T.C.
*İstanbul*
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

# LEİSHMANİASİSE KARŞI TANI AMAÇLI KAĞIT TABANLI MİKROAKIŞKAN ANALİTİK TANI KİTİ TASARIMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**RUKEN DAŞ**

Tez Danışmanı

**Dr. Öğr. Üyesi SEZEN CANIM ATEŞ**

İSTANBUL
ŞUBAT 2021

**T.C.**
***İstanbul***
**YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ**
**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**KABUL ONAY**

Biyomedikal Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25/02/2021

**Tez Danışmanı**

Dr. Öğr. Üyesi Sezen CANIM ATEŞ

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi _____

**Jüri Üyeleri**

Dr. Öğr. Üyesi Sezen CANIM ATEŞ

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Sevil ÖZER

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi _____

Doç. Dr. Serap DERMAN

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

# ETİK BEYAN

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

25/02/2021

RUKEN DAŞ

# ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca ilgi ve desteğini benden esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sezen CANIM ATEŞ'e

Eğitimim sırasında bana her zaman yardımcı olan değerli hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Kadriye KIZILBEY'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sevil ÖZER'e,

Tez çalışmam süresince büyük yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, laboratuvarlarını bana açan, bilimsel görüşlerini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Serap DERMAN'a,

Tez çalışmam süresince laboratuvarının imkanlarından yararlanmamı sağlayan Sayın Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR'a,

Laboratuvarlarında bize her türlü yardım ve desteklerini sağlamalarından dolayı VISION Biotechnology şirketi ailesine ve başta Sayın Engin NARİNÇ olmak üzere deneysel aşamalarda tecrübelerini paylaşan Sayın İpek Yağmur ABAOĞLU'na,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca pratik bilgilerini benimle paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Uzm. Nilbeste BONCUKÇU'ya,

Tez çalışmalarım kapsamında kullanılan malzemelerin sağlanmasında yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Devrim GÖZÜAÇIK'a ve Prof. Dr. Mehmet HARMAN'a,

Hayatım boyunca hiçbir konuda desteklerini esirgemeyen, akademisyenlik yolunda önüme ışık tutan ve cesaretlendiren sevgili annem Ehlinaz DAŞ ve sevgili babam Mehmet DAŞ'a, ablam Ruşen JUNANDAR'a, kardeşlerim Bilal DAŞ ve Merve Ronayi DAŞ'a,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

RUKEN DAŞ

ŞUBAT 2021

# İÇİNDEKİLER

**KABUL ONAY** ..... **i**
**ÖNSÖZ** ..... **iii**
**İÇİNDEKİLER** ..... **iv**
**TABLOLAR LİSTESİ** ..... **ix**
**SİMGELER** ..... **x**
**KISALTMALAR** ..... **xi**
**ABSTRACT** ..... **xiv**
**1. GİRİŞ** ..... **1**
**2. BİYOSENSÖRLER** ..... **3**
2. 2. Biyosensörlerin Tarihi ..... 4
2. 3. Biyosensörlerin Yapısı ve İşlevleri ..... 5
2.4. Biyosensörlerin Avantajları ve Dezavantajları ..... 7
2.5. İdeal Bir Biyosensörün Özellikleri ..... 8
2.6. Biyosensörlerin Sınıflandırılması ..... 9
2.6.1. Kullanılan Biyoreseptör Türüne Göre Biyosensörler ..... 10
2.6.1.1 Enzim Tabanlı Biyosensörler ..... 11
2.6.1.2 İmmünosensörler ..... 12
2.6.1.3 DNA/ Nükleik Asit Tabanlı Biyosensörler ..... 15
2.6.2. Dönüştürücüye Göre Biyosensörler ..... 16
2.6.2.1. Elektrokimyasal Biyosensörler ..... 16
2. 6. 2. 2. Piezoelektrik Biyosensörler ..... 18
2. 6. 2. 3. Kalorimetrik Biyosensörler ..... 19
2. 6. 2. 4. Optik Biyosensörler ..... 21
**3. MİKROAKIŞKAN BİYOSENSÖRLER** ..... **22**
3. 1. Kâğıt Tabanlı Mikroakışkan Biyosensörler ..... 23
3. 2. Kâğıt Tabanlı Biyosensör Çeşitleri ..... 25
3. 2. 1. Kâğıt Tabanlı Mikrofluidik Analitik Cihazlar (µPADs) ..... 26
3. 2. 2. µPADs Üretim Yöntemleri ..... 27
3. 2. 2. 1. Wax Printing Metodu ..... 28
3. 2. 2. 2. Lazer Yazıcı ile Baskılama ..... 30
3. 3. Temas Açısı ..... 31
3. 4. Washburn Denklemi ..... 32

**4. *LEİSHMANİA* ..... 33**
4. 1. *Leishmania* Parazitlerinin Tarihçesi ve Sınıflandırılması ..... 34
4. 2. Morfolojisi ..... 36
4. 2. 1. Amastigot (Hücre içi) ..... 36
4. 2. 2. Promastigot (Hücre dışı) ..... 37
4. 3. Leishmaniasis ..... 37
4. 3. 1. Leishmaniasis'in Epidemiyolojisi ..... 38
4. 3. 2. Leishmaniasis' in Tanısında Kullanılan Yöntemler ..... 39
**5. GEREÇ VE YÖNTEMLER ..... 40**
5.1. Gereç ..... 40
5.1.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler ..... 40
5.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ..... 40
5. 2. Yöntem ..... 41
5. 2. 1. Çözeltilerin Hazırlanması ..... 41
5. 2. 2. Gold Nanorods Yüzeylerine Protein-A Bağlanmasının Optimizasyonu 42
5. 2. 3. Protein A – Gold Nanopartikül Bağlanmalarının İncelenmesi ..... 43
5. 2. 4. Protein A – Gold Nanorods (A-GNR) ve Protein A – Gold Nanopartikül (A-GNP) Konjugasyonlarında Miktar Optimizasyonları ..... 43
5. 2. 5. Parazitlerin Thoma Lamında Sayımı ..... 45
5. 2. 6. *Leishmania* Promastigotlarından Dondurup/Çözme Yöntemi ile Antijen ..... 45
5. 2. 7. Çalışmada Kullanılacak Kâğıt Seçimi ve Özellikleri ..... 46
5. 2. 8. Kağıt Yüzeylerine Uygulanacak µPAD Tasarımları ..... 46
5. 2. 10. µPAD Tasarımlarının Üretim Aşamaları ..... 47
5. 2. 11. µPAD Sistemine Uygulanan Karakterizasyon Yöntemleri ..... 48
5. 2. 11. 1. Temas Açısı Ölçümü ..... 48
5. 2. 11. 2. Washburn Deneyi ..... 48
5. 2. 12. Geliştirilen Kağıt Tabanlı Mikroakışkan Kitin Üzerine Reaktiflerin İmmobilizasyonu ..... 49
5. 2. 13. Geliştirilen Kâğıt Tabanlı Mikroakışkan Kitin Pozitif ve Negatif Hasta Serumlarında Uygulanması ..... 49
**6. BULGULAR ..... 50**
6. 1. Protein A – Gold Nanorods Konjugasyonunda Miktar Optimizasyonları ..... 50
6. 2. Protein A – Gold Nanopartikül Konjugasyonunda Miktar Optimizasyonları 51
6. 3. µPAD Sistemlerinin Temas Açısı Ölçüm Sonuçları ..... 53
6. 4. µPAD Sistemlerinin Washburn Deney Sonuçları ..... 55

6. 5. Geliştirilen Kâğıt Tabanlı Mikroakışkan Kitin Pozitif ve Negatif Hasta Serumlarında Uygulanması ..... 58
6. 6. Lateral Flow Tekniğinde Çalışan Reaktiflerin µPAD Sisteminde Uygulanması ..... 59
6. 7. µPAD Sistemlerinin Sodyum Hipoklorit (NaClO) ile Ağartılması ..... 60
**7. TARTIŞMA ..... 62**
**8. SONUÇ VE ÖNERİLER ..... 68**
**KAYNAKLAR ..... 70**

# ŞEKİLLER LİSTESİ

**Şekil 2. 1** Biyosensörlerin uygulamaları alanları [25]. ..... 4
**Şekil 2. 2** Biyosensörlerde yıllara yöre yapılan yayınlar [33]. ..... 5
**Şekil 2. 3** Biyosensörlerin yapısı ve çalışma mekanizması [36, 37]. ..... 6
**Şekil 2. 4** İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi [39]. ..... 7
**Şekil 2. 5** Enzim tabanlı biyosensörlerin şematik gösterimi [47]. ..... 12
**Şekil 2. 6** İmmünosensörlerin genel tasarım şeması [53]. ..... 13
**Şekil 2. 7 a)** Sandviç Model **b)** Yarışımlı Model [55]. ..... 14
**Şekil 2. 8** Bir DNA sekansının saptanmasında yer alan adımlar [58]. ..... 15
**Şekil 2. 9** Piezoelektrik biyosensör ve ölçüm sistemi [71]. ..... 19
**Şekil 2. 10** Kalorimetrik biyosensörün şematik diyagramı [74]. ..... 20
**Şekil 3. 1** Yanal Akış Testi Çalışma Mekanizması [92]. ..... 25
**Şekil 3. 2 a)** Fotolitografi yöntemi ile glikoz ve proteinin tespiti [88] **b)** Plotting yöntemi ile glikoz ve proteinin tespiti [103] **c)** Mürekkep püskürtme yöntemi ile protein, pH ve glikoz tespiti[104] **d)** Plazma işlemi ile alkalin fosfataz tespiti[14]**e)** Kesme yöntemi ile protein ve glikozun tespiti [95] **f)** Balmumu baskısı yöntemi ile protein, kolesterol ve glikozun tespiti [12]. ..... 28
**Şekil 3. 3** Wax Printing tekniği ile analitik cihazın tasarım ve üretim aşamaları [105]. ..... 29
**Şekil 3. 4** Lazer yazıcı ile üretilmiş µPAD modellerinin ön ve arka yüzleri [105]. 30
**Şekil 3. 5** Temas açısı gösterimi ..... 31
**Şekil 4. 1** *Leishmania* amastigot formu [117] ..... 36
**Şekil 4. 2** *Leishmania* promastigot formu [117] ..... 37
**Şekil 5. 1** UV-VIS spektrofotometre cihazı ..... 43
**Şekil 6. 1** Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Protein A – Gold Nanorods Konjugasyonlarının inkübasyon öncesi ve sonrası absorpsiyon spektrumları ..... 50
**Şekil 6. 2** Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Protein A – Gold Nanorods konjugasyon çözeltileri ..... 51
**Şekil 6. 3** Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Protein A – Gold nanopartikül konjugasyonlarının inkübasyon öncesi ve sonrası absorpsiyon spektrumları ..... 52
**Şekil 6. 4** Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Protein A – Gold Nanopartikül konjugasyon çözeltileri ..... 52
**Şekil 6. 5** K5 ve K6 konjugasyosyon çözeltilerinin inkübasyon öncesi ve sonrası absorpsiyon spektrumları ..... 53
**Şekil 6. 6** Temas açısı ölçüm sonuçları **a)** Kahve filtre kağıdı temas açısı **b)** Whatman No.4 temas açısı ……54

**Şekil 6. 7.** Whatman No.4 filtre kağıdı yüzeyine uygulanan tasarımlar. (1-5 arası iki yönlü tasarımların deneysel sonuçları; 6-10 arası tek yönlü tasarımların deneysel sonuçları gösterilmiştir) ..... 56
**Şekil 6. 8.** Kahve filtre kâğıdı yüzeyine uygulanan tasarımlar. (1'-5' arası iki yönlü tasarımların deneysel sonuçları; 6'-10' arası tek yönlü tasarımların deneysel sonuçları gösterilmiştir.) ..... 56
**Şekil 6. 9** İki farkı kağıt türünden üretilmiş µPAD sistemlerinin yol-zaman grafiği ..... 57
**Şekil 6. 10** Whatman No.4 kağıdından üretilen farklı kanal genişliğine sahip µPAD sistemlerinin yol-zaman grafiği ..... 57

**Şekil 6. 11 a)** µPAD sistemine reaktiflerin immobilizasyon alanları **b)** test sonucu 59
**Şekil 6. 12 a)** Hem kontrol alanı için hem de test alanı için ayrı konjugasyon alanları (900 µl tamponda çözdürülmüş) **b)** Pozitif numune uygulandıktan sonra test ve kontrol alanlarında oluşan renklenme ..... 60
**Şekil 6. 13 a)** Sodyum hipoklorit ile ağartılan kit **b)** 100 µl tamponda hazırlanan yoğun konjugasyonlar **c)** Pozitif numune sonucu ön yüzeyi **d)** Pozitif numune sonucu arka yüzeyi **f)** Negatif numune sonucu ..... 61

# TABLOLAR LİSTESİ

**Tablo 2. 1** Biyosensörlerin sınıflandırılması [33, 34]. ..... 10
**Tablo 2. 2** Enzim kategorisi ve fonksiyonları [35]. ..... 11
**Tablo 2. 3** Enzim katalizli reaksiyonların ısı çıkışı (molar entalpiler) [75]. ..... 20
**Tablo 3. 1** Mikrofluidik sistemlerde kullanılan malzemeler ..... 22
**Tablo 3. 2** Kâğıt tabanlı biyosensörlerin tespit yöntemleri, avantajları ve dezavantajları [84]..... 26
**Tablo 4. 1** *Leishmania* parazitlerinin sınıflandırılması [119]. ..... 35
**Tablo 5. 1** Farkı hacimlerde hazırlanan protein A ve GNR konjugatları ..... 44
**Tablo 5. 2** Farkı hacimlerde hazırlanan protein A ve GNP konjugatları ……..44
**Tablo 7. 1** SARS-CoV-2 için seçilmiş ticari hızlı tanı testleri…….....65

# SİMGELER

**%:** Yüzde

**°C:** Derece Santigrat

**µg:** Mikrogram

**µl:** Mikrolitre

**g:** Gram

**mg:** Miligram

**ml:** Mililitre

**nm:** Nanometre

**rpm:** Dakikadaki Devir Sayısı

# KISALTMALAR

**MKL:** Mukokütanöz Leishmaniasis

**KL:** Kutanöz Leishmaniasis

**VL:** Visseral Leishmaniasis

**IFAT:** İmmünofloresan Antikor Testi

**ELISA:** Enzime Bağlı İmmünosorbent Analizi

**PCR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

**pH:** Hidrojen Gücü (Power of Hydrogen)

**DAT:** Direkt Antiglobulin Testi

**POCT:** Bakım-noktası-testleri (Point-Of-Care-Testing)

**µPADs:** Kağıt Tabanlı Mikroakışkan Cihazlar

**IUPAC:** Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği

**GOD:** Glukoz Oksidaz

**LOC:** Çip Üstünde Laboratuvar (Lab-on-chip)

**ODN:** Oligonükleotidler

**QCM:** Kuvars kristal mikroterazi

**BAW:** Bulk Akustik Dalga

**SAW:** Yüzey Akustik Dalga

**TELISA:** Termometrik Enzime Bağlı İmmünosorbent

**MEMS:** Mikro Elektro-Mekanik Sistemler

**PDMS:** Polidimetilsiloksan

**LFT:** Yanal Akış Testi (Lateral Flow Test)

**LOP:** Kağıt Üstünde Laboratuvar (Lab-On-Paper)

**NNN:** Novy-Nicolle MCNeal

**UV-VIS:** Ultraviyole-Görünür Bölge (Ultraviolet–Visible)
**OD:** Optik Yoğunluk

**BSA:** Bovine Serum Albümin

**GNP:** Gold Napopartiküül

**GNR:** Gold Nanorods

**PBS:** Fosfat Tamponlu Salin

**PVA:** Polivinil Alkol

**Dpi:** İnç başına düşen nokta sayısı (dots per inch)

**Pt:** Anahtar Açıklığı

**DSÖ:** Dünya Sağlık Örgütü

# ÖZET

## Leishmaniasise Karşı Tanı Amaçlı Kağıt Tabanlı Mikroakışkan Analitik Tanı Kiti Tasarımı

**Ruken DAŞ**

**İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Yüksek Lisans Tezi, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Sezen CANIM ATEŞ**

**Şubat 2021, 75 sayfa**

Kâğıt tabanlı biyosensörler; taşınabilirliği, kolay ve ucuz üretim gibi nedenler ile yeni nesil kendi kendine çalışan mikroakışkan biyosensör olarak günümüzde tercih edilmektedir. Kağıt tabanlı mikroakışkan analitik cihazlar (µPADs) olarak bilinen ve son yıllarda bakım noktası (Point-Of-Care-POC) uygulamalarında sıkça kullanılan biyosensörler özellikle biyomedikal uygulamalarda geleneksel diagnostik cihazların yerini almaya başlamıştır.

Leishmaniasis, enfekte dişi kum sineklerinin bulaştırdıkları ve deride geçmeyen yaralara yol açan, tedavi edilmediğinde öldürücü olabilen zootonik bir hastalıktır. Leishmaniasisin tanısında klinik yöntemler, moleküler yöntemler ve çeşitli laboratuvar yöntemleri kullanılmaktadır. Laboratuvar teknikleri genellikle maliyetli ve test sonuçlarının uzun sürdüğü yöntemler olduğundan tedavilere geç başlanmaktadır.

Bu kapsamda, bu tez çalışmasında leishmaniasis tanısında kullanılmak amacı ile kağıt tabanlı mikroakışkan analitik tanı kiti tasarımı amaçlanmıştır. Lazer yazıcı kullanılarak kağıt üzerine tasarlanmış olan desenlerin toner ile basımı yapılarak kağıt tabanlı mikroakışkan cihazlar için yeni bir fabrikasyon metodu geliştirilmiştir. Kağıt üzerinde oluşturulan hidrofilik kanalların kılcal akış performansını incelemek için Washburn testi yapılmıştır. Ayrıca, hidrofobik bariyerlerin ıslanabilirliği, temas açısı ölçülerek belirlenmiştir. Bu kapsamda hem gold nanopartikül hem de gold nanorodlar kullanılarak 8 farklı derişimde protein A ile konjugasyon yapılmıştır. Leishmaniasis teşhisi için hazırlanan konjugasyon çalışmalarında, ne yazık ki malzeme eksiklikleri nedeniyle düşük konsantrasyonlardan dolayı istenilen renk yoğunluğuna ulaşılamamıştır. Ancak sistemin çalışabilirliğini kontrol etmek amacıyla, SARS-CoV-2 teşhisi için lateral flow yönteminde kullanılan hazır reaktifler, µPAD sisteminde denenmiş ve sistemin çalışabilirliğinin başarılı olduğu gözlemlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında geliştirilen sisteminin fabrikasyonu toner ile yapıldığı için şimdiye kadar gerçekleştirilen maliyeti en düşük ve en ulaşılabilir yöntemlerden biri olup başta leishmaniasis olmak üzere birçok hastalığın tanısında kullanılabilecek ticari ürün potansiyeli bulunmaktadır.

***Anahtar Kelimeler:*** *Leishmaniasis, Kâğıt tabanlı mikroakışkan analitik cihazlar (µPAD), Biyosensör, Toner ile test kiti, Nanopartikül*

# ABSTRACT

## Paper-Based Microfluidic Analytical Diagnostic Kit Design for Leishmaniasis

**Ruken DAŞ**

**İstanbul Yeni Yüzyıl University, Science and Engineering Institute**

**Master Thesis, Biomedical Engineering Department**

**Supervisor: Assistant Prof. Dr. Sezen CANIM ATEŞ**

**February 2021, 75 pages**

Paper based biosensors; It is preferred today as a new generation self-powered microfluidic biosensor due to its portability, easy and cheap production. Biosensors, known as paper-based microfluidic analytical devices (μPAD) and used in a wide range of point-of-care analysis (Point-Of-Care-POC) applications in recent years, have started to be used in biomedical applications, especially by replacing traditional diagnotic devices.

Leishmaniasis is a zootonic disease transmitted by infected female sandflies that causes non-healing wounds on the skin and can be fatal if untreated. Clinical methods, molecular methods and various laboratory diagnostic methods are used in the diagnosis of leishmaniasis. Laboratory techniques are often costly and test results take a long time therefore treatments are started late. For this reason, it is important to create a new diagnostic kit against this disease.

In this content, in this thesis, it is aimed to design a paper based microfluidic analytical diagnostic kit. In this thesis, a new fabrication method has been developed for paper-based microfluidic devices by printing the patterns designed on paper using a toner laser printer. Washburn test was performed to examine the capillary flow performance of hydrophilic channels created on paper with the help of toner. Also, the wettability of hydrophobic barriers was determined by measuring the contact angle. In this context, it was conjugated with protein A at 8 different concentrations using both gold nanoparticles and gold nanorods. Unfortunately, in conjugation studies prepared for the diagnosis of leishmaniasis, the desired color intensity could not be reached due to the low concentrations studied due to lack of materials. However, in order to check the operability of the system, ready-made reagents used in the lateral flow method for the diagnosis of SARS-CoV-2 were tested in the μPAD system and it was observed that the system's operability was successful.

Since the fabrication of the system developed within the scope of the thesis study is made with toner, it is one of the lowest cost and most accessible methods so far and has a commercial product potential that can be used in the diagnosis of many diseases, especially leishmaniasis.

***Key words:*** *Leishmaniasis, Paper-based microfluidic analytical devices (μPAD), Biosensor, Toner test kit, Nanoparticle*

# 1. GİRİŞ

Leishmaniasis, insanları ve hayvanları enfekte eden *Leishmania* cinsinin protozoon parazitlerine bağlı olarak çeşitli klinik belirtilerle kendini gösteren yaygın bir zootonik hastalıktır. Enfekte dişi kum sineklerinin, deriden kan emerken bulaştırdıkları ve deride geçmeyen yara izleri oluşmasına neden olan vektör kaynaklı bir hastalıktır. Tedavi edilmediğinde ölümcül olan bu hastalık bağışıklık sisteminin makrofajlarını ve dendritik hücrelerini enfekte eden hücre içi bir patojendir [1].

