **molekülün kutuplaşabilirliğinin titreşimsel hareket sırasında değişim göstermesi gerekir.**
- 

Bir Raman Pikinin Şiddetine Etkili Faktörler

- ❑ Molekülün polarize olabilme özelliğine,
- ❑ Kaynağın şiddetine ve
- ❑ Aktif grubun konsantrasyonuna bağlıdır
(Skoog and West, 1981).



Yüzeyi Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS)

- Yüzeyi Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS) diğer metallerin yanı sıra altın veya gümüş gibi nano ölçekli metal yüzeyleri kullanarak Raman sinyallerini yükselten bir yöntemdir.
- Bu metalik nanosistemlere plazmonik nanopartiküller denir ve yöntemin hassasiyetini artırarak lazer ışığına maruz kaldıklarında spesifik optik özellikler gösterirler.

Yüzeyi Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS)

- Altın ve gümüş gibi soymetallerin nanometre boyutlarındaki yüzeylerinde bulunan molekül veya moleküler yapılardan gelen foton saçılmasını 10^{14} e kadar zenginleştirmektedir.
- Bu seviyedeki hassasiyet floresan tekniği ile yarışmakta ve diğer bir çok spektroskopik tekniğe üstünlük sağlamaktadır.

Yüzeyi Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS)

Proteinler

Nükleik Asitler

Ve hatta tüm patojen hakkında detaylı yapısal bilgi sağlamaktadır

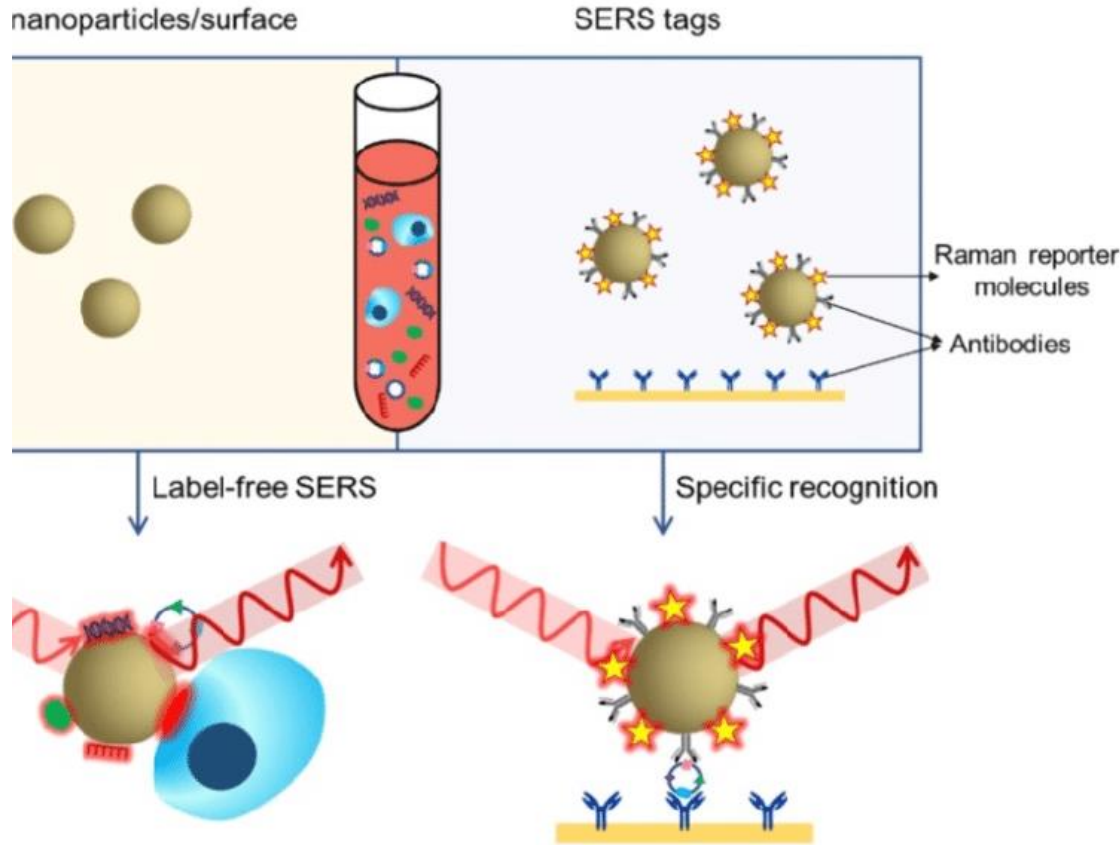
Yüzeyi Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS)