Leishmaniasis, özellikle gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde ciddi oranlarda görülür. Tropikal hastalıklar arasında morbiditede dördüncü sırada yer alan ve ihmal edilen bu parazitik hastalık, önemli bir halk sağlığı sorunudur. Tropik, subtropik ve Akdeniz havzasındaki 98 'den fazla ülkede endemik olup, yaklaşık olarak 12 ila 15 milyon insanın enfekte olmasına neden olmuştur. 350 milyon insan ise enfeksiyon tehdidi altındadır [2-4].

Yaklaşık 20 farklı türünün hastalığa neden oluğu bilinen Leishmaniasis' in üç ana formu bulunmaktadır. Bunlar; mukokütanöz leishmaniasis (MKL), kutanöz leishmaniasis (KL) ve kala-azar olarak da isimlendirilen visseral leishmaniasis (VL) [4].

*Leishmania* paraziti hücre içinde ve hücre dışında olmak üzere iki farklı morfolojiye sahiptir. Hastalığa vektör olan sineklerin orta bağırsağında ve hücre dışında, kamçıya sahip olup promastigot formda bulunur. Memeli konaklarda ise makrofajlarında oval bir yapıda olup hücre içinde amastigot formda bulunur [5].

VL hastaları ateş, yorgunluk, iştahsızlık ve önemli kilo kaybını içeren kalıcı sistemik enfeksiyon belirti ve semptomları ile başvurur. Hastalığın semptomsuz seyrinde ise kesin VL teşhisi, klinik örneklerde ve spesifik moleküler yöntemlerde parazitlerin doğrudan gösterilmesi ile desteklenir [6]. Özellikle anti-leishmania antikorlarının tespiti genellikle üç teknikle gerçekleştirilir; immünofloresan antikor testi (IFAT), enzime bağlı immünosorbent analizi (ELISA) ve direkt antiglobulin testi (DAT) [7]. Bu testler zaman alıcı ve maliyetli olmakla birlikte, testlerin uygulamaları için deneyimli sağlık çalışanları gereklidir.

Birçok gelişmemiş veya gelişmekte olan ülkelerde laboratuvar ve deneyimli sağlık çalışanları olmadığından dolayı hastalıklar tespit edilemediği için tedavisiz kalmaktadır. Bu durum birçok ölüme sebebiyet vermektedir. Ayrıca hastalığın teşhisi için kullanılan laboratuvar testleri uzun sürdüğünden tedavilere geç başlanmaktadır [8, 9].

Bakım-noktası-testleri (Point-Of-Care-Testing-POCT), hastaların bakım gördüğü yerlerin yakınında laboratuvar dışı personel tarafından hızlı ve kolay bir şekilde testlerin yapıldığı yeni ve ucuz tanı yöntemleridir. Dünya Sağlık Örgütü, ASSURED kısaltması ile bakım-noktası-testleri (Point-Of-Care-Testing-POCT) için elverişli diagnostik testlerin geliştirilmeleri için çeşitli prensipler oluşturmuştur. Bunlar; uygun fiyatlı, hassas, özel, kullanıcı dostu, hızlı ve sağlam, ekipmansız ve ihtiyaç sahiplerine teslim edilir. Bu testler kaynakları sınırlı ortamlarda hastalıkların hızlı ve düşük maliyetli teşhisine imkân sağlamaktadır [10].

Kağıt tabanlı mikroakışkan cihazlar (µPADs), çeşitli analitlerin hızlı bir şekilde kantitatif ölçümlerinin düşük maliyetle gerçekleştirdikleri POC testlerindendir. µPAD'ler kağıt yüzeyine çeşitli tekniklerle hidrofobik bariyerler oluşturarak az miktarda numunenin kağıt üzerinde kılcal kuvvet ile hidrofilik kanal boyunca ilerleyerek kantitatif sonuçlar elde edilmesini sağlayan kağıt tabanlı biyosensörlerdir [11]. Literatürde çok çeşitli µPAD fabrikasyon teknikleri bildirilmiştir. Bunlardan bazıları: mum baskılama [12], fotolitografi [13], plazma işlenmesi [14], kağıt kesme [15], lazer işlenmesi [16].

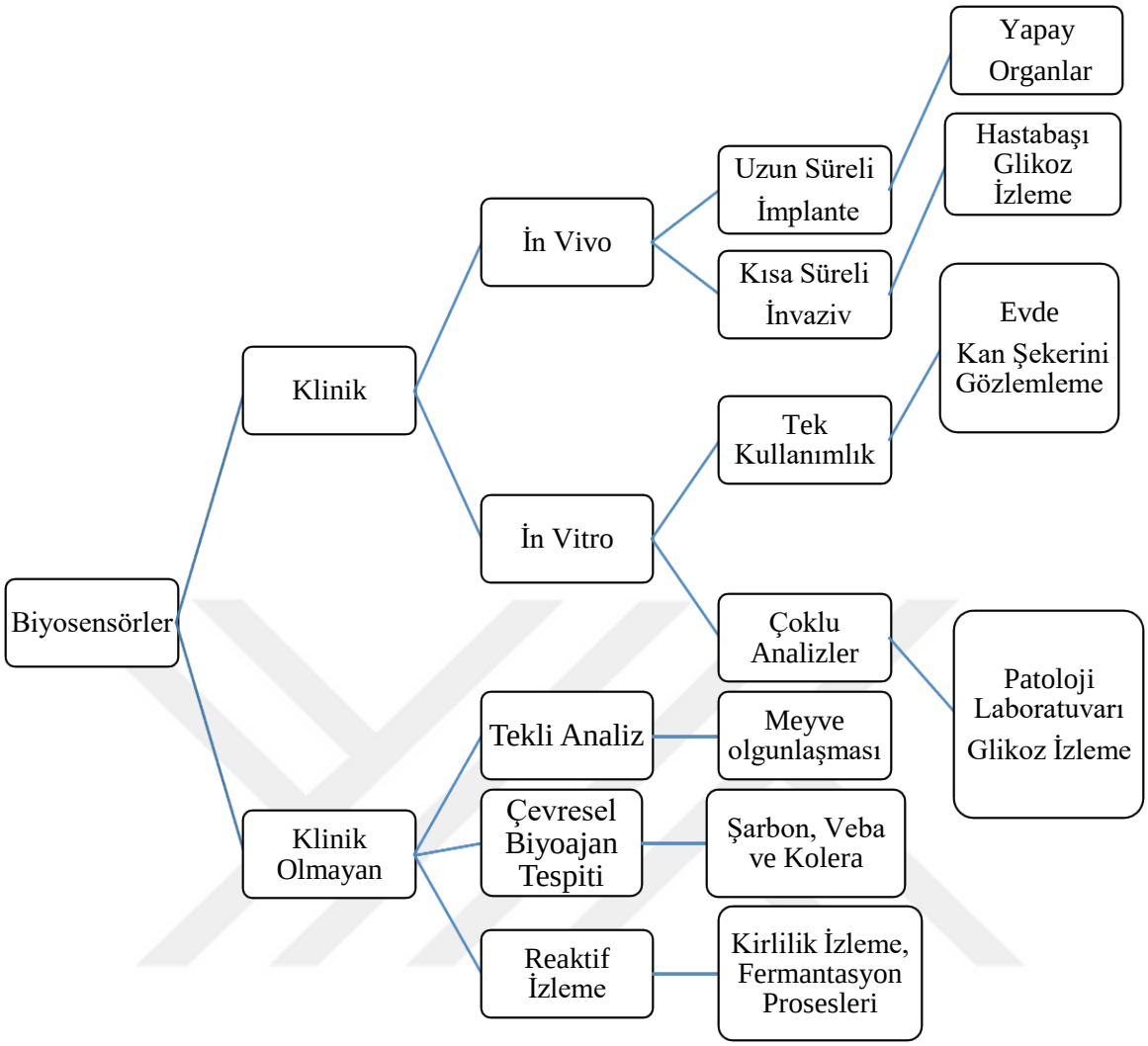
Bu tez çalışmasında mum baskılama üretim modeline alternatif olarak, tasarlanan desenin toner ile kağıt üzerine lazer yazıcıyla baskılama tekniği kullanılarak µPAD üretiminin yapılması amaçlanmıştır. Öncelikle leishmaniasis hastalığının tanısında kullanılmak üzere üretilen kağıt tabanlı kitin, diğer tanı yöntemlerine göre daha hızlı, fabrikasyonu kolay, ekonomik ve az reaktif kullanılarak diagnostik alanında yenilik katması amaçlanmıştır.

# 2. BİYOSENSÖRLER

“Sensör” kelimesi; her şeyi “tanımlamak” anlamına gelen Latince “*sentire*” kelimesinden türemiştir ve ilk etapta duyulduğunda akla beş temel insan duyusu olan: duymak, koklamak, görmek, dokunmak ve tatmak gelir [17]. Yaşamlarını devam ettirmek adına insanlarda olduğu gibi diğer canlılarda da çeşitli algılayıcı yapılar mevcuttur. Örnek vermek gerekirse; suyun içerisinde yaşayan yılan balıkları kendilerine tanıdık gelmeyen nesneleri anında tespit eder böylece kendilerini tehlikelere karşı koruyup nesillerini yıllar boyu devam ettirebilirler. Canlıların bu dış dürtülere karşı oluşturdukları algı mekanizması biyosensörlerin oluşturulması açısından zemin yaratmaktadır [18]. Teknolojik gelişmelerin büyük bir ivme ile artış göstermesi ile mühendislik ve temel bilimler gibi alanlar, biyosensörlerin ilerlemesinde büyük rol oynamışlardır [19].

Genel anlamda biyosensörler; analit denilen analizlenmesi gereken hedef molekülün biyolojik, fiziksel ve kimyasal yollar ile özel olarak reaksiyon gösterdiği biyoaktif bir yapı ile oluşan sinyalin, anlamlı bir ifadeye dönüştürülüp ölçülebilmesi olarak tanımlanabilir [18, 20].

Biyosensörler; "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC) tarafından, *"Kimyasal bileşikleri genellikle elektrik, termal veya optik sinyallerle saptamak için izole edilmiş enzimler, immünosistemler, dokular, organeller veya bütün hücrelerin aracılık ettiği spesifik biyokimyasal reaksiyonları kullanan cihaz. "* olarak tanımlanmaktadır [21]. Tıp ve sağlık alanlarının yanı sıra; ilaç, yapay organlar, gıda güvenliği, endüstriyel atık, tarım ve savunma sanayi gibi pek çok alanda sıklıkla kullanılmaya başlayan ve teknolojinin gelişmesi ile daha duyarlı ve kullanışlı cihazlar haline gelen biyosensörler, çeşitli süreçlerin takibi ve analizlenmesi açısından büyük bir öneme sahiptirler [20, 22, 23]. Ayrıca nanoteknolojik gelişmelerin artması ile birlikte biyosensörlerin mikro/nano boyutlara indirgenip az miktarlarda numuneler kullanılarak daha ekonomik ve hassas sonuçlar elde edilebilmektedir [24]. Nanoteknoloji kullanılarak üretilen yeni jenerasyon biyosensörler sonuçları izleme ve analiz etme konusunda diğer türlerine oranla daha basittir [19].



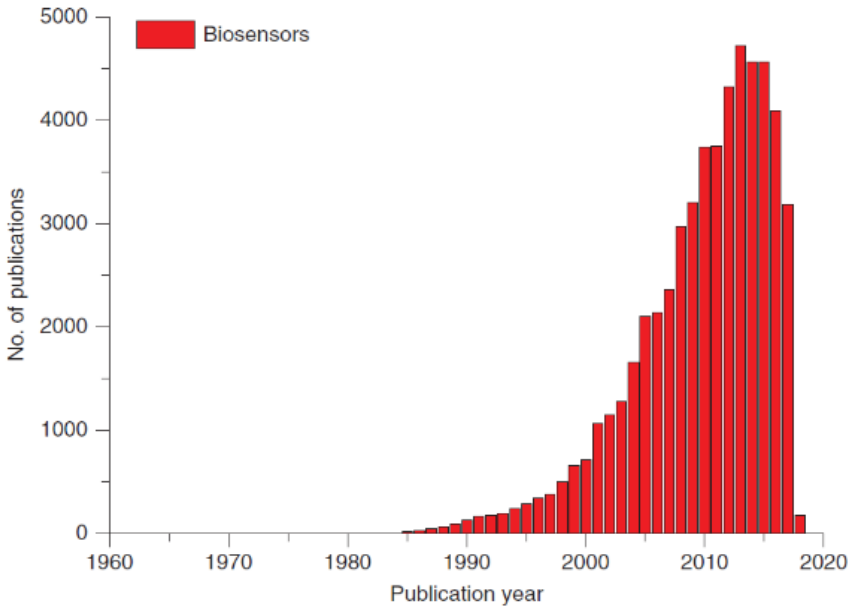

**Şekil 2. 1** Biyosensörlerin uygulamaları alanları [25]

## 2. 2. Biyosensörlerin Tarihi

Biyosensörlerin tarihi 1956 yılında kandaki $O_2$'nin azalma miktarını platin elektrot yardımı ile tespit etmek amacıyla Leland C. Clark tarafından (Ohio, ABD) geliştirilmesi ile başlar [24, 25]. İlk biyosensör cihazı 1962 yılında Clark ve Lyons tarafından, kandaki glikoz miktarını tespit etmek için Glukoz Oksidaz (GOD) enzimini yarı geçirgen diyaliz membranı arayıcılığı ile amperometrik oksijen elektrodunun üst yüzeyine sabitlenmesi ile üretilmiştir [26, 27]. O tarihten itibaren çok çeşitli analitlerin tespit edilip izlenilmesi açısından büyük gelişim sağlanmıştır [28]. 1975'te Yellow Springs Instruments(YSI) tarafından ilk ticari glikoz biyosensör piyasaya sürüldü [24]. Yine aynı yıl Suzuki ve ark. tarafından ilk mikrop bazlı immünosensör geliştirildi [29].

1982 yılında ise Jerome S. Schultz tarafından glikoz tespiti için ilk fiber optik tabanlı biyosensör geliştirildi [30]. 1983 'te ise Liedberg ve ark. tarafından ilk yüzey plazmon rezonans(SPR)immünosensör geliştirildi [31]. Günümüzde ise temel bilimler ile nanoteknolojik gibi çok disiplinli alanlar kullanılarak biyosensörler tasarlanmaktadır [24]. Özellikle son zamanlardaki hızlı gelişimi ile sıklıkla kullanılan Lab-on-chip (LOC) cihazlarının çok çeşitli vücut sıvılarının yüksek hassasiyetle ve gerçek zamanlı olarak tespit edilmesi sağlanmıştır [28]. Bununla beraber neredeyse her türlü analitin hızlı, ekonomik ve hassas bir şekilde ölçülmesini sağlayan kâğıt tabanlı biyosensörler tasarlanmaktadır.

Şekil 2. 2'de, 2020 yılana kadar olan biyosensörler ilgi ilgili yayımlanmış yayınların yıllara göre miktarlarını ifade etmektedir.

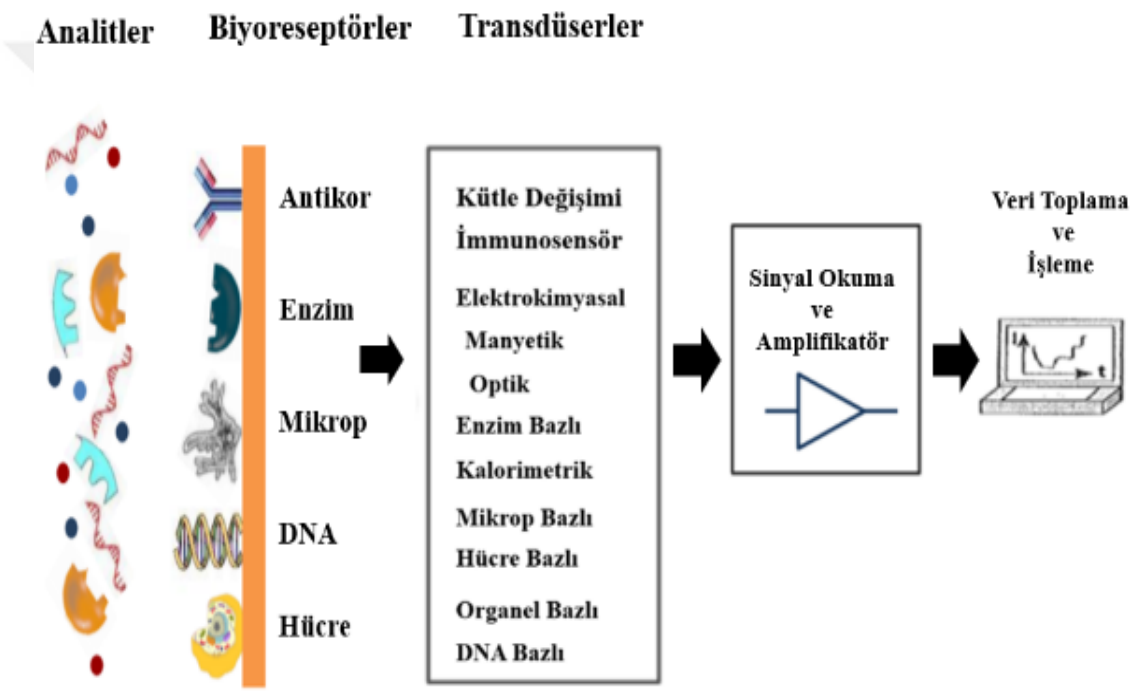



**Şekil 2. 2** Biyosensörlerde yıllara yöre yapılan yayınlar [33]

## 2. 3. Biyosensörlerin Yapısı ve İşlevleri

Genel olarak biyosensörler; biyoreseptör (biyoalgılayıcı) ve transdüser(dönüştürücü) adı verilen iki temel elemandan oluşmaktadır [32]. Biyoreseptörler hedef analiti (virüs, nükleik asitler, hormonlar, enzim substratı gibi) tanıyıp spesifik bir etkileşime giren immobilize edilmiş duyarlı biyolojik komponentlerdir [26]. Biyoreseptörler tespit edilecek analit maddeye uygun olacak şekilde enzim, doku, antikor ve hücre gibi

biyobileşenler kullanılabilir. Görevi ise hedef analiti algılayıp spesifik bir bağlanma/etkileşim gerçekleştirerek oluşacak değişimi transdüser aracılığı ile anlamlı bir sinyale dönüştürüp ölçülebilmesini sağlamaktır [33]. Transdüser ise biyoreseptörün seçiciliği sayesinde hedef analit ile etkileşimi sonucunda oluşan biyolojik/ kimyasal sinyallerin ölçülebilir bir forma dönüştürmeyi sağlamaktadır [26, 32]. Transdüser seçimi analit ile biyoreseptör arasındaki biyokimyasal/ fizikokimyasal reaksiyonun sonucunda gerçekleşen sinyalin ölçülüp iletilebilmesi için elektrokimyasal, manyetik, optik, piezoelektrik esaslı sistemler ile yapılabilir [33]. Şekil 2. 3'de bir biyosensörün çalışma prensibi şematize edilmiştir.

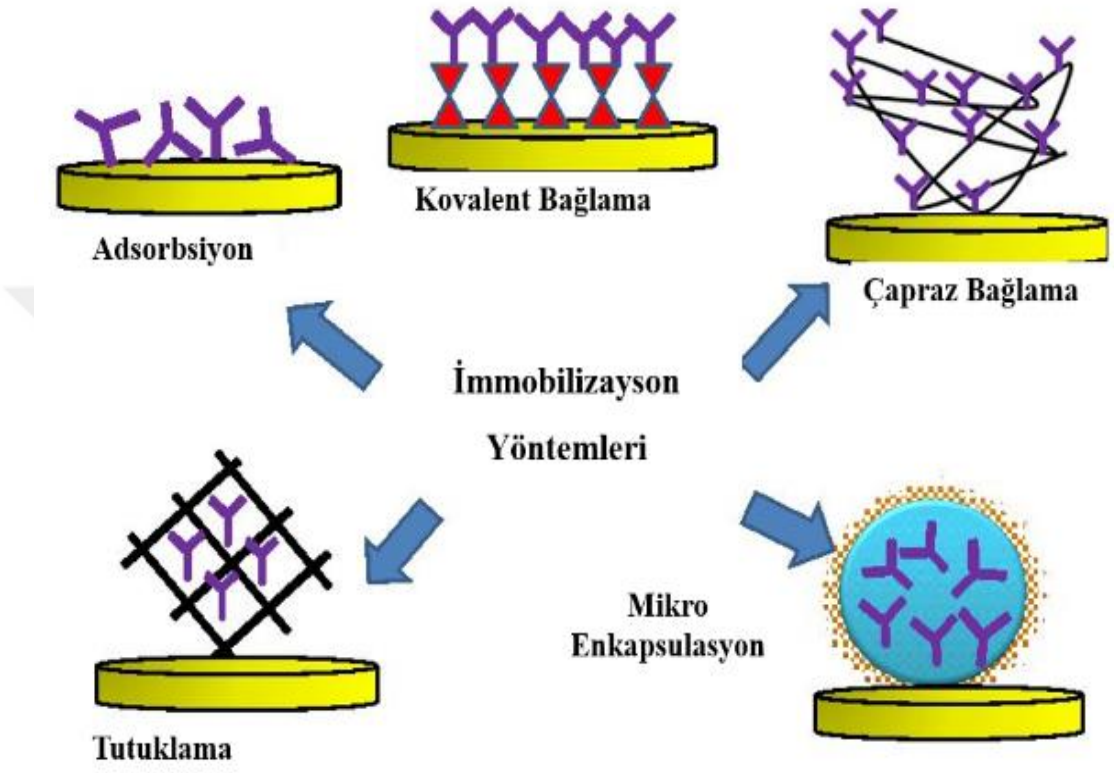



**Şekil 2. 3** Biyosensörlerin yapısı ve çalışma mekanizması [36, 37]

Biyoreseptörün, transdüser yüzeyine uygun bir yöntemle sabitlenmesi işlemine immobilizasyon denir. Tasarlanacak olan biyosensörün kompanentleri belirlendikten sonra biyoreseptörün yapısına uygun immobilize yöntemi seçilmelidir. Bu immobilizasyon işlemi biyosensörün ömrünü belirlemektedir. Çünkü transdüser yüzeyine sabitlenecek olan biyoreseptörün tutunma süresi ile biyosensörün ömrü doğru orantılıdır. Genel olarak 5 yaygın metot kullanılmaktadır.

Bunlar;

1. Adsorbsiyon
2. Mikroenkapsulasyon
3. Tutuklama
4. Çapraz Bağlama
5. Kovalent Bağlama [23, 34].




**Şekil 2. 4** İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi [39]

## 2.4. Biyosensörlerin Avantajları ve Dezavantajları

Biyosensör cihazlar diğer diagnostik cihazlar ile rekabet halindedir ve bu durum biyosensörlerin gelişimini hızlandırmaktadır [35]. Biyosensörlerin diğer cihazlara göre avantajları vardır. Bunlar:

- Test sonucuna cevap verme süresi kısadır.
- Polar olmayan molekülleri ölçebilir.
- Biyoreseptör eleman analite uygun olarak seçildiği için yüksek afinite göstererek numune içindeki analit ile etkileşime girme konusunda kararlıdır.
- Ekonomik olması ve taşınabilirliğinin mümkün olması farklı ortamlarda kullanılmasına imkân verir.

- Tek kullanımlık biyosensör türlerinin kullanımı kolay olduğu için tecrübeli sağlık personel ihtiyacını ortadan kaldırır.
- Biyouyumlu biyosensörlerin in vivo (canlı içinde) ölçümlerde daha avantajlıdır.

Dezavantajları ise;

- Biyosensörler biyolojik elemanlar içerdiği için denatüre olma nedeni ile ısı sterilizasyonu yapılmamaktadır.
- Biyosensörlerin üretiminin uzun zaman alması.
- Biyoreseptörün transdüser yüzeyi üzerinde uzun süre immobilizasyonu sorunludur.
- Enzim, antikor, DNA gibi biyolojik elemanların stabilitesinin pH, sıcaklık, gibi çevresel koşullar altında değişebilmesi [34-36].

## 2.5. İdeal Bir Biyosensörün Özellikleri

Biyosensörler, en karmaşık numunelerde bile hızlı, gerçek zamanlı ölçümler, yüksek anfinite, seçicik, özgünlük gibi özelliklerini sürdürmelidir [37]. Genel olarak ideal bir biyosensörün temel özellikleri [34, 38, 39];

- Duyarlılık

Cihazın, analit miktarının değişimi halinde anında yanıt vermesidir. Cihazın duyarlılığı yüksek ise analitin derişim değişikliği hızlı bir şekilde görülür.

- Seçicilik

Biyosensöre sabitlenmiş biyoreseptörün sadece hedef analite karşı özgün olmasıdır. İmmobilize edilmiş biyoreseptör numune içinde yalnızca etkileşime gireceği molekül ile bağ kurarak yüksek seçicilik göstermiş olur.

- Ölçüm aralığı

Cihazın ölçebileceği optimum derişim aralığıdır. Ölçümü yapılacak olan analit konsantrasyonu uygun miktarda olmalıdır aksi takdirde cihaz sonuç vermeyebilir.

- Kararlılık

Biyoreseseptörün transdüser yüzeyine immobilizasyon sonrası çevresel koşullardan (ph, sıcaklık, nem vb.) etkilenmeyip stabilitesini korumasıdır.

- Ömrü

Cihazın tekrar tekrar kullanıldığında performansında herhangi bir değişim olmadan kullanılması ömrünü belirler.

- Hızlı cevap

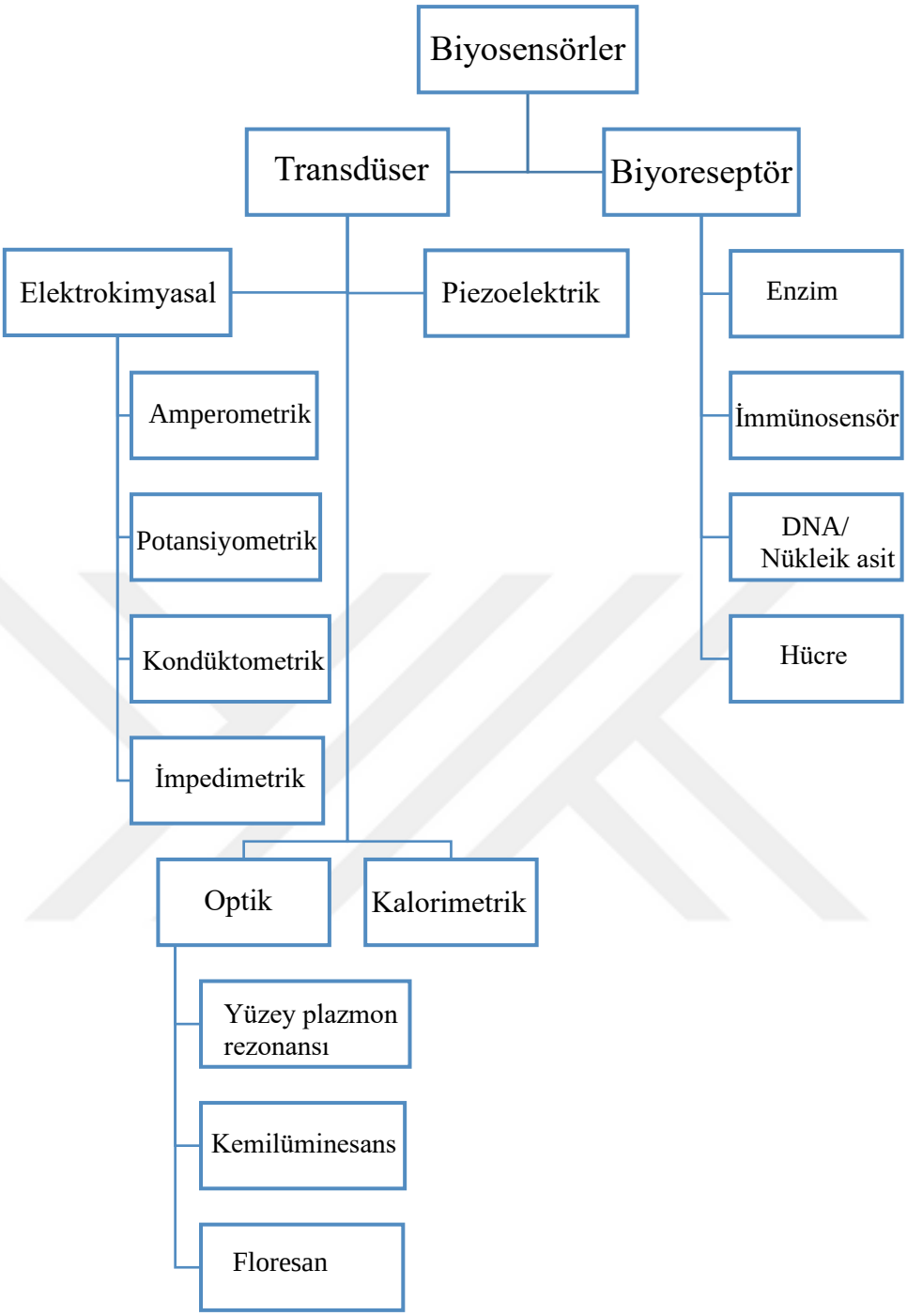
Biyoreseptör ile analit etkileşimi sonrası oluşan değişimin biyosensör tarafından kısa bir zaman içinde vereceği yanıttır. Cihazın cevap verme süresi çeşitli etmenlere göre değişebilmektedir. Bunlardan bazıları; konsantrasyonun karıştırılma süresi, derişimi, sıcaklık ve pH' dır.

- Kolaylık ve ekonomiklik

İdeal olan bir biyosensörün kullanımı basit ve anlaşılır olmalıdır, ayrıca ulaşılabilirlik açısından maliyeti uygun olmalıdır.

## 2.6. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörleri çalışma mekanizmalarına göre, tasarımlarına göre veya kullanım durumuna göre sınıflandırma yapmak mümkündür [20]. Tasarımına göre sınıflandırma yapıldığında biyosensörler; transdüser türüne göre veya biyoreseptör türüne göre sınıflandırma yapılabilir[40, 41]. Kullanım durumu göz önüne alındığında ise biyosensörler; tek kullanımlık, ara kullanımlık ve sürekli kullanımlık olmak üzere sınıflandırma yapılabilir. Ayrıca analit-biyoaktif madde ilişkisine göre sınıflandırma yapıldığında biyosensörler; biyoanfinite esaslı ve biyokatalit esaslı biyosensörler olarak sınıflandırılabilmektedirler [20]. Şekil 2. 5'de biyosensörlerin transdüser ve biyoreseptör çeşidine göre sınıflandırılması gösterilmektedir.




**Tablo 2. 1** Biyosensörlerin sınıflandırılması [33, 34]

### 2.6.1. Kullanılan Biyoreseptör Türüne Göre Biyosensörler

Biyoreseptör türüne göre sınıflandırılan biyosensörler transdüser yüzeyine immobilize edilen biyoreseptöre göre belirlenmektedir. Bunlar genellikle enzim, antikor, antijen, nükleik asitler, doku, hücre gibi biyolojik komponentlerdir.

### 2.6.1.1 Enzim Tabanlı Biyosensörler

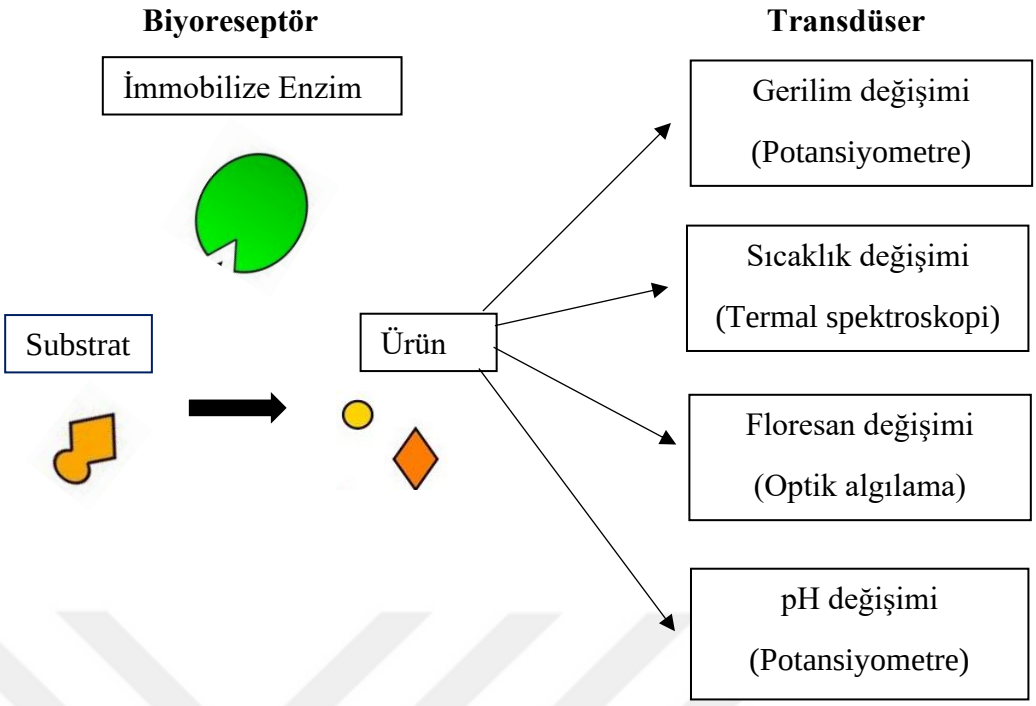
Clark ve Lyons tarafından, 1962'de kandaki glikoz yoğunluğunu ölçmek için yarı geçirgen bir diyaliz membranı aracılığı ile amperometrik oksijen elektrotun yüzeyine glikoz oksidaz (GOD) enzimini immobilize edilerek ilk enzim tabanlı biyosensör üretilmiştir [27]. Enzim tabanlı biyosensörlerde istenilen ürünün yakalanması için spesifik enzimler kullanılır yani substrat ile anahtar-kilit ilişkisi içerisinde olur [42]. Tablo 2. 2'de biyosensörler için kullanılan altı farklı enzim çeşidi ve fonksiyonları belirtilmiştir.

**Tablo 2. 2** Enzim kategorisi ve fonksiyonları [35]

| Enzim Kategorisi | Fonksiyonlar |
|---|---|
| Oksidoredüktazlar | Yükseltgenme/ indirgenme reaksiyonları |
| Transferazlar | Moleküler grupların bir molekülden diğerine transferi |
| Hidrolazlar | hidrolitik bölünme |
| Lizazlar | C — C, C — O, C — N bağlarının oksidasyon veya hidroliz dışındaki başka yollarla bölünmesi |
| İzomerazlar | Molekül içi yeniden düzenleme |
| Ligazlar | İki molekülün birleştirilmesi |

Enzim tabanlı biyosensörler genel olarak üç bölümden oluşmaktadır: biyoreseptör (enzim), dönüştürücü ve sinyal işleme elemanı. Enzimlerin dönüştürücü yüzeyine immobilizasyonu aktif bölgenin kararlılığının sağlanması ve enzimin duyarlılığını ve seçiciliğini koruması yönünden üretimin en önemli aşamasıdır [43].

Enzimlerin substrat ile birleşimi sonucunda ortaya bir ürün çıkmaktadır elde edilen enzimatik ürün sırasıyla; pH, sıcaklık, flüoresans ve gerilim parametrelerin değişimleri sonucunda belirlenir. Bu değişen parametre çeşitlerine göre transdüser belirlenir ve oluşan sinyal transdüser tarafından değiştirilerek dijital olarak algılanması sağlanır [42].

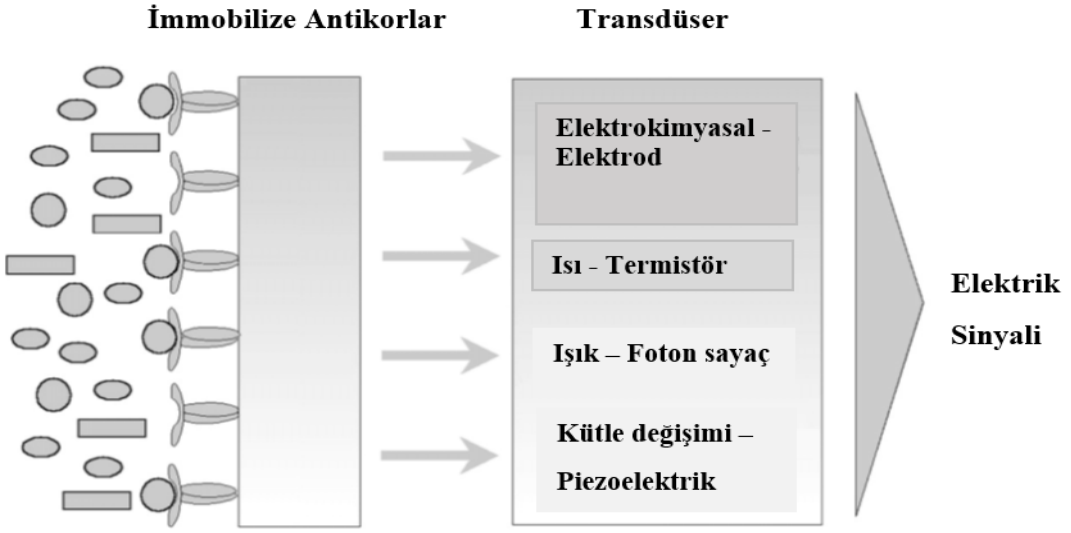



**Şekil 2. 5** Enzim tabanlı biyosensörlerin şematik gösterimi [47]

### 2.6.1.2 İmmünosensörler

İmmunoassay (immünolojik test) teknikleri, antijenlerin yüzey epitoplarına karşılık gelen antikorlar ile birleşme sağlayarak point-of-care testing (hasta başında test) sonuç veren testlerdir. Bu testlerin yüksek verimde tarama yapma, gerçek zamanlı analiz, gelişmiş hassasiyet gibi avantajları mevcuttur. Antikorların elektrot, optik fiber, yarı iletken yonga üzerine immobilize edilerek üretilen immunosensörler ticari olarak; klinik, gıda ve çevre gibi birçok alanlarda bu uygulamalara yoğunlaşılmıştır [44-47]. İmmunosensörler iki aşamadan meydana gelirler.

İlk aşama algılamak için reseptör yüzeyinde oluşturulan spesifik antijen-antikor bağlanma reaksiyonu, ikinci aşama ise reaksiyon sonucu oluşan sinyalin; elektrokimyasal, optik, piezoelektrik, kalorimetrik gibi transdüser elemanları ile dönüştürme işlemidir [47]. İmmünosensör tasarımı, antijen-antikor birleşiminde ortaya çıkan parametreye göre belirlenmektedir. Öyle ki, sıcaklık değişimi için termistör, ağırlık değişimi için piezoelektrik, oksijen değişimi için amperometrik sensörler kullanılabilir.




**Şekil 2. 6** İmmünosensörlerin genel tasarım şeması [53]

İmmünosensörler antijen-antikor bağlanmasının, etiketli veya etiketsiz olmasına göre iki kategoriye ayrılabilmektedir:

- Etiketli Format

Bu formatta inkübasyon aşaması sırasında, bağlı antikor veya analit miktarını belirler. Yaygın olarak kullanılan etiketler; enzimler (Glikoz oksidaz, bayır turpu peroksidaz (HRP), β-galaktosidaz, alkalin fosfataz), nanopartiküller ve floresan veya elektrokemilüminesan probları içerir. Genellikle sandviç immunoassay ve yarışımlı immunoassay diye iki farklı yöntemine dayanmaktadır. Bu yöntemler genellikle elektrokimyasal, piezoelektrik veya optik bazlı transdüserlerde kullanılır.

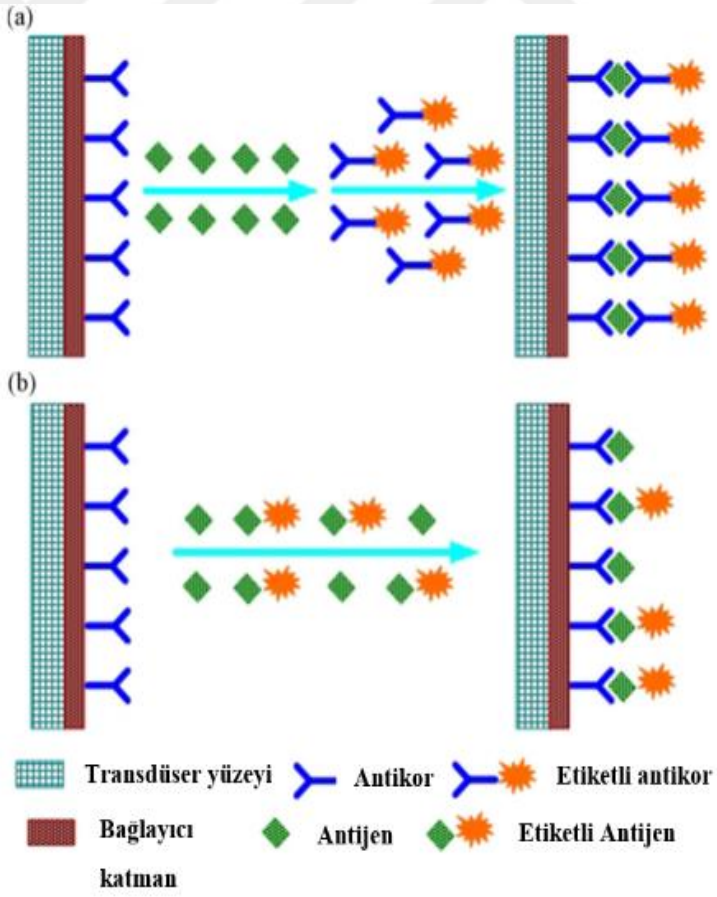
1. *Sandviç İmmunoassay Yöntemi*

Bu yöntem iki adımdan oluşmaktadır. İlk adım birincil antikoru, seçilen transdüser üzerine immobileze ederek hedef analit ile bağ yapmasını sağlamaktır. İkinci adımda ise bir enzim veya floresan molekülü kullanılarak ikincil antikor etiketlenir ve birincil antikor ile birleşmiş olan analite bağlanarak sandviç formunda bir immünokompleks oluşur. Analit yoğunluğu arttıkça etiketli antikordan gelen sinyal artar. Bu analiz yöntemi, hedef analitin en az iki antijenik bölgeye sahip olması ile mümkün olacağından dolayı büyük moleküllü analitlerin (protein, hücre, bakteri vb.) tespitinde kullanılmaktadır. Örneğin bakteri gibi büyük moleküllü bir mikroorganizmanın tespiti

kütle değişimi ile kolayca belirlenebileceği için akustik transdüser kullanımı daha yararlı olacaktır.

1. *Yarışımlı İmmunoassay Yöntemi*

Birden fazla çeşit yarışımlı immünoassay yöntemleri vardır. Sandviç modele göre daha çok tercih edilen yarışımlı immünoassay yönteminde, enzim veya lipozom ile etiketlenen antijen transdüser yüzeyine immobilize edilmiş antikorun paratop denilen bağlanma bölgelerine bağlanmak için etiketli olmayan analit ile rekabet halindedir. Hedef analit yoğunluğu az olursa etiketli analit antikorlara daha fazla bağlanır ve sinyalde yükseliş meydana gelir. Tersi durumda ise hedef analit miktarı fazla olacağından etiketli antijenlerin bağlanmasını engeller ve böylelikle antikora bağlanan analit miktarı artar ve sinyalde düşüş meydana gelir. Genelde küçük moleküllerin belirlenmesinde bu yöntem kullanılmaktadır [48, 49]. Şekil 2. 7'de yarışımlı ve sandviç immünoassay test yöntemlerinin şematik hali gösterilmiştir.