- SERS kısaca molekül kaynaklı Raman sinyal şiddetinin arttırılması temeline dayanan bir tekniktir.
- SERS'te sinyal şiddetinin artması ışık ile metal arasındaki elektromanyetik etkileşimler ve uyarılmalar ile meydana gelen plazmon rezonanslar sonucu ortaya çıkmaktadır.
- Bu durumdan yararlanılabilmesi için moleküller ya metal yüzeye adsorplanmış olmalı ya da yüzeye çok yakın olmalıdır (10 nm<)

Yüzeyi
Zenginleştirilmiş
Raman
Spektroskopisi
(SERS)

2 şekilde olabilir:

- Etiketlenmiş SERS
- Serbest SERS



Etiketlenmiş SERS

- Etiketlenmiş SERS'te metalin yüzeyi monoklonal antikorlarla, aptamerlerle ya da küçük biyolojik moleküllerle kaplanmıştır.

Label-SERS

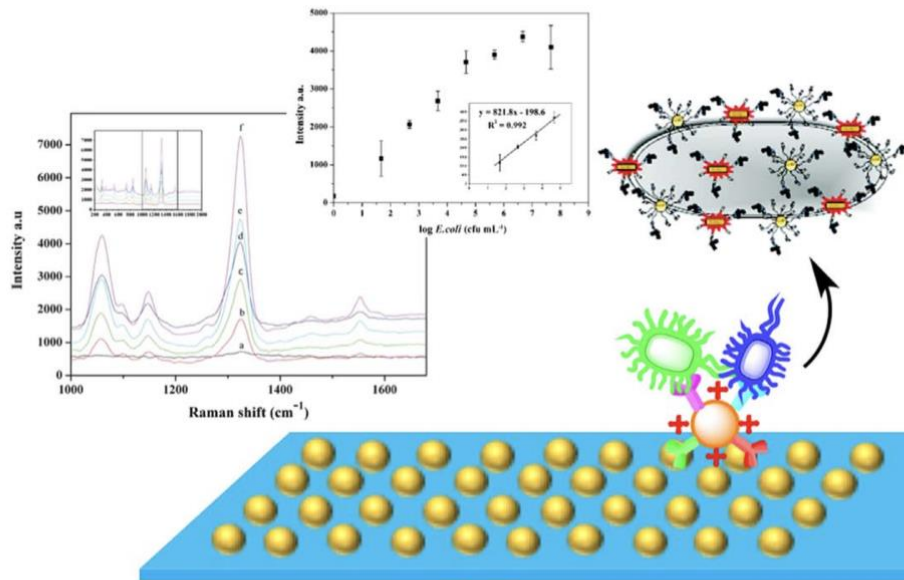
- Label SERS functionalized with monoclonal antibodies incorporating different kinds of nanoparticles, such as silver or gold, have been proposed for the detection of different types of bacteria, such as *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* among others. Monoclonal antibodies with a high recognition capacity to target a specific surface protein of bacteria are used