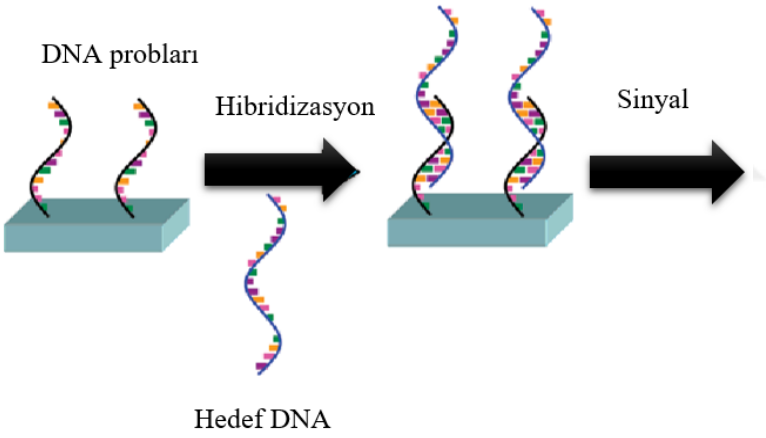

**Şekil 2. 7 a)** Sandviç Model **b)** Yarışımlı Model [55]

- Etiketsiz Format

Direkt immünoassay testleri olarak da adlandırılan bu formatta, transdüser yüzeyine immobilize edilen antikorların, hedef antijenlere direkt olarak bağlanması ile meydana gelen değişimin algılanması temeline dayanmaktadır [50].

### 2.6.1.3 DNA/ Nükleik Asit Tabanlı Biyosensörler

Son zamanlarda DNA bazlı biyosensörler çeşitli hastalık yapıcı moleküllerin tespiti için sıklıkla kullanılmaktadır. Kısa nükleik asit dizilimlerine prob adı verilmektedir. Patojenin tespiti için seçilen prob sekansının, patojenin DNA sekansı ile tamamlayıcı bağ yapma olayına hibridizasyon denilmektedir. Bu sayede patojen kısa bir sürede tespit edilmektedir. Günümüzde DNA hibridizasyon sensörlerinde esas olarak sentetik oligonükleotidler (ODN) prob olarak kullanılır ve transdüser yüzeyine immobilize edilmesi için tiyoller, disülfid veya aminler eklenir. Daha sonra hibridizasyon olayı gerçekleşir [33, 51].




**Şekil 2. 8** Bir DNA sekansının saptanmasında yer alan adımlar [58].

DNA bazlı biyosensörlerin antikor ve enzim bazlı olan biyosensörlere göre çok sayıda avantajı vardır. Bunlar [22]:

- Hedef analite karşı yüksek afinite özellikleri vardır. Öyle ki yapılan bir çalışmada 5 ml numune içinde olan bir bakteriyi %100 hassasiyet ile saptamıştır.
- Çok fazla sayıda sentezlenebilir.
- Oda sıcaklığında korunabilir ve stabil yapıdadırlar.

### 2.6.2. Dönüştürücüye Göre Biyosensörler

Biyosensörler çok farklı çeşitlerde sınıflandırılabilirler. En yaygın sınıflandırma çeşidi ise transdüser elemanına göre olan sınıflandırmadır. Şöyle ki; biyoreseptör ile analitin bağ yapmasından sonra oluşan sinyalin anlamlı ve ölçülebilir bir sinyale dönüştürülmesinden sorumlu biyosensör elemanına göre sınıflandırılmasıdır. Bunlar; elektrokimyasal, optik, kolorimetrik ve piezoelektrik tabanlı biyosensörlerdir [19].

#### 2.6.2.1. Elektrokimyasal Biyosensörler

Bu sensör türünde, biyoreseptör analiti tanır ve biyokatalitik reaksiyon gerçekleşir. Transdüksiyon (elektrokimyasal tepkiler) ve sinyal işleme elemanları oluşan biyolojik değişikliği elektrik sinyaline, voltaja veya akıma dönüştürür ve görüntülenmesini sağlar. Hedef analit miktarı ile oluşan sinyalin gücü doğru orantılıdır. Analit miktarı artarsa, oluşan sinyal de artar. Küçük molekül yapılı maddelerin tespiti için kullanılır. Genellikle katalitik tepkimelerde tercih edilen elektrokimyasal biyosensörlerin temel bileşeni enzimatik elektrotlardır [52-54].

Biyoreseptör olarak enzimlerin kullanıldığı biyokatalitik sensörler basit tasarımlı ve ekonomik yapılardan oluşmaktadır. Çok hassas olan bu Biyosensörler kullanılan dönüştürücü çeşidine göre; amperometrik, potansiyometrik, impedimetrik ve kondüktometrik olmak üzere sınıflandırılabilir [51, 54].

- Amperometrik Biyonsensörler

Amperometrik biyosensörler, elektrot üzerinde elektrokimyasal olarak aktif olmayan analitlerin enzim, antikor, DNA kullanılarak ve sabit bir potansiyel uygulanarak elektrokimyasal olarak aktif (indirgenme veya oksidasyon) hale gelmesi ile oluşan sinyalin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Direncin değişmesi ile oluşan sinyalin büyüklüğünde değişmeler meydana gelir [51, 55].

Analit yoğunluğu arttıkça veya azaldıkça elektriksel akımda artıp veya azalmaktadır. Bu ilişkiyi Cottrell denklemi üzerinden gösterilebilir [56]:

$$i = \frac{nFAc_j^0\sqrt{D_j}}{\sqrt{\pi t}} \qquad \text{Denklem 1}$$

Burada;

i = ölçülecek akım

n = transfer olan elektron sayısı

F = Faraday sabiti, 96.485 ° C / mol

A = elektrot alanı

$c_j^0$= analit yoğunluğu

$D_j$ = difüzyon katsayısı

t = potansiyel uygulandıktan sonra geçen süre

- Potansiyometrik Biyosensörler

Potansiyometrik biyosensörlerde, oluşan bir reaksiyonda iyonik ürün nedeni ile hücreye herhangi bir akım vermeden, çalışma elektrotu ile referans elektrotu arasında potansiyel fark meydana gelir. Referans elektrot sabit potansiyel gösterirken çalışma elektrotu daha duyarlı modifiye edildiği için iyonun aktivitesine göre değişim göstermektedir. Potansiyel fark iki elektrot arasında akımın geçmediği anda ölçülür. Elektrotlar arasında ölçülen potansiyel fark Nernst eşitliği ile ifade edilir ve tanımlanan iyon (αi) aktivitesine bağlıdır. Buna göre Nernst eşitliği:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \times \ln \alpha i \qquad \text{Denklem 2}$$

E = Çalışma elektrodu potansiyeli

E° = Standart elektrot potansiyeli

R = Gaz sabiti, 8,314 J.mol-1.K-1

T = Sıcaklık, Kelvin (0 °C için 273,15 K)

F = Faraday sabiti = (96486 J. volt-1)

n = Alınan-verilen elektron sayısı veya membrandaki aktif iyon yüküdür.

Elektrotlar ölçüm için numuneye batırılır veya numune ile arasına bir membran yerleştirilerek bilinen bir elektrolit çözeltisine yerleştirilir. Bu biyosensör cihazları için en sık kullanılan pH elektrotları ve diğer iyon seçici elektrotlardır [57, 58].

### 2. 6. 2. 2. Piezoelektrik Biyosensörler

Kuvars kristal mikroterazi (QCM) oldukça hassas kütle ölçümleri yapan biyosensör çeşididir. QCM, karşıt yüzeylerinde bir veya daha fazla metal elektrot çifti içeren ince kuvars disklerden oluşmaktadır. Böyle bir malzemeye mekanik stres uygulandığında, kristal kafesinin deformasyonu kristal boyunca elektriksel bir potansiyel ile sonuçlanan bir net dipol oluşturur. Pieozoelektrik elektrotun üzerinde olan analit ve biyoreseptörün etkileşmesi, kristal bölümün dielektrik mukavemetinin artmasına ve elektrik frekansının salınımı azalmasına neden olarak kütle değişiminin ölçülmesini sağlar. Kütle değişiminin oluşması için numunedeki hedef analitin biyoreseptör ile etkileşim yapması gerekmektedir. Kristal kısmına gerilim uygulandığında mekanik olarak kesme modunda salınıma yol açar. Kuvars kristal rezonatörün frekans kayması (Δf) ile birim yüzey alanı başına kütle değişimi arasındaki ilişki Sauerbrey denklemi ile açıklanabilir:

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{A(\mu_q \rho_q)} \times \Delta m \qquad \text{Denklem 3}$$

$\mu_q$: Kesme modülü (2.95 $10^{11}$ dyn/ cm2)

$\rho_q$: Kuvarsın yoğunluğu (2.65 g/cm3)

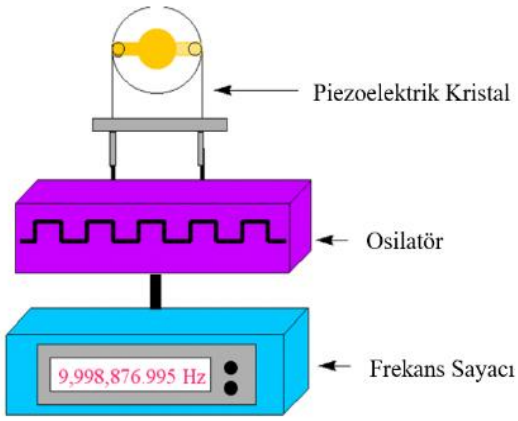
$f_0$: Kuru kristalin temel salınım frekansı

Sauerbrey denklemine göre kütle ve frekans değişimi doğru orantı göstermektedir. Kuvars kristalinin yüzeyi üzerinde analit-biyoreseptör birleşimi arttıkça kuvars kristalinin salınım frekansı azalır veya bu durumun tersi de geçerlidir [59-62].

Piezoelektrik biyosensörleri, akustik dalganın yayılmasına bağlı olarak, bulk akustik dalga (BAW) ve yüzey akustik dalga (SAW) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır [62].

QCM' nin en temel avantajları; hızlı sonuç vermesi, steril edildikten sonra tekrar kullanılabilir, etiketsiz olması, minimum numuneye ihtiyaç duyması ve kolayca çalıştırılmasıdır. En temel dezavantajları ise; numunenin yoğunluk, sıcaklık, viskozite

ve elektrik iletkenliği gibi değişimlerin sonuca etki etmesidir. Ayrıca kalibrasyon ihtiyacının olması da dezavantajlar arasında sayılmaktadır [63].



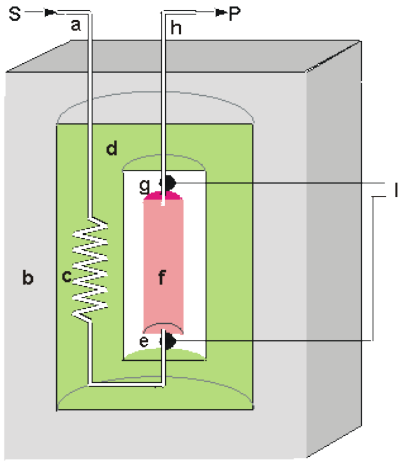

**Şekil 2. 9** Piezoelektrik biyosensör ve ölçüm sistemi [71]

### 2. 6. 2. 3. Kalorimetrik Biyosensörler

Termometrik veya termal biyosensörler de denmektedir. Genellikle ekzotermik reaksiyonların sonucunda açığa çıkan ısıya bağlı olarak sıcaklığı ölçer. Analiz edilmek istenen numune içindeki hedef analit enzim ile ekzotermik reaksiyona girerek numunenin sıcaklığında değişim meydana getirir. Bu sıcaklık değişimi kalorimetrik sensör algılar ve anlamlı bir sinyale dönüştürür. Reaksiyonlar gözlemlenerek entalpi ölçülür ve bu da analit miktarının tayin edilmesini sağlar. Sıcaklık farkı genellikle 1°C civarında seyretmektedir fakat 0,0001°C gibi düşük sıcaklık farklarını tespit edecek kadar duyarlı sensörlerdir [64, 65].

Çevresel koşullar oluşan reaksiyon ısısını değiştirmemesi için reaksiyonun ısı yalıtımlı bir kutu içinde olması gerekmektedir [64].

Şekil 2. 10'da görüldüğü gibi *"Numune (a) girişinden girerek ısı yalıtımlı kutudan (b) bir alüminyum blok (d) içindeki ısı değiştiricisine (c) geçer. Daha sonra referans termistörü (e) geçerek reaksiyonun meydana geldiği biyokatalizörü içeren paketli yatak biyoreaktörüne (f, 1ml hacim) akar. Sıcaklıktaki değişim termistör (g) tarafından belirlenir ve çözelti atığa (h) geçirilir. Harici elektronikler (l), termistörler arasındaki direnç ve dolayısıyla sıcaklıktaki farkı belirler "* [66].




**Şekil 2. 10** Kalorimetrik biyosensörün şematik diyagramı [74]

Termometrik biyosensörler, enzime bağlı immünosorbent testlerinin (ELISA) bir kolu olarak kullanılabilir ve yeni bir teknik olan termometrik enzime bağlı immünosorbent (TELISA) olarak adlandırılabilir [67].

Kolesterol, kolesterol oksidaz enzimi tarafından oksitlenerek ısı açığa çıkarır ve bu ısı termistör sensörü kullanılarak ölçülebilir. Tablo 2. 3' de termistör sensörü kullanılarak ölçülebilen analit ve etkileşime girdiği enzim gösterilmektedir [67].

**Tablo 2. 3** Enzim katalizli reaksiyonların ısı çıkışı (molar entalpiler) [75]

| **Reaktif** | **Enzim** | **Isı Çıkışı** $-\Delta H$ **(kJ x mol$^{-1}$)** |
|---|---|---|
| Kolesterol | Kolesterol oksidaz | 53 |
| Esterler | Kimotripsin | 4-16 |
| Glikoz | Glikoz oksidaz | 80 |
| Hidrojen peroksit | Katalaz | 100 |
| Penisilin G | Penisilinaz | 67 |
| Peptidler | Tripsin | 10-30 |
| Nişasta | amilaz | 8 |
| Sakaroz | invertaz | 20 |
| Üre | üreaz | 61 |
| Ürik asit | ürikaz | 49 |

### 2. 6. 2. 4. Optik Biyosensörler

Yüzey plazmon rezonansı, dalga kılavuzu ve rezonant aynalardan yararlanan optik bazlı biyosensörlerin yüzeyinde, uygun yöntemlerle immobilize edilmiş biyoreseptör ile hedef analit etkileşimi sonrası yüzeye yakın ortamın kırılma indisi değişir. Analitin, absorpsiyon, yansıtma, emisyon veya interferometrik gibi optik özelliklerinde değişimler meydana gelir ve bu değişimleri optik biyosensör algılar ve fotodedektör yardımı ile kaydeder. Daha sonra anlamlı bir elektrik sinyaline dönüştürülür [68, 69].

Optik bazlı biyosensörler için iki temel yöntem uygulanmaktadır. Bunlar; floresan bazlı tespit ve etiketsiz tespit yöntemleridir. Floresan bazlı tespitte floresan bazlı boyalar kullanılarak hedef analit veya biyoreseptör molekülleri etiketlenir. Analit ve biyoreseptör etkileşimi sırasında floresan yoğunluğu artar. Etiketsiz tespitte ise herhangi bir etiketleme uygulaması yapılmaz. Biyoreseptör ve hedef analit etkileşimi sonucunda biyoreseptörde doğal yollarla ortaya çıkan optik değişimler sayesinde sinyal algılanır. Bu değişimler, biyoreseptörün; emisyon, absorbans, polarizasyon veya lüminesans bozulma sırasında oluşur [69, 70].

Optik tabanlı biyosensörlerin duyarlı olması, nano boyuta kullanımı ve maliyet açısından avantajlı olması, optik biyosensör pazarını yönlendiren temel faktörlerden bazılarıdır. Yeni teknolojiler ile geliştirilen biyosensörlerin aksine optik tabanlı biyosensörler aşağıdaki yeniliklerin bazılarını gerçekleştirme konusunda diğerlerinden daha ön sıralarda yer almaktadır. Bunlar;

- Aynı anda birden fazla analiti tespit edebilen ve izleyebilen biyosensörlerin geliştirilmesi
- Lab-on-chip teknolojisi ile uyumlu olarak geliştirilmesi
- Biyosensörler arasında standardizasyon ve birçok ürünle ile birlikte çalışabilirliği
- Kablosuz seçeneklerinin kullanılabilirliği
- Biyolojik algılama bilgilerinin gerçek zamanlı olarak izlenmesi ve iletilmesi
- Analiz ve kontrol yoluyla sensör odaklı otomatik karar analizi [71].

# 3. MİKROAKIŞKAN BİYOSENSÖRLER

Analitik ve biyoanalitik kimyadaki test yöntemlerinin minyatürleştirmesi ile mikrofabrikasyon teknolojileri (MEMS veya MTS) 1990'lı yılların başlarında kavramsal olarak sunulmaya başlamıştır. Mikroakışkanlar ilk gelişim yıllarında çoğunlukla mikro-elektronik alanlarında kullanılan cam, kuvars veya silikon gibi malzemeler kullanılarak üretilmeye başlanmıştır. Daha sonra kontamine riskine karşı tek kullanımlık malzemeler kullanılarak üretilmesi kararlaştırıldı. Böylelikle polimer bazlı malzemeler kullanılarak mikrofluidik sensörler imal edilmeye başlandı [72].

Üretim kolaylığı, fiziksel özellikleri ve uygun maliyetli gibi birçok avantaja sahip olan Polidimetilsiloksan (PDMS) mikrofluidik cihaz imalatında en yaygın kullanılan malzemedir. Cam, silikon ve diğer sert malzemelerin aksine hava geçirgen yapıya sahip olan PDMS ayrıca hücre kültürü için uygun yüzey özellikleri göstermektedir. Aynı zamanda yüksek elastikiyet özellik gösteren PDMS araştırma laboravurlarının en popüler malzemesi haline gelmiştir [73, 74].

Mikrofluidik sistemlerde kütle ve ısı hareket mesafeleri kısa olduğu için reaksiyonların gerçekleşme süresi diğer yöntemlere göre daha erken tamamlanmaktadır. Mikrofluidik kanallardaki düşük Reynolds sayısı nedeni ile laminer akış görülmekte ve büyük yüzey/ hacim oranları nedeni ile kılcallık etkili olmaktadır. Mikroakışkan sistemler, karmaşık ve çoklu kanal yapıları ile çeşitli sensörler ile entegre olarak çalışabilmektedir [74].

Bir mikrofluidik çip için doğru malzemeyi seçmek önemli adımlardandır. Mikrofluidik biyosensörlerin üretimi için son 20 yılda birçok malzeme çeşidi katkı sunmuştur. Bu malzemeler genel olarak Tablo 3. 1' de gösterilmektedir [74].

**Tablo 3. 1** Mikrofluidik sistemlerde kullanılan malzemeler

| **İnorganik Malzemeler** | **Elastomerler ve Plastikler** | **Hidrojeller** | **Kağıt** | **Hibrit ve Kompozit Malzemeler** |
|---|---|---|---|---|
| Cam | PDMS | Polietilen glikol (PEG) | Selüloz | Cam-PDMS |
| Silika | Termosetler | poliakrilamid | | |
| | Termoplastikler | | | |

## 3. 1. Kâğıt Tabanlı Mikroakışkan Biyosensörler

Dünya Sağlık Örgütü, ASSURED kısaltması ile nokta-bakım analizleri (Point-Of-Care-POC) uygulamaları için elverişli diagnostik testlerin geliştirilmeleri için çeşitli prensipler oluşturmuştur. Bunlar; uygun fiyatlı, hassas, özel, kullanıcı dostu, hızlı ve sağlam, ekipmansız ve ihtiyaç sahiplerine teslim edilir [75]. Bu tür teşhis testleri öncelikle gelişmekte olan ülkeler için yaygın görülen salgın hastalıkların (tüberküloz, leishmaniasis gibi) tespiti için ulaşılabilirliği açısından yüksek talep görmektedir [76].

20. yüzyılın başlarından beri, özellikle filtrasyon amacıyla kâğıt kullanılmaktadır. 1952 yılında Martin ve Synge "kâğıt kromatografisi" icadı ile Nobel ödülünü aldıktan sonra bu malzemenin kullanımında artış meydana gelerek diagnostik alanında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra en önemli gelişmelerden biri olan ilk yanal akış testi (lateral flow test-LFT) olan gebelik testi ticarileştirildi. Gebelik testinden sonra yaygın hastalıklardan olan diyabet ve diğer patojenlerin tespiti için diğer tanısal POC kâğıt tabanlı analitik cihazlar geliştirilmiştir. Günümüzde ise bu alandaki gelişime bağlı olarak mikrofluidik kâğıt tabanlı analitik cihazlar, diagnostik alanında yenilikler sunmaktadır [76, 77].

Biyomedikal ve elektronik endüstrilerinde düşük maliyetli olması sebebi ile biyopolimerler çok sık kullanılmaktadır. Selüloz dünyada en bol bulunan biyopolimerdir ve önemli bir ekonomik öneme sahiptir. Bitki dokularının yaklaşık üçte birini selüloz oluşturmaktadır. Selüloz temelli yeni ürünler geliştirmek ve bunlara farklı fonksiyonlar kazandırmak gerek ekonomik nedenlerle gerek hızlı sonuç alma amaçları ile son yıllarda daha cazip hale gelmiştir. Kâğıt tabanlı biyosensörlerde sık kullanılan nitroselüloz, selülozun nitrik asit ile tepkimeye girmesi sonucunda selüloz hidroksil gruplarının nitrat gruplarıyla yer değiştirmesiyle oluşmaktadır. Kâğıt, yüzey özellikleri bakımından hidrofilik özelliklere sahip olmasına rağmen nitroselülozlar suda ıslanmazlar yani hidrofobik özellik gösterirler ve yüzey pürüzlülüğü arttırılarak hidrofobik özelliğin artması sağlanabilir [76, 78].

Kağıt tabanlı biyosensörlerde özellikle nitroselüloz ve whatman filtre kağıtları yoğun olarak kullanılmaktadır. Whatman filtre kâğıdı, yüksek alfa selüloz içeriği (>%98) elde etmek için imal edilmektedir. Bu yapısal özellik kâğıda yüksek kalite, tekrarlanabilirlik ve homojenlik sağlamaktadır.