Etiketsiz (Serbest) SERS

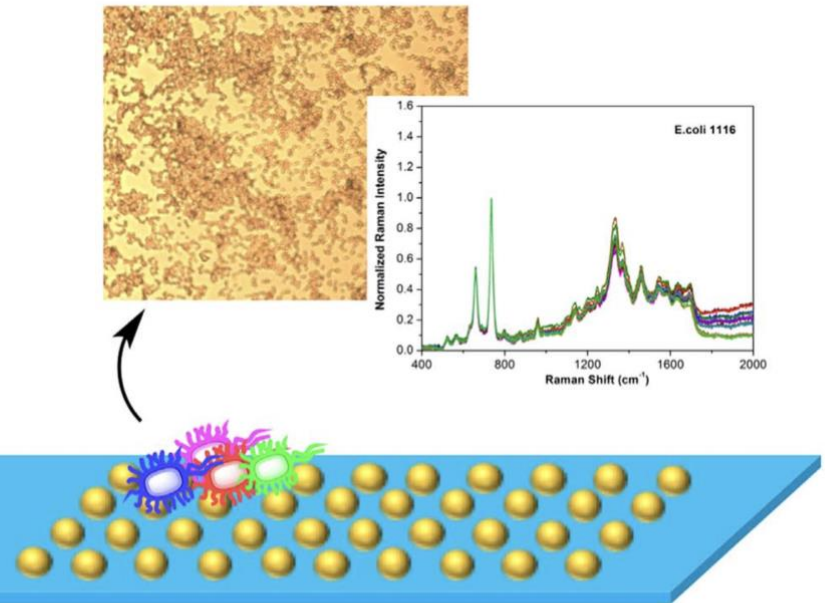
- Enfeksiyon ajanları SERS substratlarını içeren platforma adsorbsiyon yoluyla tutunurlar
- Işıma sonrası oluşan spektrum kaydedilerek bakteri varlığı tespit edilmeye çalışılır.