Whatman filtre kağıdı fiziksel adsorpsiyon işlemi ile antikorların kağıt yüzeyinde kolay bir şekide immobilize olmasını sağlayarak geniş bir yüzey alanına olanak sağlar. Whatman filtre kağıtlarını yapısal olarak çeşitli sınıflara ayırmak mümkündür. Whatman No. 1 filtre kağıdı standart özelliklere sahip olduğu için daha yaygın bir kullanıma sahiptir. Aynı zamanda saf selülozdan yapılmış olan Whatman No.1 filtre kağıdı optimal kalınlıkta olup kılcal kuvvet yoluyla sıvıyı emme özelliklerine sahiptir. Whatman No. 4 ise sıvının kağıt yüzeyine daha iyi nüfuz ettiği için tercih edilmektedir [8, 76, 79-81].

Kâğıt gibi selüloz temelli malzemeler biyolojik moleküller ile uyumludur ve ayrıca beyaz bir arka plan sağladıkları için optik bir yöntem olan kolorimetrik testler için uygun bir ortam oluşturur. Testi uygulayabilmek için herhangi bir ekipmana ihtiyaç duymadan, çıplak gözle sonuç okuyabilme avantajları sayesinde kolorimetrik testlerin kâğıt üzerinde uygulamaları uygun bir seçenektir. Kâğıdın fiziksel ve kimyasal özellikleri testin gidişatını önemli ölçüde değiştirmektedir. Şöyle ki; kâğıt yüzeyi kimyası, porozite ve optik özellikler biyomoleküllerin immobilizasyonunu etkiler [76]. Bu tür parametreler, sıvı akışının istenilen hızda olması yönünde büyük önem arz eder. Tüm bu parametrelerin kontrol edildiği tek çeşit kağıt türü yoktur. Bu nedenle kağıt seçimi analitik uygulamalara bağlıdır. Örneğin kağıdın kalınlığı gerilme mukavemetinin korunmasına ve böylece kolorimetrik testlerde sinyal gücüne etki eder. Sinyalin görünürlüğü ile kağıdın kalınlık oranı arasındaki ilişki denklem (4)' de gösterilmiştir.

$$\% \text{ Görünür sinyal} = \text{Görünür Derinlik } (\mu) / \text{Membran Kalınlığı } (\mu) \qquad \text{Denklem 4}$$

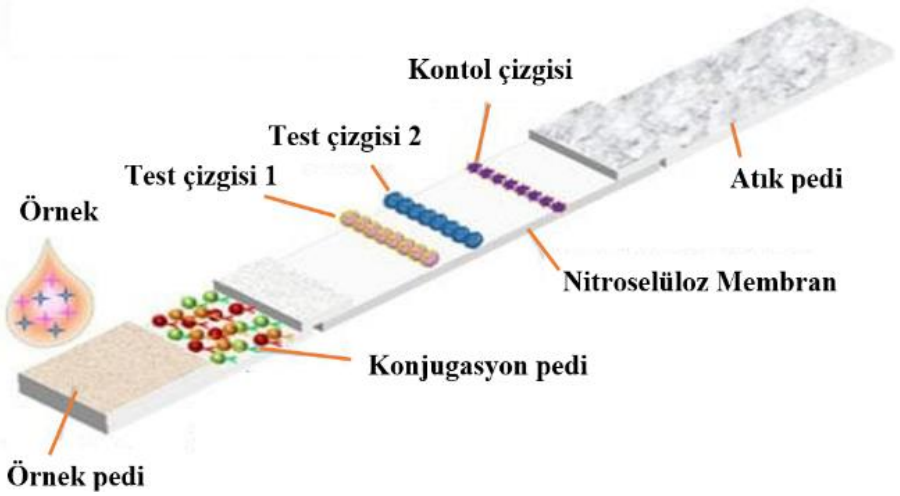
Yukarıdaki denkleme göre kalınlığı daha az olan kâğıtlar daha iyi sinyal görünürlüğü sağlar fakat imalat bakımından üretimi kalın kâğıtlara daha zordur. Yüksek porozite, hidrofilik kanal boyunca numunenin difüzyonuna olanak sağlayarak kâğıt yüzeyinde emilimini sağlar ve kılcallık özelliği sayesinde ise sıvının kâğıt yüzeyinde ilerlemesine yardımcı olur [82].

Kâğıt tabanlı biyosensörler taşınabilirliği, kolay ve ucuz üretim gibi nedenler ile yeni nesil biyosensör olarak kendi kendine çalışan mikroakışkan biyosensör olarak günümüzde çok tercih edilmektedir [82].

## 3. 2. Kâğıt Tabanlı Biyosensör Çeşitleri

Kağıt tabanlı biyosensörler üç temel gruba ayrılabilir. Bunlar; yanal akış testi, dipstick testi ve kağıt tabanlı mikrofluidik analitik cihazlardır. En ilkel ve basit testlerden olan dipstick testlerinin ana çalışma mekanizması, kağıt üzerine önceden yerleştirilen reaktiflerin numune içerisinde daldırılmasına dayanmaktadır. En bilinen örnekleri pH şeritleri ve idrar tahlil testleridir [77].

Dipstick testleri gibi yanal akış testleri de reaktifleri kağıt üzerinde immobilize halinde bulundurur. Fakat test işleyiş mekanizması dipstickten farklı olarak numunenin kağıt yüzeyinde akışına dayanmaktadır. Bu testler farklı formlarda olabilmektedir. Örneğin sandviç ve yarışımlı model gibi çeşitli tasarım formları mevcuttur. Yanal akış testleri genelde dört farklı bölümden oluşmaktadır. Bunlar; numune pedi, konjugasyon pedi, tespit pedi ve atık ped. Çalışma mekanizması şu şekildedir: Numune çözeltisi numune pedi üzerine damlatılır ve numune orada birikir. Kılcal hareketler sayesinde cam elyaftan yapılmış olan konjugasyon pedine gelen analit immobilize edilmiş biyoaktif molekül ile antijen-antikor (Ag-Ab) kompleksi oluşturur. Nitroselülozdan yapılmış tespit pedinde ise yakalama reaktifleri vardır ve immunokompleks bu ped üzerinde kalır ve sinyal oluşmuş olur. Test sonucu bu ped üzerinde görülür. Sıvı, kapiller akım kuvveti sayesinde atık pedine kadar ulaşır ve burada birikir. Tüm tespit işlemleri dakikalar içinde tamamlanır. Bu test yöntemi geleneksel diagnostik yöntemlerinin aksine çok kısa sürede sonuca ulaştırarak zamandan tasarruf edilmesini sağlar[77, 83].




**Şekil 3. 1** Yanal Akış Testi Çalışma Mekanizması [92]

**Tablo 3. 2** Kâğıt tabanlı biyosensörlerin tespit yöntemleri, avantajları ve dezavantajları [84]

| Biyosensör Çeşidi | Tespit Yöntemleri | Avantajlar | Dezavantajlar |
|---|---|---|---|
| Dipstick | Optik | Kolay tasarım<br>Hızlı optimizasyon | Sadece bir adım<br>Sadece optik algılama<br>Çoğunlukla nicelik yok |
| LFA | Optik<br>Elektrokimyasal | Çok yönlü<br>Akıcılık<br>Elektrokimyasal tespit<br>Olası niceleme | Uzun imalat<br>Numune hacmi (yaklaşık 100 mL) |
| µPAD | Optik<br>Elektrokimyasal<br>Kemilüminesans<br>MEMS | Çok yönlü<br>Akıcılık<br>Farklı tespit yöntemleri<br>Niceleme<br>Küçük örnek hacmi (10 mL'den az)<br>Büyük üretim | Uzun optimizasyon süreleri |

### 3. 2. 1. Kâğıt Tabanlı Mikrofluidik Analitik Cihazlar (µPADs)

İlk olarak 2007 yılında Whitesides grubu tarafından sunulan kağıt tabanlı mikroakışkan analitik cihazlar (µPADs), dipsitick testlerin sadeliği ve uygun maliyet özellikleri ile lab-on-a-chip(LOC) cihazlarının kompleks yapısı ile birleştirilerek lab-on-paper(LOP) olarak yeni bir teknoloji sağlamaktadır [85, 86]. Kağıt tabanlı mikroakışkan analitik cihazlar, yanal akış testleri gibi birden fazla pedin bir araya getirilerek oluşturulması ile üretilmez. Tek bir kağıt parçasından oluşturulduğundan ötürü maliyet ve basitlik olarak daha uygundur [83]. Geleneksel yöntemlere göre kullanımı kolay, az miktarda reaktif ve numune tüketerek hızlı sonuç imkânı sağlamaktadır. µPAD' ler genel olarak hidrofilik kâğıt üzerine hidrofobik bariyerlerin basılması ile sıvı akışına yön veren kanallar oluşturur. Böylelikle biyokimyasal analizler hızlı ve verimli sonuç verir. Polimer bazlı mikroakışkan cihazlar sıvı akışını ekstra bir kuvvet uygulayarak sağlarken, µPAD' ler harici bir kuvvete ihtiyaç

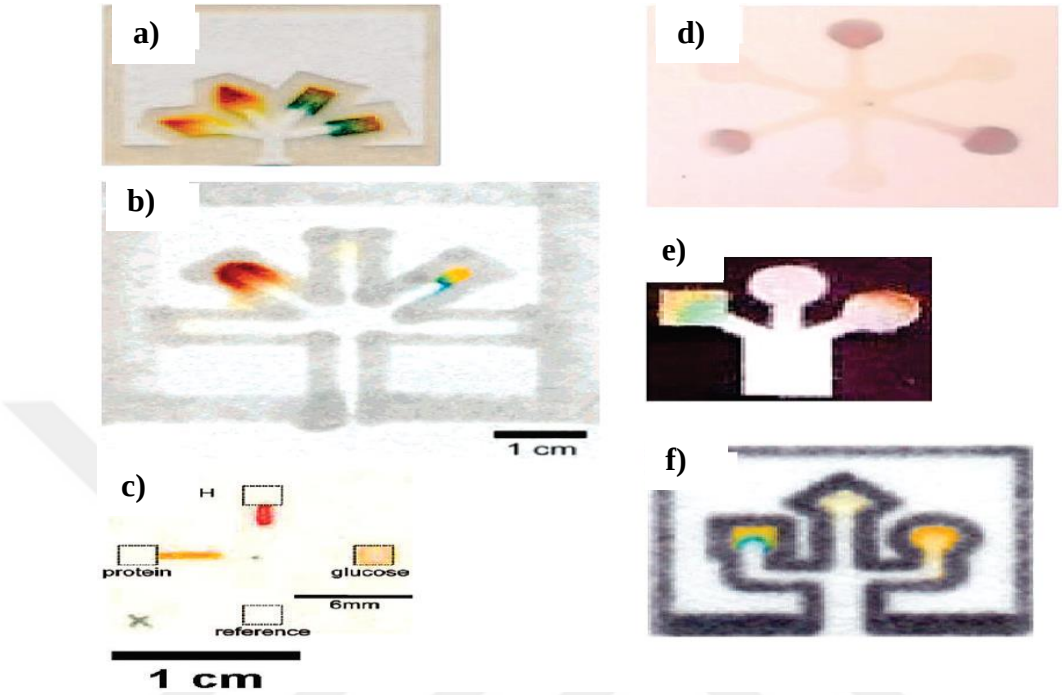
duymadan sıvı akışını kılcal akış sayesinde gerçekleşir [87]. Oluşturulan hidrofobik kanallar, sıvı akış hacmini sınırlar ve yönlendirir. Bu kanallar fotorezist veya balmumu gibi sıvı geçirmez malzemelerden yapılmaktadır. Kolorimetrik, kemilüminesans ve elektrokimyasal algılama yöntemi kullanılarak hem nitel hem nicel analizler yapılabilir. µPAD' ler analiz sonucunda oluşan renklerin boyutunu ve yoğunluğunu değerlendirmek için görüntü yazılımı ile birlikte kamera ve yazıcı kullanılarak verilerin laboratuvar ortamına elektronik olarak iletilmesine olanak sağlar [88, 89]. µPAD' ler genellikle tek kullanımlık olduğu için ve uzman bir personele gerek kalmadan analiz yapılmasını sağladığı için POC testleri kategorisinde değerlendirilmektedir [90].

### 3. 2. 2. µPADs Üretim Yöntemleri

Kâğıt; gözenekli, geçirgen ve katı fiber ağlarından oluşan bir malzeme olarak diagnostik uygulamalarda kullanılmaya uygun bir araçtır. Akışkan yollar oluşturup analize uygun hale gelmesini sağlayan temel kimyasal doğasıdır. µPAD' lerin imalatının en önemli amacı, testin formatı ve uygulamasına uygun olacak şekilde spesifik hidrofobik bariyerler oluşturmaktır. Bu özellikler, akışların ortak bir kaynaktan, çoklu algılama noktalarına ayrıldığı ve mültipleks kolorimetrik deneyler için kolay yöntemler oluşturmasını sağlar [91, 92].

Son yıllarda µPAD'lerin imalatı için pek çok farklı yöntem ortaya çıkmıştır. Bunlardan bazıları; fotolitografi, mürekkep püskürtmeli baskı, balmumu baskı, kağıt kesme, plotting ve plazma işlemidir. µPAD' lerin üretiminde, uygulama kolaylığı, hızlı sonuç ve ucuz olduğu için mum baskılama yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat kararlılığı diğer yöntemlere oranla daha düşüktür. Mum baskılama yöntemi özellikle seri baskıda çoğunlukla yarışımlı bir hidrofobik bariyer oluşturmak için seçilen yöntemdir. µPAD' lerin ilk üretim tekniklerinden olan ve Whitesides grubu tarafından protein ve glikoz seviyelerini belirlemek için kullanılan fotolitografi yöntemi pahallı olmasına rağmen yüksek kararlılık göstermektedir. Aynı zamanda yüksek maliyetli ve zaman alıcı bir yöntemdir [85, 92-94].

Şekil 3. 2 ‘ de literatürde farklı diagnostik testler için kullanılmış ve birbirinden farklı imalat çeşitleriyle üretilmiş olan µPAD’ lerin kolorimetrik test sonuçları gösterilmektedir [8].




**Şekil 3. 2 a)** Fotolitografi yöntemi ile glikoz ve proteinin tespiti [88] **b)** Plotting yöntemi ile glikoz ve proteinin tespiti [103] **c)** Mürekkep püskürtme yöntemi ile protein, pH ve glikoz tespiti [104] **d)** Plazma işlemi ile alkalin fosfataz tespiti [14] **e)** Kesme yöntemi ile protein ve glikozun tespiti [95] **f)** Balmumu baskısı yöntemi ile protein, kolesterol ve glikozun tespiti [12].

### 3. 2. 2. 1. Wax Printing Metodu

Wax Printing (Balmumu baskı) yöntemi ilk olarak Lu ve arkadaşları tarafından wax printer ( balmumu yazıcı-katı yazıcı) kullanılarak yapılmıştır [8]. Wax printing µPAD üretiminin en yaygın yöntemlerinden biridir. Bu yöntem hızlı, minimum enstrümantasyon ve uygulama kolaylığı sağladığından dolayı gelişmekte olan ülkeler için çok avantajlı bir seçenektir [92, 93].

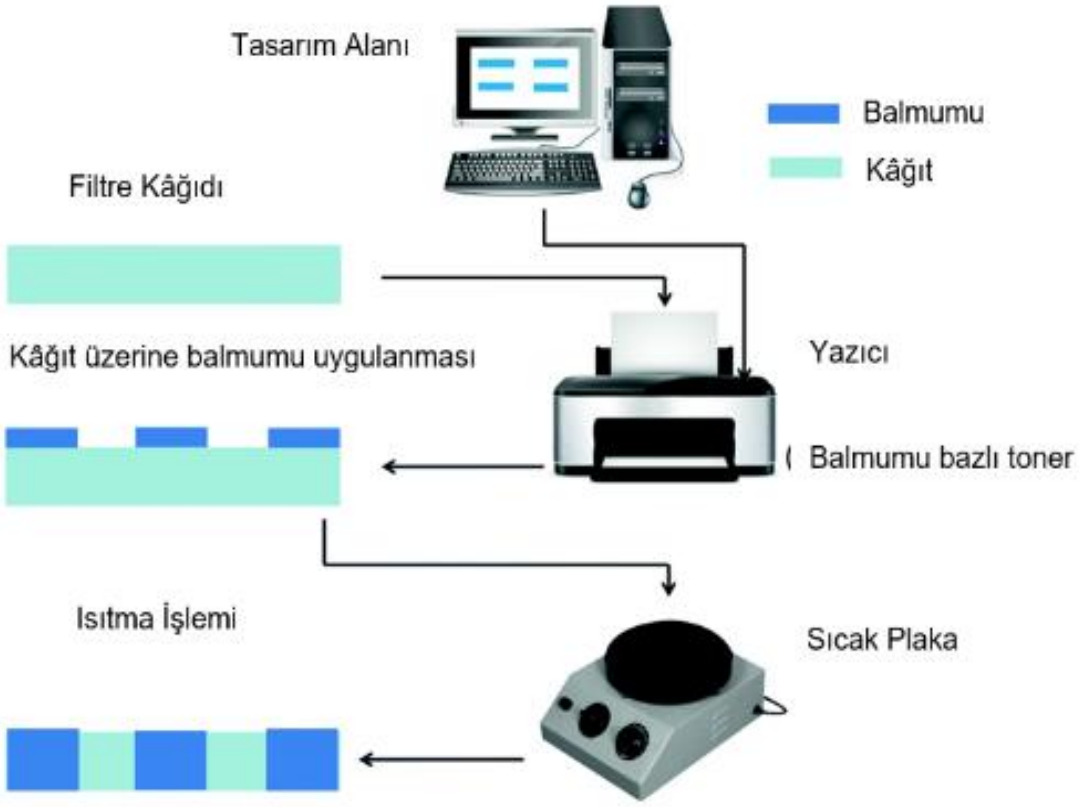
Wax printing yöntemi; hidrofilik yapıda olan uygun bir kâğıt yüzeyine çeşitli yöntemler ile balmumu baskı kullanılarak hidrofobik kanallar oluşturmayı amaçlar. Balmumu basılarak oluşturulan hidrofobik kanalların aktifleşebilmesi için genellikle 130-150 °C arasındaki değerlerde ısıtılarak kâğıdın arka yüzeyine nüfuz etmesi sağlanır. Balmumu desenli kâğıt daha sonra oda sıcaklığına geldikten sonra makas

yardımıyla kesilir. Balmumu baskı ile oluşturulan desenlerin yapısı ve boyutu yapılacak test çeşidine göre değişmektedir [86, 92, 96].

Balmumunun kâğıt yüzeyine basılma işlemi genellikle üç farklı yöntemle geliştirilebilir. Bunlar;

- Balmumu Yazıcı (Wax Printer)
- Balmumu Kâğıt
- Balmumu Kalem

Balmumu baskı işlemi ekstra işlem basamaklarına ihtiyaç duymadığından dolayı PDMS yöntemlerine göre daha ucuz ve uygun bir yöntemdir. Ayrıca mikrolitre seviyelerinde reaktif ve numune kullanarak herhangi bir dış kuvvete gerek duymadan kılcal kuvvet etkisi ile reaksiyonların gerçekleşmesini sağlamaktadır [8, 96].



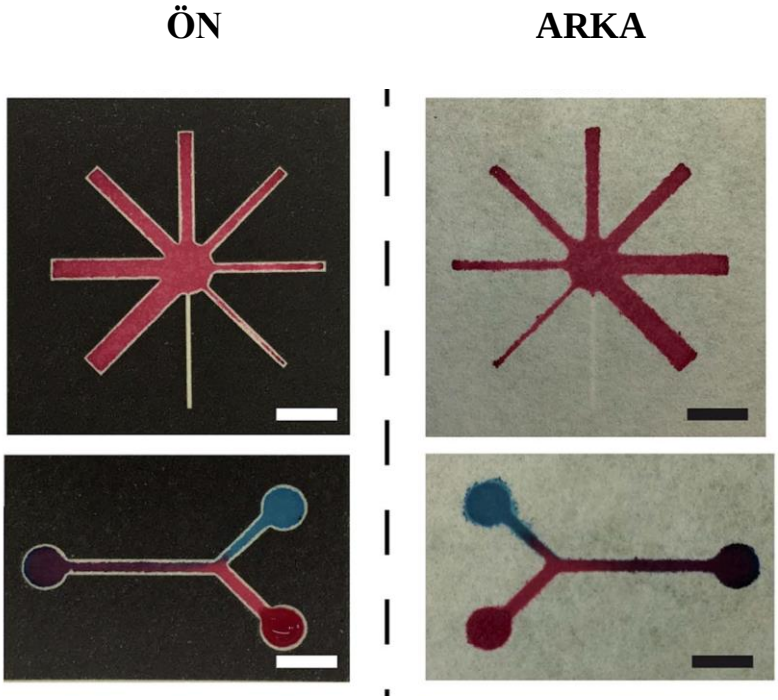

**Şekil 3. 3** Wax Printing tekniği ile analitik cihazın tasarım ve üretim aşamaları [105]

### 3. 2. 2. 2. Lazer Yazıcı ile Baskılama

Wax printing metodu µPAD tasarımlarını imal etmek için en uygun yoldur. Fakat wax printer gerek maliyet açısından gerek ulaşılabilirlik açısından zorluklar oluşturduğu için alternatif yollar denenmektedir. Genellikle kullanılan yazıcı modeli olan ColorQube 8000 serisinin üretimi durduruldu ve dolayısıyla balmumu kartuşlarınında bulunulması eskiye oranla güçleşti.

Tüm bu nedenlerden dolayı wax printing üretim modeline alternatif olarak lazer yazıcılar kullanılmaya başlanılmıştır. Kağıt yüzeyine, tasarımı yapılmış olan µPAD modelini lazer yazıcı kullanarak üretmek mümkündür.

Toner malzemesi, bir lazer yazıcı kullanılarak kolayca basılabilir. 600 nokta/inç (dpi) çözünürlüğe sahip, her yerde kullanılan standart bir lazer yazıcısı, yaklaşık olarak 42 µm çapındaki bir alanı yazdırabilmektedir. Genelde tonerin içeriğine üreticisi karar vermektedir ve bu yüzden tonerlerin erime noktaları üretilen yere göre değişiklik göstermektedir. Tonerin içeriği ise genellikle stiren akrilatlar ve poliesterlerden oluşan polimerlerden meydana gelmektedir. Basımı kağıt yüzeyine yapılmış olan polimer yapılı tonerin, kağıdın arka yüzeyine nüfuz edebilmesi için, balmumuya göre daha uzun süre ısıtılması gerekmektedir [97].



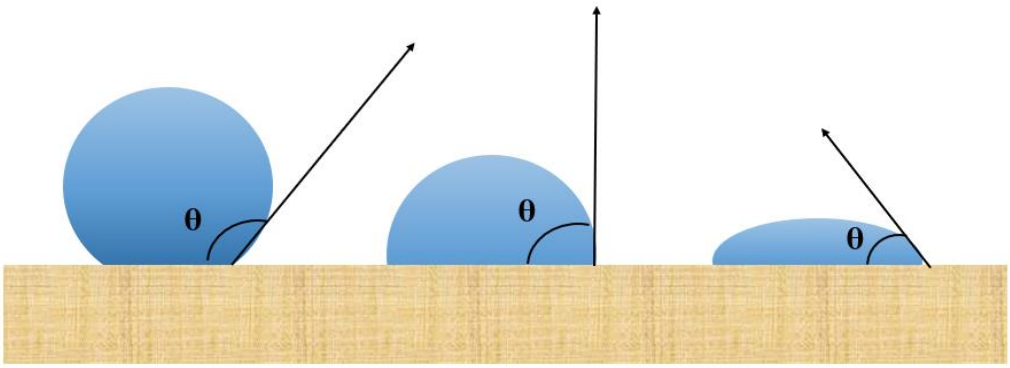

**Şekil 3. 4** Lazer yazıcı ile üretilmiş µPAD modellerinin ön ve arka yüzleri [105]

## 3. 3. Temas Açısı

Bir katı malzemenin yüzeyine bir miktar su damlatıldığı zaman katı malzemenin yüzeyi ile su damlası arasında bir açı meydana gelir. Bu açıya temas açısı (θ) denilmektedir. Temas açısı su ile temas halindeki katı yüzeyin ıslanabilirlik veya ıslanmazlık özellikleri hakkında bilgi vermektedir. Temas açısı damlanın katı yüzeyindeki şekline göre değişiklik göstermektedir [98].

Temas açısı;

| | | |
|---|---|---|
| θ =0 ° | ise | Süperhidrofilik (Mükemmel ıslanma) |
| 0 ° <θ 90 ° | ise | Hidrofilik (Kısmi ıslanma) |
| 90 ° <θ <150 ° | ise | Hidrofobik |
| 150 ° <θ <180 ° | ise | Süperhidrofobik (Süper ıslanmazlık) |




**Şekil 3. 5** Temas açısı gösterimi

µPAD sistemlerinin temel prensibi kağıt yüzeyinde hidrofobik bariyerler oluşturarak hidrofilik kanallar açmaktadır. Bu hidrofilik kanallar sıvının kılcal kuvvet ile kanal boyunca ilerlemesini sağlamaktadır ve hidrofobik bariyerler sayesinde sistem dışına sıvı taşmamaktadır. Çeşitli fabrikasyon teknikleri ile kağıt yüzeyine hidrofobik özellik kazandırılabilmektedir.

## 3. 4. Washburn Denklemi

µPAD sistemleri, çok çeşitli üretim yöntemleri, kağıt çeşitleri ve tasarım modellerinden oluşmaktadır. Her kağıt türünün fiziksel ve kimyasal yapısı birbirinden farklıdır. µPAD sistemi için seçilen kağıt türü kılcal kuvvete bağlı oluşan sıvının akış hızını değiştirmektedir.

Lucas-Washburn denklemine göre sıvının yayıldığı mesafe, zamana ve kağıt substratına bağlıdır. Bir sistem üzerindeki sıvının akışını; kanal genişliği, temas açısı, kapiler yarıçap, sıvı viskozitesi, yüzey gerilimi gibi etmenler etkilemektedir [9, 99].

Lucas-Washburn denklemi [100];

$$L = \sqrt{\gamma D t}/4\mu \qquad \text{Denklem 5}$$

L = akışkanın hareket ettiği mesafe

$\gamma$ = sıvının etkin yüzey gerilimi

D = ortalama gözenek çapı

t = zaman

$\mu$ = sıvının viskozitesi

# 4. *LEİSHMANİA*

Leishmaniasis, *Leishmania* cinsindeki protozoon parazitlerinin herhangi biriyle oluşturduğu enfeksiyondan kaynaklanan bir hastalık türüdür [101]. Halk arasında "şark çıbanı" veya "yıl yarası" olarak da adlandırılan Leishmaniasis, enfekte dişi kum sineklerinin (Phlebotomus ve Lutzomyia) deriden kan emerken bulaştırdıkları ve ciltte kalıcı yara izleri bırakan ve tedavi edilmediğinde öldürücü olabilen bir hastalıktır [102, 103].

2010 yılı Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre en mühim 7 tropikal hastalıktan birisini oluşturmaktadır. Dünyada yaklaşık olarak 98 ülkede görülmekte olup 12 milyon insan leishmaniasise yakalanmıştır. Ayrıca yaklaşık olarak 350 milyon insan bu hastalık etkeni ile tehlike altındadır. Her sene bu sayılara 2 milyon yeni olgu dâhil olmaktadır [104].

Dünyada sıtmadan sonra ikinci klinik öneme sahip olan leishmaniasis tedavisi ve yayılımının kontrolü zor olan bir hastalıktır. Keşfedilmesi uzun yıllar önce olan bu hastalık başta gelişmekte olan ülkeler olmak üzere tüm dünyada insan sağlığını tehdit etmeyi sürdürmektedir [105].

Teknolojinin gelişimi ile birlikte ulaşım yollarının çeşitlenerek artması, kolay ve hızlı seyahat imkânına neden olarak insan ilişkilerinin eski yıllara oranla daha fazla sıklaşmasına olanak sağlamıştır. Bu durum yeni parazit türlerinin zamanla ülkemizde görülmesine ve eskisinin değişikliğe uğramasına neden olmuştur [103]. Küresel ısınma ve iklim değişiklikleri nedenlerinden dolayı vektör olan kum sineklerinin yaşama alanları genişleyerek parazitin yayılmasına sebebiyet vermektedir [106].

Türkiye' de *Leishmania* parazitleri genel olarak Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Akdeniz Bölgesinde endemik olarak görülmektedir. İç Anadolu ve Ege Bölgelerinde de az da olsa çeşitli vakalar görülmektedir [107]. Ülkemizde yaklaşık olarak vakaların %70' i en yoğun olarak Şanlıurfa ilinde raporlanmaktadır. 1981-2000 yılları arasında 22.355 hasta tespit edilmiştir [108].

Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yaygın olan tür *L. tropica*, Çukurova taraflarında ise *L infantum* ve *L. tropica'* nın yaygın olduğu bilinmektedir. Ayrıca Şanlıurfa'da 16 farklı türde kum sineği varlığı tespit edilmiştir. Hatalığa neden olan bu dişi kum

sinekleri ilkbahar ve yaz mevsimleri arasında aktifliklerini arttırarak enfekte hasta oranlarının artışına neden olur ve kış aylarına doğru bu oran azalır [106].

## 4. 1. *Leishmania* Parazitlerinin Tarihçesi ve Sınıflandırılması

İlk defa Güney Amerika'da bulunan And dağları taraflarından gelen mevsimlik İspanyol işçilerinde tespit edilen *Leishmania* paraziti, vadi hastalığı "Valley sickness" veya And hastalığı "Andean sickness" olarak adlandırılmıştır. 15. ve 16. yüzyıllarında yapılmış olan Inca yazıtlarında da *Leishmania* hastalığından söz edilmiştir [109].

Burun ve ağız yaralarının uzun süreler sonunda iyileşmemesiyle nedeniyle cüzzam hastalığıyla benzerlik gösterdiği için "beyaz cüzzam" olarak isimlendirilmiştir. Clarke 1882'de, Hindistanlı hekimler tarafından " kala azar" olarak Sanskritçe dilinde kara ateş anlamına gelen bu hastalık Hindistan'da bazı bölgelerde oldukça yüksek sayıda insan ölümlerine sebebiyet vermiştir [109].

*Leishmania* prototozoan mikroorganizmaları ilk defa 1903 yılında Leishman ve Donovan tarafından klinik olarak tespit edildi. Şimdilerde ise en az 20 türünün insanlarda hastalığa sebebiyet verdiği bilinmektedir. Bazıları visseral, bazıları kutanöz, bazıları mukokutanöz, bazıları ise hem kutanöz hem de visseral hastalığa sebebiyet verirler [105].

1908'de ise Nicolle tarafından Akdeniz bölgelerinde tespit ettiği küçük kala-azar etkenlerine *L.infantum* ismi verilmiştir. 1911 yılında Vianna isimli araştırmacı *Leishmania* parazitlerinin kedi, köpek gibi hayvanlarda da bulunabileceğini ortaya koymuştur ve deri leishmaniasisi vakalarında bulduğu etkenleri *Leishmania brasiliense* olarak isimlendirmiştir [109].

Ülkemizde, leishmaniasis hastalığı ilk defa Kristamonas tarafından keşfedilmiştir ve ilk bildirim İzmir ilinde 1918 yılında Dr. Hofer Kaller tarafından yayınlanmıştır. 1931 yılında İbrahim Osman, 1936'da ise Dr. Akil Özden tarafından kala-azar olgularının varlığını kanıtlamıştır. Dr. Arif İsmet Çetingel tarafından yapılan araştırmalarda Türkiye' de 1948 yılına kadar yüzlerce kala-azar hastası olduğu belirtilerek bu hastalığın önemini ortaya koymuştur. Ülkemizde köpeklerde de kala-azar bulunduğuna dair ilk yayın 1946 yılında Dr. Nurettin Onur tarafından kaleme alınmıştır [109].

İlk tür sınıflandırma çalışmaları; klinik, coğrafi ve biyolojik etkenler gibi çeşitli dışsal esaslara dayanıyordu. Örneğin; L. guyanensis (Guyana' da izole edilmiş), L. peruviana (Peru), L. infantum (Tunus' ta bir çocuktan izole edilmiş) ve L. gerbilli (gerbillerden izole edilmiştir) [110].

1970'lerde ise bu parazit türlerini tanımlayabilmek için immünolojik, biyokimyasal ve genetik veriler gibi temel esaslar göz önünde bulundurmaktadır. Bu tür tekniklerin kullanılması Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından bir sınıflandırma şeması yayınlanmasına yol açmıştır. Günümüzde 30 tür *Leishmania* paraziti tespit edilmiştir ve yaklaşık 20 türü insan sağlığı için tehlike arz etmektedir. Farklı genetik ve fenotipik özelliklere sahip türler genellikle farklı epidemiyolojik ve klinik özellikler gösterir. DSÖ'nün onayladığı sınıflandırma Tablo 4. 1'de verilmiştir [110, 111].

**Tablo 4. 1** *Leishmania* parazitlerinin sınıflandırılması [119]

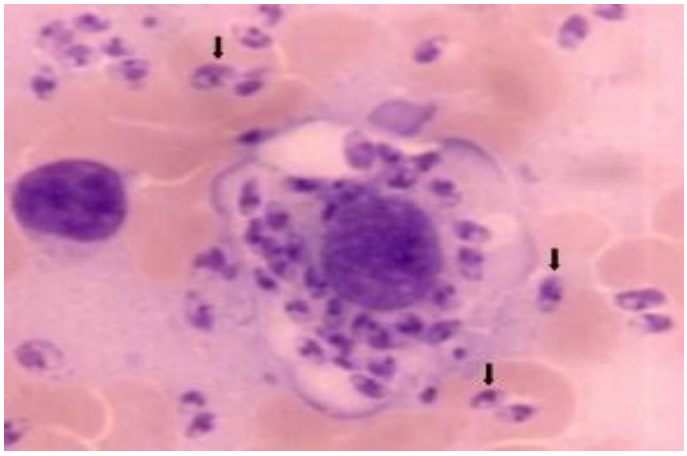
| | |
|---|---|
| Kingdom (Alem) | *Protista* |
| Subkingdom (Alt Alem) | *Protozoa* |
| Phylum (Şube) | *Sarcomastigophora* |
| Subphylum (Alt Şube) | *Mastigophora* |
| Class (Sınıf) | *Zoomastigophora* |
| Order (Takım) | *Kinetoplastida* |
| Suborder (Alt Takım) | *Trypanosamatina* |
| Family (Aile) | *Trypanosamatidea* |
| Genus (Cins) | *Leishmania* |

## 4. 2. Morfolojisi

Trypanasomatidae ailesinden olan *Leishmania* parazitinin diğer türlerde olduğu gibi kendi içinde yapısal ve biçimsel farklılıkları vardır. Bu parazit iki çeşit morfolojik forma sahiptir. İnsan ve diğer memelilerde amastigot forma sahip olan *Leishmania*, vektörlerde promastigot forma sahiptir [112, 113].

### 4. 2. 1. Amastigot (Hücre içi)

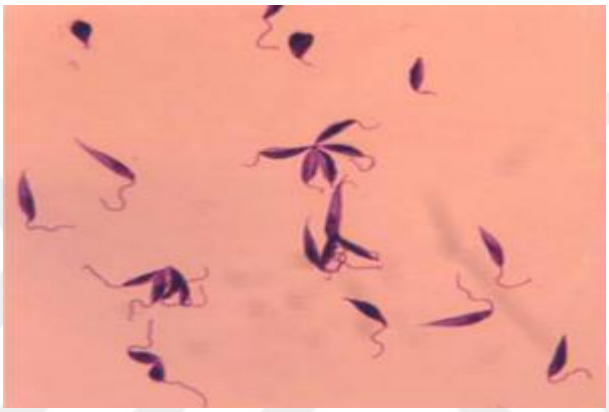
1-3 µm en ve 2-5 µm boy ölçülerine sahip olup, yuvarlak veya oval şekillerde bulunabilirler. Hareketsiz olan bu form omurgalı konakta makrofajların fagolizozomları içinde 37 °C' de uzunlamasına bölünerek çoğalırlar. Sitoplazmasının arka tarafında büyük bir nükleus mevcuttur. Nükleusun hemen yanında ise kinetoplast bulunur. Giemsa ile yapılan boyamalarda sitoplazması mavi renkte, çekirdeği pembe renkte görülür. Nükleusun yanında bulunan kinetoplast ise parklak kırmızı renkte görünmektedir. *Leishmania* türlerinin hepsinde sitoplazma ve az sayıda mitokondri bulunmaktadır. Ayrıca lizozom ve golgi cisimciği de olup parazitin beslenmesinde rol oynarlar [112, 113].



**Şekil 4. 1** *Leishmania* amastigot formu [109]

### 4. 2. 2. Promastigot (Hücre dışı)

Boyları 15-20 μm ve enleri 1,5-5 μm olan promastigot formda bulunan bu tür vektörün bağırsaklarında bulunup mekik şeklinde vücudu vardır. Serbest bir kamçısı olan promastigotlar 27 °C' de aksonik kültürlerde ve vektörün sindirim kanalında uzunlamasına bölünerek ürerler. Ön uçta yuvarlak şeklinde kinetoplastı vardır. Nükleus merkezde yer alır ve sitoplazma, golgi cisimciği, endoplazmik retikulum gibi organellere sahiptir [109].



**Şekil 4. 2** *Leishmania* promastigot formu[109]

## 4. 3. Leishmaniasis

Leishmaniasis çeşitli klinik semptomlarla meydana gelen ve *Leishmania* parazitlerinin sebep olduğu hastalıkların genel adıdır. Leishmaniasis'in en sık rastlanan üç ayrı klinik formu vardır. Bunlar; mukokütanöz leishmaniasis (MKL), kutanöz leishmaniasis (KL) ve visseral leismaniasis (VL). Leishmaniasis kliniği ve belirtilerine göre çeşitlendirilmesi Tablo 4. 2'de yer almaktadır [112].

**Tablo 4. 2** Etkenlerine göre leishmaniasis sınıflandırılması

| Klinik | Etkilediği Organ | Etkeni |
|---|---|---|
| Visseral Leishmaniasis | İç Organlar | *L.donovani kompleksi*<br>*L.donovani*<br>*L.amazonensis*<br>*L.infantum*<br>*L.tropica*<br>*L.chagasi* |
| Kutanöz Leishmaniasis | Deri | *L.tropica*<br>*L.mexicana kompleksi*<br>*L.major*<br>*L.aethiopia*<br>*L.mexicana*<br>*L.amazonensis*<br>*L.pifanoi*<br>*L.braziliensis kompleksi*<br>*L.panamensis*<br>*L.peruvianna*<br>*L.guyanensis*<br>*L.lainsoni*<br>*L.tropica kompleksi*<br>*L.columbiensis*<br>*L.infantum*<br>*L.chagasi* |
| Mukokutanöz Leishmaniasis | Deri ve Mukoz Membran | *L.braziliensis kompleksi*<br>*L.braziliensis*<br>*L.panamensis*<br>*L.guyanensis*<br>*L.mexicana*<br>*L.tropica*<br>*L.major* |

### 4. 3. 1. Leishmaniasis'in Epidemiyolojisi

Leishmaniasis'in yaygın olarak görülme nedenleri arasında ekolojik, iklim, göç veya vektörün coğrafik dağılımı gibi faktörler etkilidir. Hastalığı taşıyan kum sineklerinin çoğalmak ve yaşam özellikleri epidemiyolojisinde büyük önem arz etmektedir. Endemik olan yerden, hastalığın görülmediği yerlere göç edilerek uygun koşullar altında parazitin o bölgelerde yayılmaya başlaması olasıdır.

Leishmaniasis, iklim koşullarına bağlı olarak üreyen bir parazit olduğu için sıcaklık, nem ve yağış gibi çevresel parametreler popülasyonu etkileyebilmektedir. DSÖ' nün raporuna göre parazitin, gelişmemiş ülkelerde ve hastalığı taşıyan sineklerin kontrolünün düzenli yapılmadığı bölgelerde gittikçe yayıldığını ve yıllık insidansın 1,5 milyar olduğu belirtilmiştir.

Bu hastalığın dünyada en fazla görüldüğü yerler başta Brezilya olmak üzere; Afganistan, Peru, Suudi Arabistan, Pakistan, Cezayir ve Tunus olarak tespit edilmiştir. Leishmaniasis hastalığına yakalanan kişilerin birçoğunun kırsal alanlarda yaşaması, hastalığın dikkate alınmaması ve yoksulluk gibi faktörler hastalığın tespitini ve tedavisini zorlaştırmaktadır. Hastalığı taşıyan kişilerin sayısı resmi sayının 3-5 katı kadar olduğu düşünülmektedir.

Ülkemizde ise 1950 yılından önce başta Güneydoğu Anadolu Bölgesi olmak üzere sık görülmekteydi. 1980'den sonra ise Şanlıurfa'da ve 5 yıl sonrasında Çukurova bölgesinde vaka sayılarında artış görülmüştür. Suriye'deki iç savaştan ötürü ülkemize göç eden Suriyelilerde hastalığın görülmesi nedeni ile başta Güneydoğu Anadolu Bölgesinde hasta sayılarında ciddi bir artış yaşanmıştır [105].

### 4. 3. 2. Leishmaniasis' in Tanısında Kullanılan Yöntemler

Genel olarak leishmaniasis tanısı; epidemiyolojik verilere, laboratuvar testlerine ve klinik özelliklerine göre belirlenmektedir. Endemik bölgede yaşayan veya endemik bölgelere seyahat etmiş olup klinik belirtiler gösteren vakalarda parazitolojik tespitler yapılmaktadır. Parazitolojik doğrulamada en yaygın kullanılan tanı yöntemi; hastalık sonucu hastanın derisinde oluşan lezyondan alınan sürüntüden hazırlanan yayma prepatların giemsa adı verilen özel boyayla boyanıp, parazitin ışık mikroskopunun altında amastigot formda gösterilmesine dayanmaktadır.

Lezyondan alınan numune ayrıca NNN (Novy-Nicolle MCNeal) besiyerinde kültürü yapılarak promastigot formda da tespit edilmesi mümkündür [114].

Laboratuvar tanı yöntemlerine ek olarak antijen, antikor, protein, enzim gibi moleküllerin aktivitelerine dayanarak yapılan ELISA, IFAT, DAT ve Western Blott gibi tanı da kullanılan test teknikleri de yer almaktadır [113].

# 5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

## 5.1. Gereç

### 5.1.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Deneyler kapsamında aşağıdaki cihazlar kullanılmıştır.

- UV-VIS spektrofotometre (Shimadzu, UV-1700 pharmaspec)
- Analitik terazi (Precisa, XB 220A)
- Biyolojik güvenlik kabini (Thermo Scientific, HERAsafe Class II)
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Heidolph, MR 3001)
- Masaüstü pH/ORP Metre (Hanna, HI 2211)
- Sonikatör (Bandelin Sonorex)
- Ters (invert) mikroskop (Olympus DP71)
- Vorteks (Heidolp Reax top)
- Dondurucular
- Distile su cihazı
- Thoma lamı (Marienfeld)
- Otoklav (Hirayama, Hiclave HVE-50)
- Lazer Yazıcı (Develop, ineo+ 227)
- Azot Tankı
- Hücre kültürü flaskları 25cm$^2$

### 5.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyler kapsamında aşağıdaki kimyasal maddeler kullanılmıştır.

- Borik asit (Applichem)
- Protein A- Agarose (Santa Cruz Biotechnology)
- Gold nanorods (Boğaziçi Üniversitesi)
- Gold nanopartikül (Sigma-Aldrich)
- Distile su
- NaOH

- Bovine Serum Albumin (BSA)
- Fosfat Tamponu
- Sodyum Klorür (NaCI)
- Polivinil alkol (PVA)
- Triton X-100 (Applichem)
- pH test kağıdı çubukları 0-14 (Merck)
- Whatman filtre kâğıdı Grade 4 (GE Healthcare)
- Kahve filtre kâğıdı (Tchibo)

## 5. 2. Yöntem

Tez çalışması kapsamında kağıdın temas açısı, washburn deneyleri, ayrıca konjugasyon işlemleri, biyolojik reaktiflerin kâğıda immobilizasyonu, optimal konsantrasyonları belirlenmiştir. Deneysel çalışmalar iki aşama gerçekleşmiştir. İlk aşamada kağıt seçimleri ve uygulanan tasarım modelleri hazırlanmıştır. Hidrofilik kağıt yüzeyine hidrofobik kanalların işlenmesi, ayrıca fabrikasyonu yapılan test kitlerine karakterizasyon teknikleri uygulanılarak optimal tasarım seçilmiştir. İkinci aşamada ise test kitine immobilizasyonu sağlanacak olan reaktiflerin ve antijenlerin hazırlanması ve optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

### 5. 2. 1. Çözeltilerin Hazırlanması

- **Borat Tamponunun Hazırlanması**

Genel anlamda tamponlar, reaksiyona girecek maddelerin pH' dan etkilenmemesi için kullanılan çözeltilerdir. Bu tez çalışmasında gold nanorods ve gold nanopartiküllerin protein A ile konjuge edilmesinde pH'ın sabit kalmasının sağlanması için borat tamponu-kullanıldı. pH 7.4 olacak şekilde hazırlanan borat tamponu için 3,09 gr borik asit 40 ml distile su ile ısıtıcılı manyetik karıştırıcı 1000 rpm'de çözdürüldü. Üzerine 0,5 gr NaOH ekledi ve pH 7.4'e ayarlandı. Hazırlanan tampon çözelti konjugasyonda kullanıldı [115].