Etiketli ve Serbest SERS

A Label-based SERS method



B Label-free based SERS method



SERS tags

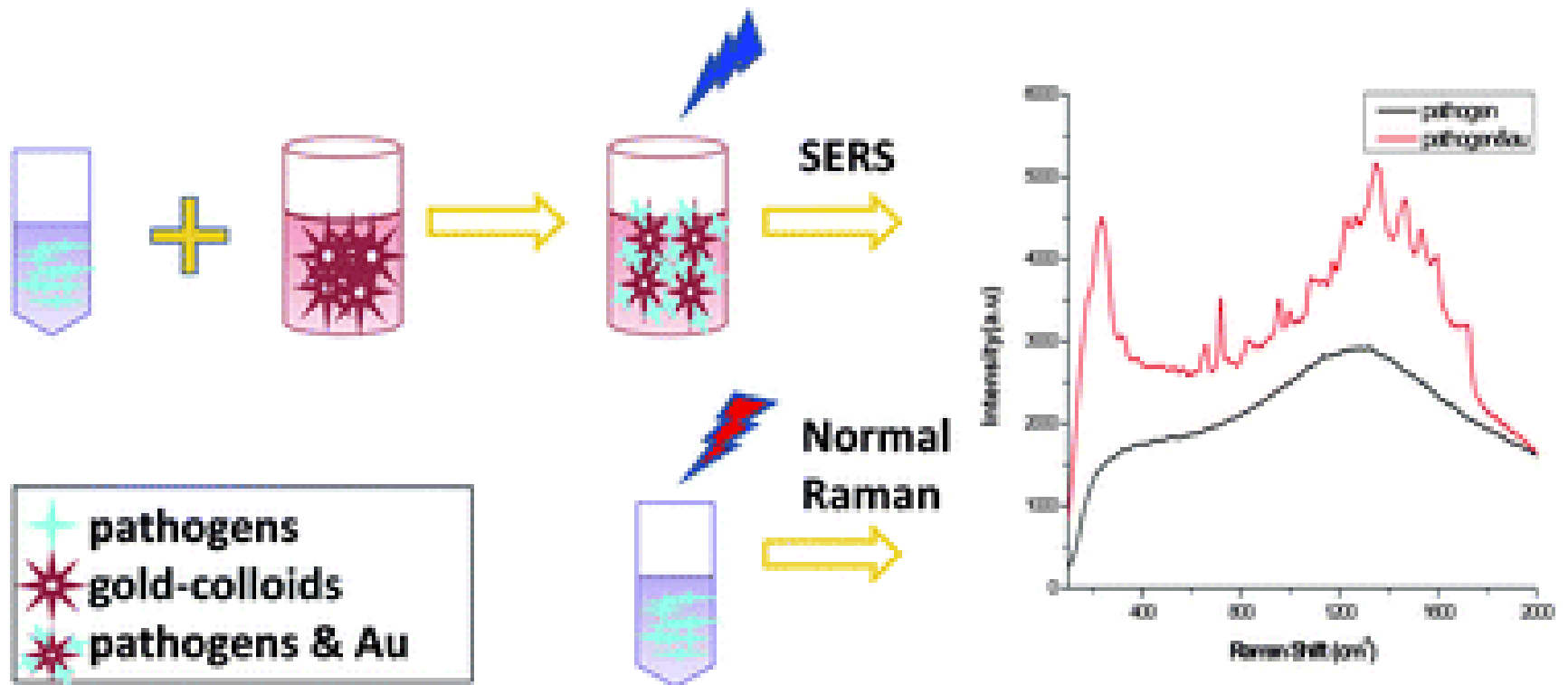


Bacteria

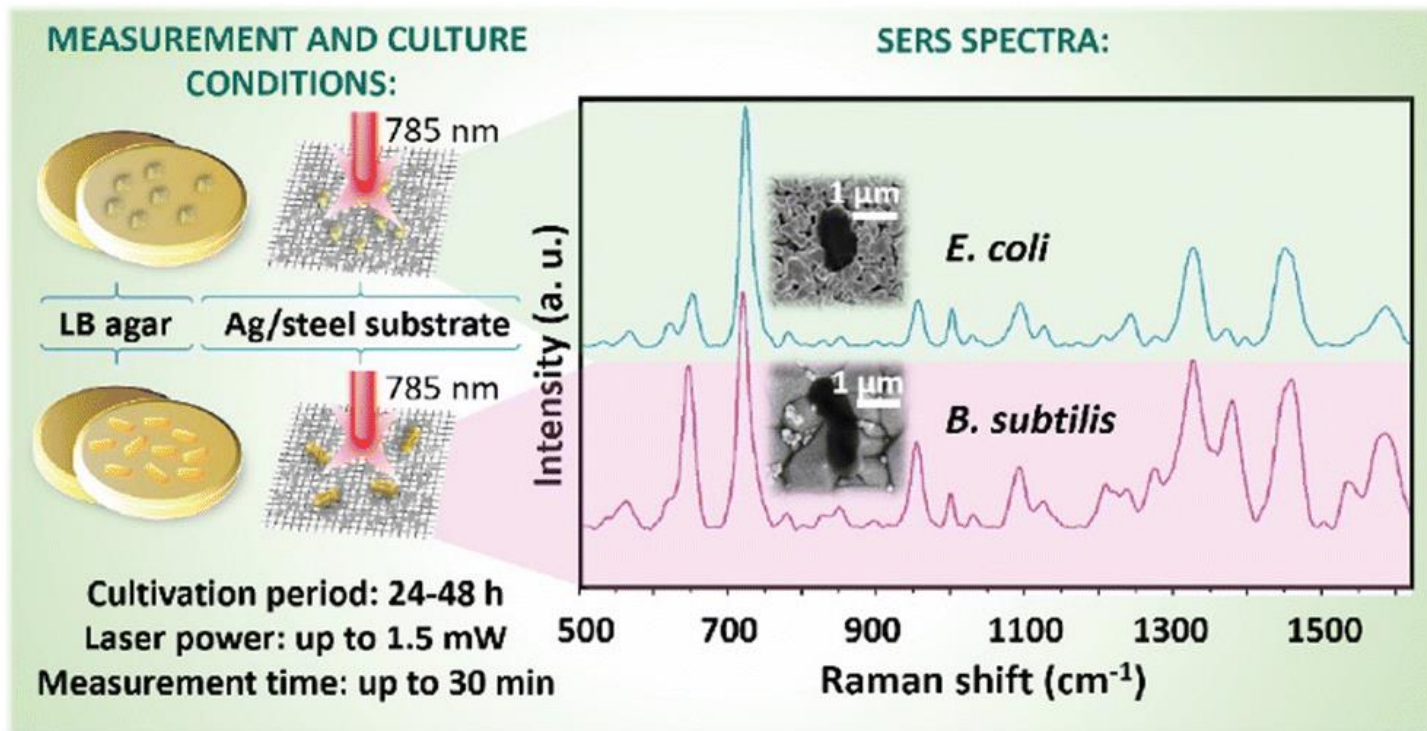


SERS substrate

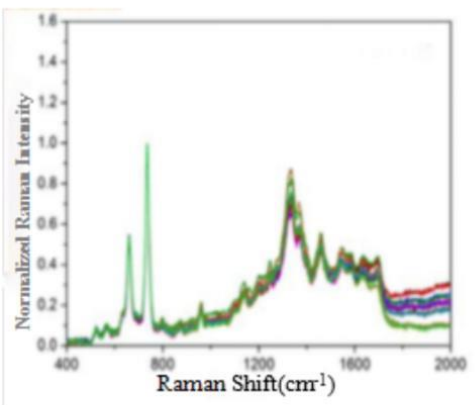
Etiketli ve Serbest SERS



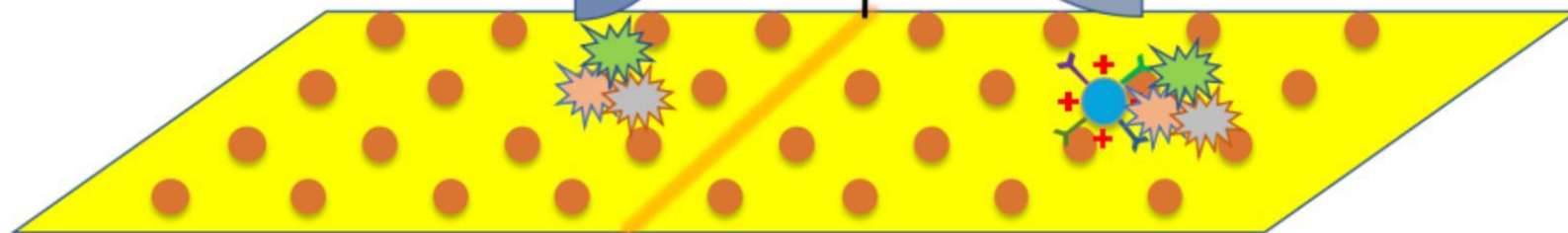
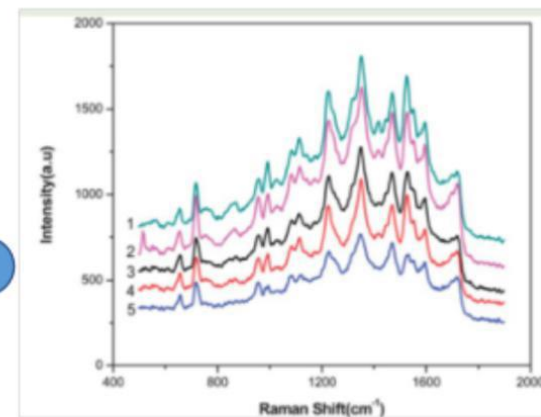
SERS Spektrumu



Label-free method



Label method



SERS tags



Bacteria



SERS substrate

Manyetik Nanopartiküller

- Manyetik nanopartiküllerin yüzeyin antikorlar ile kaplanabilir
- Nanopartikül-antikor konjugatları bakterileri yakalayabilirler.
- Ortam dışarıdan manyetik alana maruz bırakıldığında tanısı konmak istenen bakteriler diğer bakterilerden ayrıştırılırlar.
- Bakteri varlığı daha sonra SEM, TEM veya floresan mikroskop yoluyla tespit edilir.

Manyetik Nanopartiküller