- **Fosfat Tamponlu Salin (PBS) Hazırlanması**

140 mM PBS çözeltisi için, 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g $Na_2HPO_4$, 0,24 g $KH_2PO_4$ tartıldıktan sonra 800 mL distile su ilave edilerek karıştırıldı. Tamamen çözündükten sonra pH NaOH ile 7,4'e ayarlandı ve toplam çözelti hacmi 1000 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan PBS steril edilerek stok olarak saklandı. Deney aşamasında 7 ml 140 mM olan PBS çözeltisine 42 ml distile su eklenerek 20 mM PBS çözeltisi elde eldilerek kullanıldı.

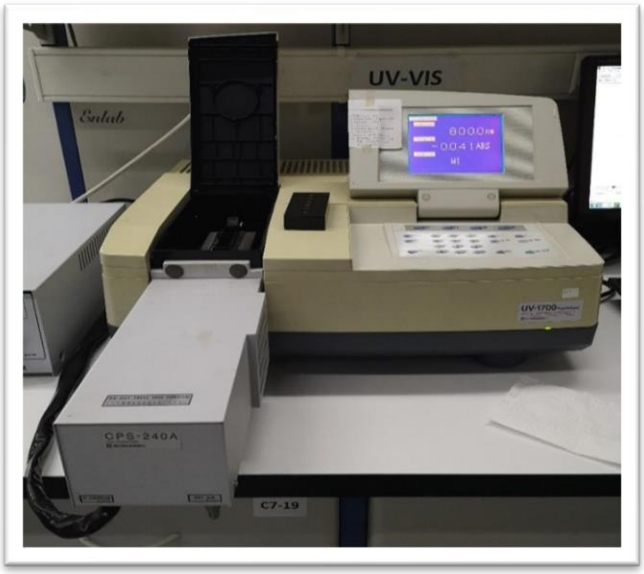
- **Çalışma Tamponunun Hazırlanması**

Serum, biyokimyasal yapısından dolayı viskozitesi yüksek bir madde olduğundan akmaya karşı direnç göstermektedir. Deneyde kullanılacak olan kitin yüzeyine direkt serum uygulandığında istenilenden daha yavaş bir akış gerçekleşeceğinden dolayı, bu tez kapsamında serum çalışma tamponu ile seyreltilerek teste uygulandı. Buna göre; 14 ml 20 mM PBS çözeltisine 26 mg 50 mM NaCI, 70 mg PVA, 140 mg BSA ve 14 µl Triton X-100 eklenerek çözündürüldü ve çalışma tamponu hazırlandı [7].

### 5. 2. 2. Gold Nanorods Yüzeylerine Protein-A Bağlanmasının Optimizasyonu

500 µl gold nanorods (27,5 nm) üzerine 2 µl protein A ve 1 ml borat tamponu eklendi. 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. UV-VIS spektrofotometre cihazı kullanılarak spektrofotometrik ölçümler alındı.

Ayrıca 900 µl borat tamponunda 100 µl gold nanorods ve 4 µl protein A süspanse edilerek işlemler tekrarlandı. İnkübasyon işlemine geçilmeden önce spektrofotometre cihazında absorpsiyon spektrumları alındı. Daha sonra 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi ve tekrar spektrofotometrik ölçümleri alındı. Ön çalışma kapsamında Protein A'nın gold nanorods yüzeyine bağlanıp bağlanmama durumunu tespit edebilmek için spektrofotometre cihazında absorpsiyon spektrumları alınarak konjugasyon prosesinin optimizasyon çalışmaları yapıldı.




**Şekil 5. 1** UV-VIS spektrofotometre cihazı

### 5. 2. 3. Protein A – Gold Nanopartikül Bağlanmalarının İncelenmesi

Kütlesi 8 µg protein A üzerine 32 µl borat tamponu eklenerek çözündürüldü. Ayrı bir ependorfta pH'ı 5 olan 100 µl gold nanopartikülleri (20 nm, OD 1) üzerine 860 µl borat tamponu eklenerek pH'ın 7.4 olması sağlandı. Borat tamponu içinde çözdürülen protein A gold nanopartikülleri çözeltisine ilave edildi. Son hacmi 1 ml olan protein A- GNP konjugasyon çözeltisinin spektrumları alındıktan sonra 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon işleminin ardından GNP yüzeylerine protein A'ların bağlanıp bağlanmadığını tespit edebilmek için tekrar UV-VIS ölçümleri alındı.

### 5. 2. 4. Protein A – Gold Nanorods (A-GNR) ve Protein A – Gold Nanopartikül (A-GNP) Konjugasyonlarında Miktar Optimizasyonları

Kağıt tabanlı mikroakışkan test kitinde kullanılacak olan konjugatın bağlanma derecesi ve rengi önem arz etmektedir. Bu nedenle en güçlü bağlanma yapısına sahip protein A-GNR ve protein A-GNP konjugasyonu ile en uygun renk miktarlarının belirlenebilmesi için farklı parametrelerde konjugasyon işlemleri yapıldı.

Bu amaçla, 1 M olan borat tamponu distile su ilavesi ile 20 mM olarak seyreltildi. 8 µg protein A üzerine 32 µl borat tamponu eklenerek çözündürüldü. Farklı hacimlerde

protein A ve GNR hazırlanarak bağlanma gerçekleştirildi, fakat borat tamponu hacmi sabit bırakıldı. Tablo 5. 1 ve Tablo 5. 2'de farklı miktarlarda reaktifler kullanılarak oluşturulan konjugatlar gösterilmektedir.

Farklı hacimlerde hazırlanan konjugatların, inkübasyon işlemine geçilmeden önce spektrofotometre cihazında absorpsiyon spektrumları alındı. Daha sonra 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi ve tekrar spektrofotometrik ölçümleri alındı.
400-600 nm aralığındaki absorpsiyon spektrumları ölçülerek optimum koşullara sahip konjugasyon çözeltisi tespit edildi. Ölçümlerden sonra konjugasyon çözeltilerinin üzerine spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için %1 borat tamponu içeren BSA (bovine serum albümin) çözeltisinden 100'er µl ilave edilip 37 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. BSA ile satüre edilen (doyurulan) konjugasyon çözeltileri 14000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Daha sonra 100 µl %0.1 BSA içeren borat tamponu ile 2 kez yıkama yapıldı. Konjugasyon çözeltileri test kiti üzerinde uygulama işlemine hazır hale getirildi.

**Tablo 5. 1** Farkı hacimlerde hazırlanan protein A ve GNR konjugatları bileşen miktarları

| ***Konjugat*** | **Borat Tamponu** | **Protein A** | **GNR** |
|---|---|---|---|
| $K_1R$ | 250 µl | 20 µl | 200 µl |
| $K_2R$ | 250 µl | 40 µl | 200 µl |
| $K_3R$ | 250 µl | 20 µl | 400 µl |
| $K_4R$ | 250 µl | 120 µl | 400 µl |

**Tablo 5. 2** Farkı hacimlerde hazırlanan protein A ve GNP konjugatları bileşen miktarları

| ***Konjugat*** | **Borat Tamponu** | **Protein A** | **GNP** |
|---|---|---|---|
| $K_5P$ | 250 µl | 50 µl | 500 µl |
| $K_6P$ | 250 µl | 100 µl | 500 µl |
| $K_7P$ | 250 µl | 20 µl | 400 µl |
| $K_8P$ | 250 µl | 120 µl | 400 µl |

### 5. 2. 5. Parazitlerin Thoma Lamında Sayımı

VL etkeni olan *L. infantum* ve KL etkeni olan *L. tropica* ile *L. majör* promastigotları Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR'dan temin edildi.

Kültür ortamında bulunan parazitler canlılıklarını koruduklarından dolayı hareket etmektedirler. Miktar sayımı esnasında hareket halinde bulunan parazitlerin hareketlerinin önlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle, kültürden alınan 10 µl promastigot kültürü içine 90 µl formalin ilave edilerek parazitlerin canlılıklarını yitirmesi sağlandı. Thoma lamının her iki tarafına da 10 µl bu karışımdan konarak parazit sayımı ters mikroskop yardımı ile gerçekleştirildi. Yapılan sayıma göre *L. infantum* kültürünün 1 ml'sinde 165 milyon, *L. tropica* kültürünün 1 ml'sinde 60 milyon, *L. majör* kültürünün 1 ml'sinde ise 100 milyon parazit olduğu tespit edilmiştir.

### 5. 2. 6. *Leishmania* Promastigotlarından Dondurup/Çözme Yöntemi ile Antijen Hazırlanması

Antijenlerin, test kiti yüzeyine immobilizasyon işlemine hazır hale gelebilmesi için *Leishmania* promastigotlarına dondurup/çözme yöntemi uygulanmıştır. Bu yönteme göre, hücre kültüründen alınan *L. majör*, *L. tropica* ve *L. infantum* promastigotları 5 ml steril PBS ile yıkandı. Daha sonra 3200 rpm'de 10 dakika 4 °C'de santrifüj edildi ve üst faz atıldı ve alt fazda kalan pellet yeniden steril PBS ile yıkanıp tekrar santrifüj edildi. Bu işlem toplam 3 kez tekrar edilmiştir. Yıkama işlemi bittikten sonra alt fazda kalan pellet üzerine PBS ilave edilerek 1 ml' ye tamamlandı. Promastigotlar daha sonra sıvı azot tankında 5 dakika boyunca donduruldu, dondurulan promastigotlar 5 dakika boyunca su banyosunda 37 °C'de muamele edildi. Bu işlem toplamda 5 kez tekrar edildi. Bu işlemler sonucunda süpernatant içinde açığa çıkan protein miktarının tayini için 280 nm (A280) ve 260 nm (A260) dalga boylarındaki absorbans UV-spektrofotometrede ölçüldü ve protein miktarı aşağıdaki formül ile belirlendi:

- Protein derişimi (mg/ml) = (1.5 x A280-0.75 x A260) x sulandırma katsayısı

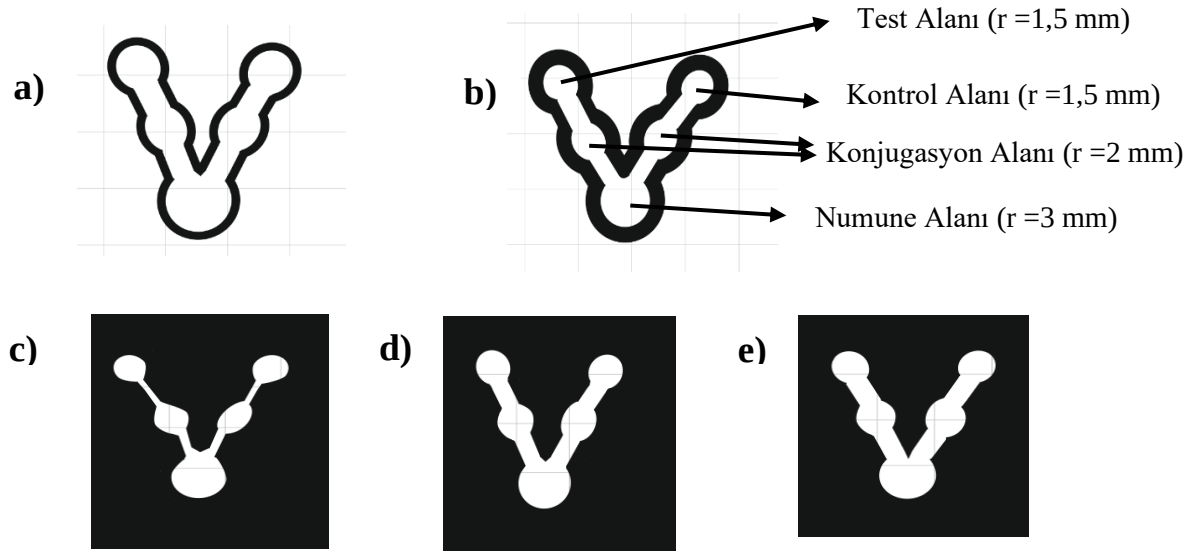
Bu formüle göre *L. infantum, L. majör ve L. tropica* promastigotlarından elde edilen protein miktarları sırasıyla 3,14 mg/ml; 2,986 mg/ml ve 4,005 mg/ml olarak hesaplandı.

### 5. 2. 7. Çalışmada Kullanılacak Kâğıt Seçimi ve Özellikleri

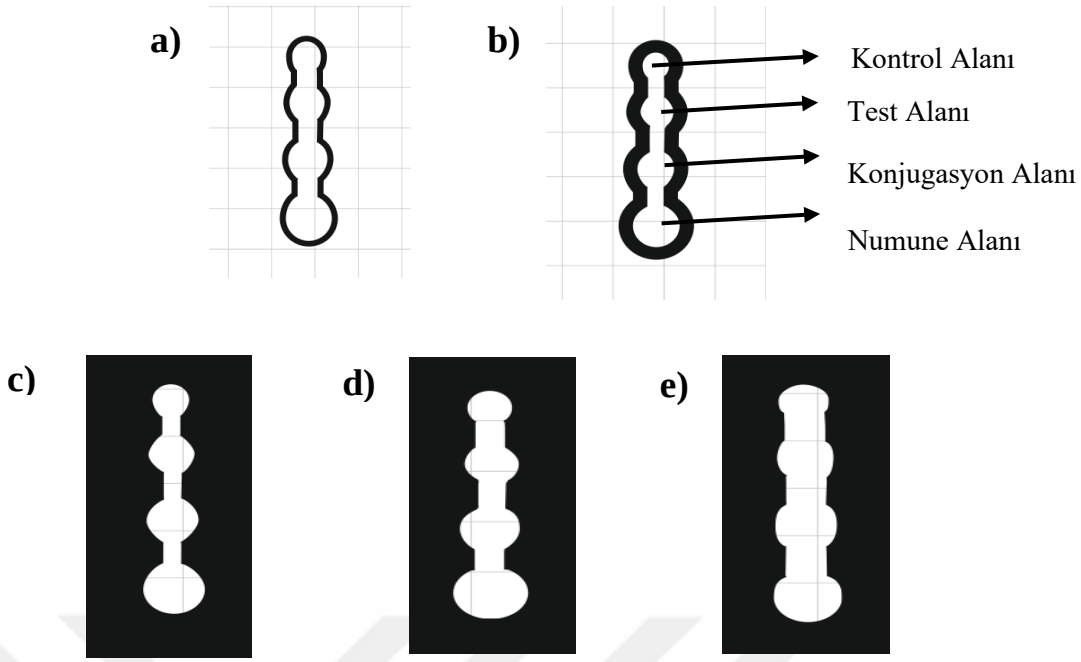
Kâğıt seçimi yapılırken, kağıdın fiziksel ve kimyasal özelliklerine dikkat edilmiştir. Kağıtların kılcal akış hızı, sıvıyı emme kapasiteleri, reaktiflerin kağıt yüzeyine immobilizasyon işlemleri, kağıdın por yapısı ve kalınlığı gibi özellikleri göz önünde bulundurularak test kiti için iki farklı kağıt üzerinde çalışmalar yapıldı. Bu deney çalışmasında kahve filtre kağıdı ve 47 mm boyutlarında 240 mikron kalınlığında, 20-25 µm gözenek büyüklüğüne sahip Whatman No.4 filtre kağıdı kullanıldı. Her iki kağıt yüzeyine de farklı µPAD tasarımları işlendi ve hidrofobik kanallar yüzeyine temas açısı testi ve washburn testi uygulanarak en uygun kağıt seçildi.

### 5. 2. 8. Kağıt Yüzeylerine Uygulanacak µPAD Tasarımları

µPAD tasarımları, CorelDRAW 2020 tasarım programı kullanılarak modellendi. Hem filtre kağıdı için hem de whatman kağıdı için 5 adet tek yönlü kanal yolu ve 5 adet iki yönlü kanal yolu olmak üzere toplam 10 farklı tasarım geliştirilmiştir. Farklı boyutlarda ve kalınlıkta hidrofilik kanallar tasarlanarak reaktiflerin kağıt yüzeyinde ilerleme hızı ve kanallardan dışarıya reaktif kaçırma olasılıkları araştırılmıştır. Kit için kullanılabilecek en uygun tasarım seçilmiştir.




**Şekil 5. 2** İki yönlü kanal yolu olan tasarımlar **a)** 2 pt anahtar genişliğine ve 3,5 mm kanal genişliğine sahip tasarım **b)** 4 pt anahtar genişliğine ve 3,5 mm kanal genişliğine sahip tasarım **c)** 2,5 mm kanal genişliğine sahip tasarım **d)** 3,5 mm kanal genişliğine sahip tasarım **e)** 4 mm kanal genişliğine sahip tasarım olarak geliştirildi. (En:17,17 mm; Boy:16,33 mm)




**Şekil 5. 3** Tek yönlü kanal yolu olan tasarımlar **a)** 2 pt anahtar genişliğine ve 3 mm kanal genişliğine sahip tasarım **b)** 4 pt anahtar genişliğine ve 3 mm kanal genişliğine sahip tasarım **c)** 2,5 mm kanal genişliğine sahip tasarım **d)** 3 mm kanal genişliğine sahip tasarım **e)** 4 mm kanal genişliğine sahip tasarım olarak geliştirildi. (En:13,7 mm; Boy:23,29 mm)

### 5. 2. 10. µPAD Tasarımlarının Üretim Aşamaları

µPAD sisteminin pek çok üretim yöntemi vardır. Bunlardan başlıcaları; fotolitografi, mürekkep püskürtmeli baskı, balmumu baskı, kağıt kesme, plotting ve plazma işlemidir[116]. Tez çalışması kapsamında öncelikle µPAD üretimini balmumu baskı (wax printing) kullanılarak yapılması amaçlanmıştır. Wax printing metodu µPAD tasarımlarını imal etmek için en uygun yollardan biri olarak kabul edilir. Fakat yaygın olarak kullanılan yazıcı modeli olan ColorQube 8000 serisinin üretiminin durdurulmuş olması ve dolayısıyla balmumu kartuşlarının da bulunmasının eskiye oranla güçleşmesi nedeniyle wax printer gerek maliyet açısından gerek ulaşılabilirlik açısından tercih edilmedi. Alternatif yol olarak wax kalemiyle hidrofobik desenler kağıt yüzeyine manuel olarak oluşturuldu. Hot plate ile 100 °C'de 3 dakika ısıtılarak kağıtların ön yüzeyine çizilen hidrofobik desenlerin arka yüzeyine de penetre olması sağlandı. Fakat gerek manuel olarak tasarımın çizilmesi gerek minimal boyutlara ulaşmakta güçlük çekilmesinden dolayı wax printing yöntemi kullanılmaktan vazgeçildi.

Sunulan bu tez çalışmasında toner lazer yazıcı yöntemi kullanılarak tasarımın üretimi sağlandı. Balmumu yazıcıya göre ulaşılması daha kolay, daha ucuz ve daha hızlı fabrikasyon özelliklerine sahip [97] olduğu için hidrofobik desenleri toner yardımıyla lazer yazıcı kullanılarak elde edildi.

Kağıt yüzeyine, tasarım programları kullanılarak çizilen modeller lazer yazıcı tarafından toner ile basıldıktan sonra hot plate ile 200°C'de 60 dakika ısıtılarak hidrofobik desenlerin kağıdın arka yüzeyine de penetrasyonu sağlandı. Böylelikle balmumu yazıcıya alternatif olarak geliştirilen yöntem ile istenilen yapıda µPAD üretildi. Deneysel çalışmalarda 600 dpi baskı çözünürlüğüne sahip olan Develop ineo+ 227 model yazıcı kullanıldı.

### 5. 2. 11. µPAD Sistemine Uygulanan Karakterizasyon Yöntemleri

Hazırlanan µPAD sisteminin kantitatif analizlerinin yapılması için çeşitli karakterizasyon işlemleri yapılmıştır. Kağıt yüzeyinin hidrofobik desenlerinin ıslanabilirlik derecelerini analiz edebilmek için temas açısı ölçümleri alınmıştır. Farklı kağıtlar ve farklı tasarımlar kullanılarak oluşturulan hidrofilik kanalların kılcal akış kuvveti sayesinde ilerleme hızının ölçülmesi ise Washburn deneyi gerçekleştirilmiştir.

#### 5. 2. 11. 1. Temas Açısı Ölçümü

Temas açısı analiz yöntemi kullanılarak hem kahve filtre kağıdının hem de whatman filtre kağıdının yüzeyine oluşturulan hidrofobik desenlerinin yüzeylerinin su ile teması sonrası ölçülen açı değeri ile ıslanabilirlik dereceleri analiz edilip en fazla hidrofobik özelliğe sahip olan kağıt türü tespit edilmiştir. Temas açısı imageJ programı kullanılarak ölçülmüştür.

#### 5. 2. 11. 2. Washburn Deneyi

Lucas – Washburn denklemine göre sıvının yayıldığı mesafe kağıt yapısına göre değişmektedir. Farklı uzunluklarda, çaplarda ve gözenekli yapılarda olan hidrofilik kanallar, sıvının ilerleme hızını değiştirmektedir [117]. Whatman No:4 filtre kağıdı ve kahve filtre kağıdı üzerine basılan farklı boyutlarda tasarlanmış hidrofilik kanalların kılcal kuvvet yardımıyla ilerleme hızları hesaplanmıştır. Kronometre ile video kaydı alınarak uygun olan tasarım ve uygun olan kağıt türü seçilmiştir.

### 5. 2. 12. Geliştirilen Kağıt Tabanlı Mikroakışkan Kitin Üzerine Reaktiflerin İmmobilizasyonu

Deney için hazırlanan kâğıt tabanlı mikroakışkan kitin test alanına, *Leishmania* promastigotlarından tarafımızca hazırlanan antijenlerden 4 µl konuldu. Daha sonra kitin kontrol alanına 3 µl protein A ilave edildi. Kitin konjugasyon alanına konjugasyon çözeltisinden 4 µl damlatıldıktan sonra kuruyuncaya kadar oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonrasında hazırlanan kit 37 °C'de 60 dakika etüvde kurumaya bırakıldı.

### 5. 2. 13. Geliştirilen Kâğıt Tabanlı Mikroakışkan Kitin Pozitif ve Negatif Hasta Serumlarında Uygulanması

Numune alanına ise Dicle Üniversitesi Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mehmet Harman'dan temin edilen pozitif *Leishmania* serumu kullanılmıştır. Ayrıca sistemin kontrolü için negatif serum örneği negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

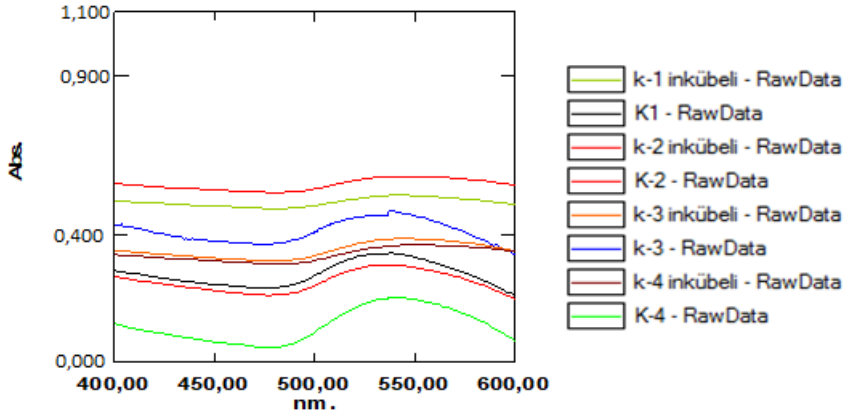
Serum viskozitesi yüksek olan bir maddedir, bu yüzden kâğıt üzerindeki akışı yavaş olacaktır. Bunu engellemek için serumlar önceden hazırlanmış olan çalışma tamponunda 1:10 oranında seyreltildi. Çalışma tamponu ile seyreltilen serumlar numune alanına yaklaşık 30 µl olacak şekilde konuldu. Böylece tarafımızca tasarlanan kağıt tabanlı mikroakışkan analitik tanı kitinin uygulaması gerçekleştirildi.

.

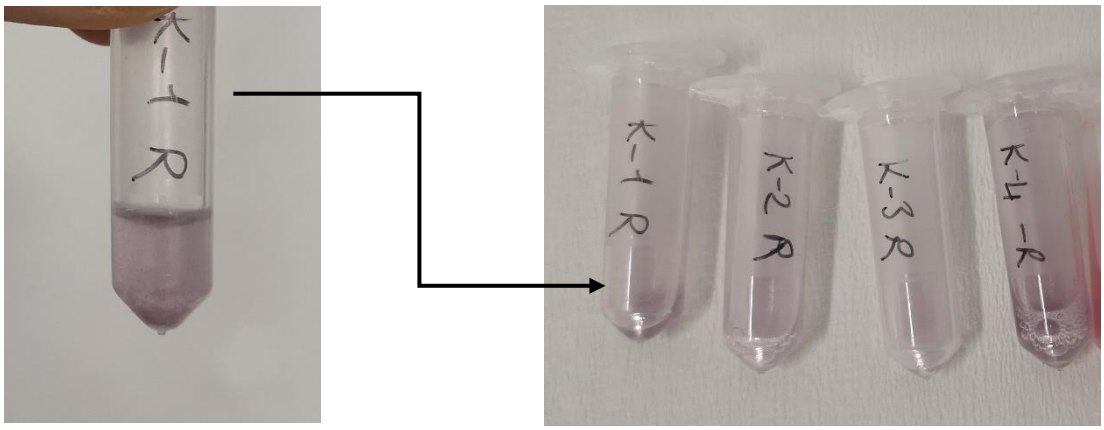
# 6. BULGULAR

## 6. 1. Protein A – Gold Nanorods Konjugasyonunda Miktar Optimizasyonları

Ön çalışma kapsamında hazırlanan ilk konjugasyon çözeltisinin absorpsiyon spektrumları inkübasyon öncesi ve sonrası ölçüldü. İnkübasyon sonrası oluşan dalga boyunda kayma görüldüğü için, GNR yüzeyine protein A'ların bağlanmış olduğu sonucuna varıldı. Konjugasyon işleminin başarılı olmasından dolayı en uygun konjugasyon çözeltisini oluşturmak için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Konjugasyon alanında kullanılacak olan protein A-GNR konjugasyon çözeltisinin en uygun konsantrasyon miktarını tespit edebilmek için farklı miktarlarda hazırlanan çözeltilerin 400-600 nm aralığındaki absorpsiyon spektrumları alınmış ve dalga boyundaki kayma derecelerine göre en verimli konjugasyon çözeltisi belirlenmiştir.
Bu amaçla dört farklı konjugasyon çözeltisi hazırlandı. Her birine sırasıyla 20 µl, 40 µl, 20 µl, 120 µl protein A eklendi. Daha sonra sırasıyla 200 µl, 200 µl, 400 µl, 400 µl GNR ilave edildi. Borat tamponunu ise her birine 250 µl olacak şekilde hazırlandı. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan konjugatların, inkübasyon işlemine geçilmeden önce spektrofotometre cihazında absorpsiyon spektrumları alındı. Daha sonra 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi ve tekrar spektrofotometrik ölçümleri alındı.




**Şekil 6. 1** Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Protein A – Gold Nanorods konjugatlarının inkübasyon öncesi ve sonrası 400-600 nm arasındaki absorpsiyon spektrumları

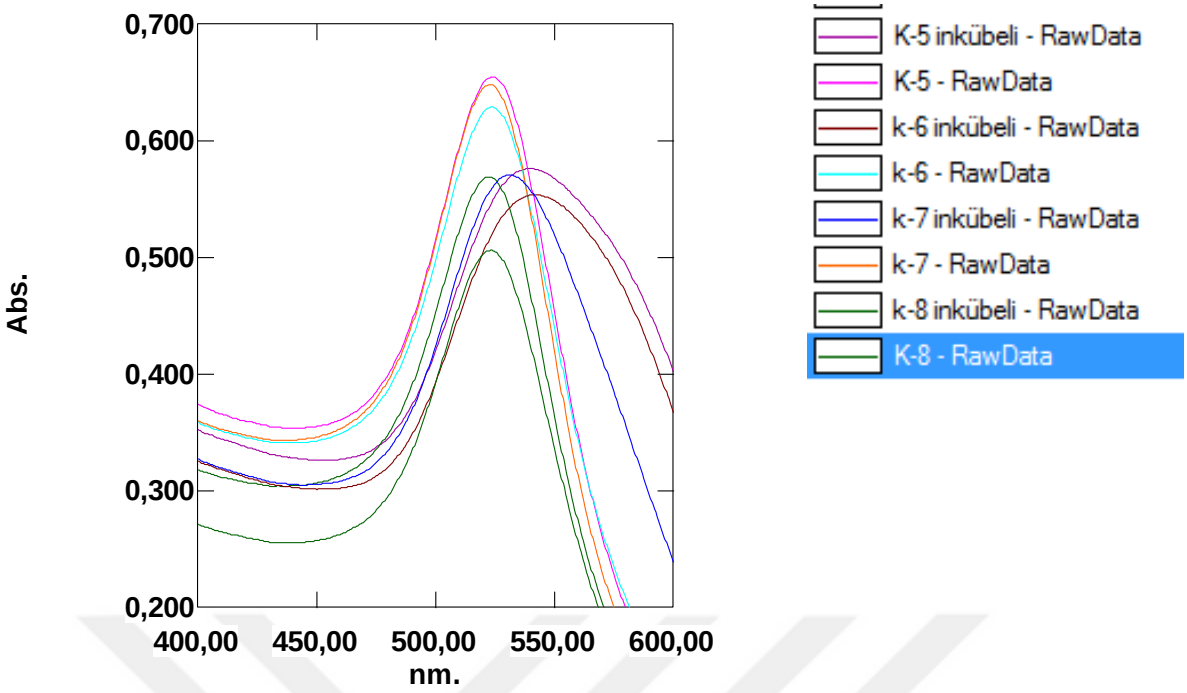



**Şekil 6. 2** Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Protein A – Gold Nanorods konjugatlarına ait çözeltileri

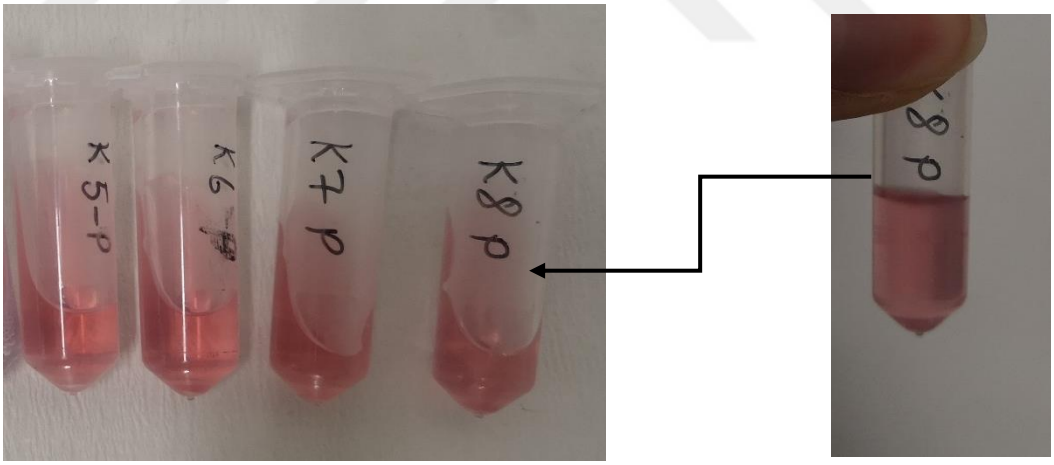
Dört farklı Protein A-GNR konjugatlarına ait absorpsiyon spektrumlarına göre inkübasyondan sonra piklerin tepe noktasında kayma görülmektedir. Bu durum protein A ve GNR arasındaki bağlanmayı doğrulamıştır. Fakat şekil 6. 2'de gösterildiği gibi konjugasyon sonrası çözeltilerinin istenilen renk yoğunluğunda olmamasından dolayı test kitleri üzerinde deney yapılmamasına karar verilmiştir.

## 6. 2. Protein A – Gold Nanopartikül Konjugasyonunda Miktar Optimizasyonları

Hazırlanan test kitinin konjugasyon alanında kullanılacak olan protein A-GNP konjugasyonunda en uygun konsantrasyonları tespit edebilmek için farklı konsantrasyonlarda hazırlanan konjugasyon çözeltilerinin 400-600 nm aralığındaki absorpsiyon spektrumları alınmış ve maksimum absorbans elde edilen dalga boyundaki kayma derecelerine göre konjugasyon için en uygun oranlar belirlenmiştir. Bu amaçla dört farklı konjugasyon çözeltisi hazırlandı. Her birine sırasıyla 50 µl, 100 µl, 20 µl, 120 µl protein A eklendi. Daha sonra sırasıyla 500 µl, 500 µl, 400 µl, 400 µl GNR ilave edildi. Borat tamponu ise her birine 250 µl olacak şekilde eklendi. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan konjugatların, inkübasyon işlemine geçilmeden önce spektrofotometre cihazında absorpsiyon spektrumları alındı. Daha sonra 37 °C'de 30 dakika inkübasyon gerçekleştirildi ve inkübasyon sonrası tekrar spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirildi.



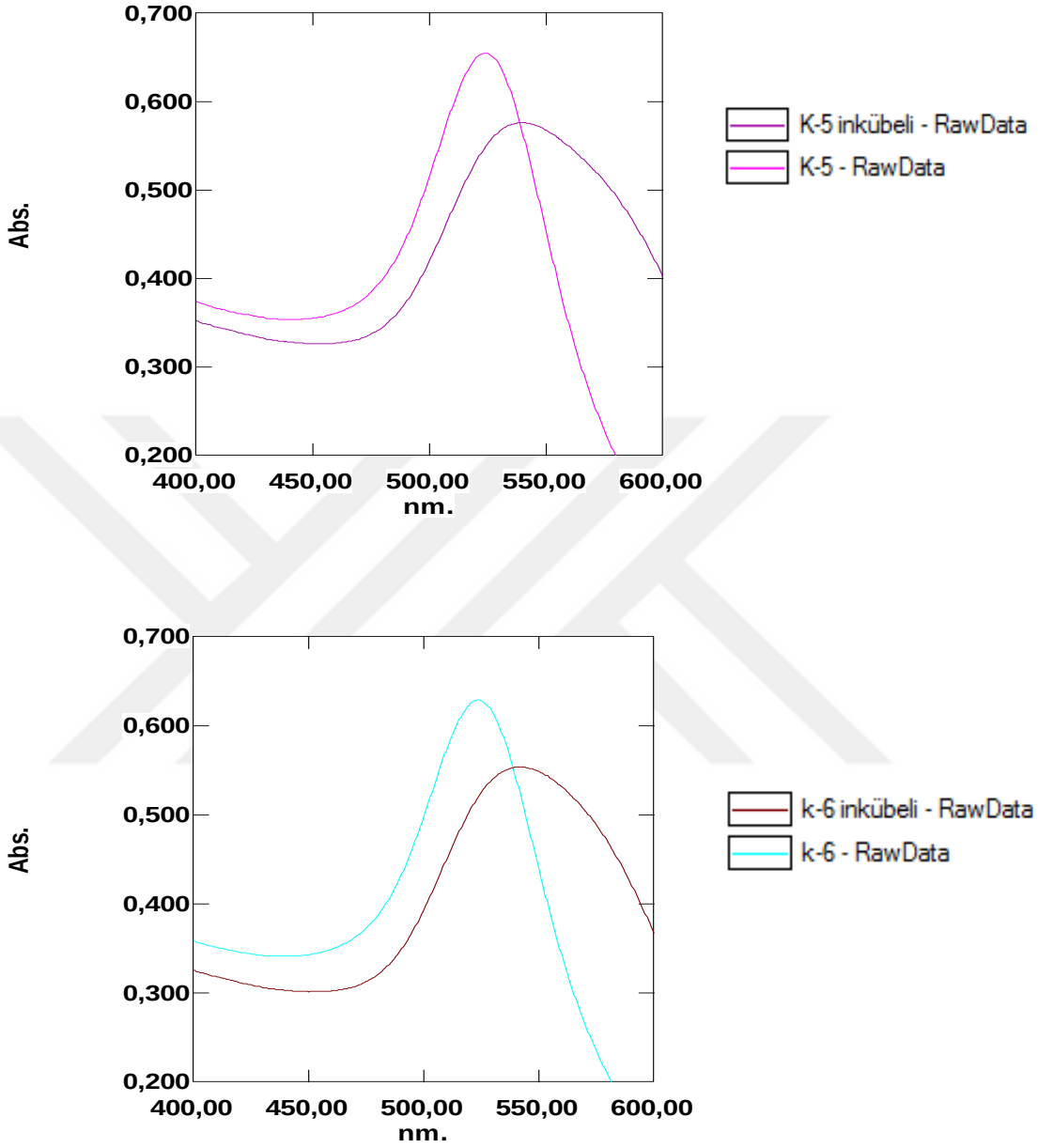

**Şekil 6. 3** Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Protein A – Gold nanopartikül konjugatlarının inkübasyon öncesi ve sonrası absorpsiyon spektrumları




**Şekil 6. 4** Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Protein A – Gold Nanopartikül konjugatlarına ait çözeltiler

Dört farklı Protein A-GNP konjugat çözeltilerinin absorpsiyon spektrumlarına göre inkübasyondan sonra protein A ve GNP arasında bağlanmalar güçlü bir şekilde görülmüştür. Özellikle K5 ve K6 konjugtlarındaki kaymalardan yola çıkılarak bu

çözeltilerin kullanılmasına karar verildi. Ayrıca Şekil 6. 4'de gösterilen konjugasyon çözeltilerin rengi istenilen renk yoğunluğuna yakın olduğu gözlemlendi.



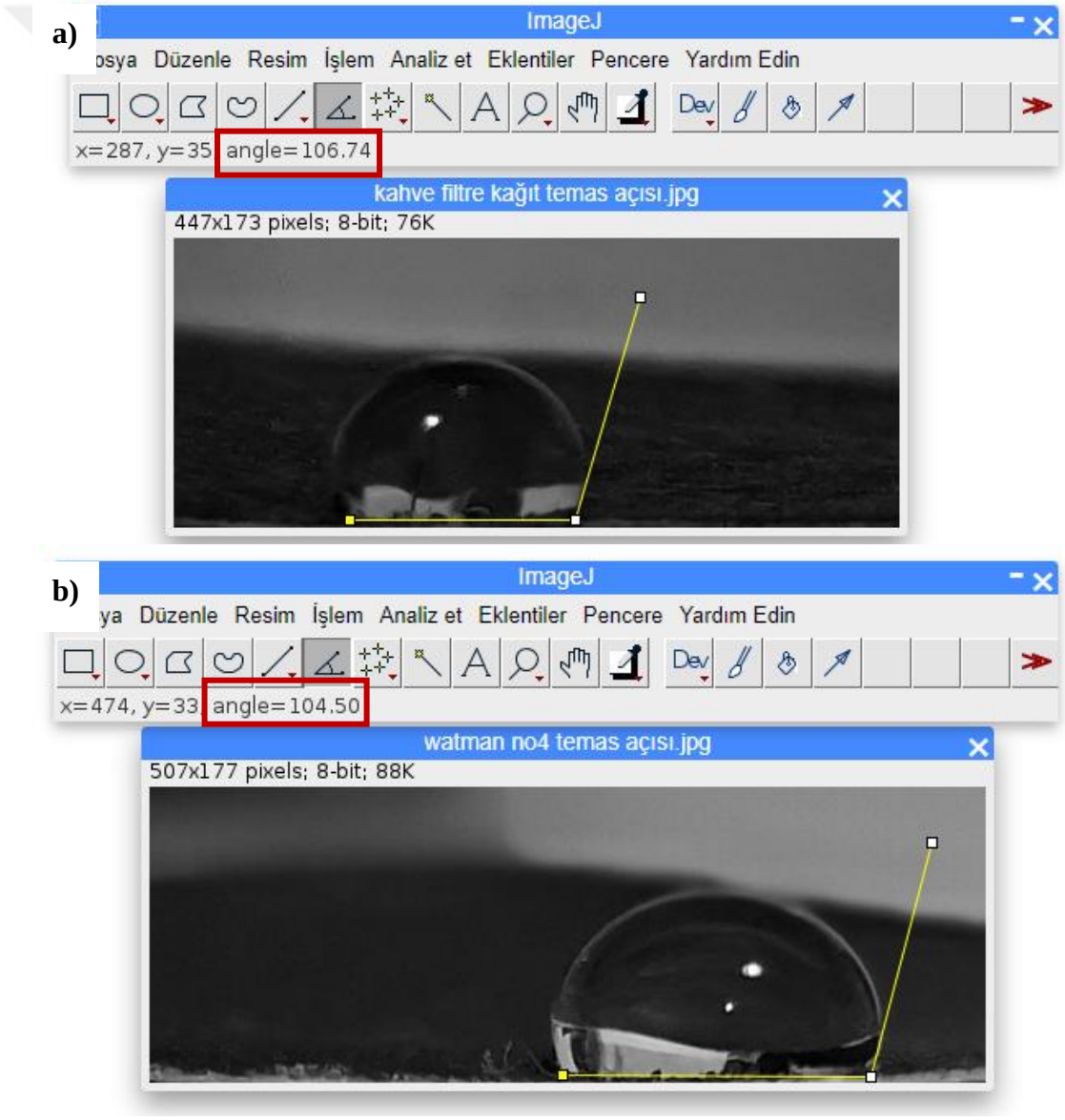

**Şekil 6. 5** K5 ve K6 konjugatlarının inkübasyon öncesi ve sonrası absorpsiyon spektrumları

## 6. 3. µPAD Sistemlerinin Temas Açısı Ölçüm Sonuçları

Deneysel çalışmalar için kullanılacak olan iki farklı kağıt türü için temas açı ölçümleri alındı. Tasarımları yapılmış olan µPAD sistemleri, lazer yazıcı ile kağıtların yüzeylerine basılarak üretimi yapıldı. Hidrofobik bariyerlerin oluşabilmesi ve temas açısının belirlenebilmesi için 200°C'de 60 dakika hot plate üzerinde ısıtılarak üst

yüzeydeki tonerin, kağıdın alt yüzeyine penetre olması sağlandı. Bu işlemler sonrasında hem kahve filtre kağıdının hem de Whatman No:4 kağıdının toner ile kaplanmış alanlarına 5 µl distile su pipet yardımıyla damlatıldı. Huawei P20 model telefon kullanılarak f1.6 diyafram açıklığındaki kamerası ile 20 megapiksel çözünürlükte, eklenen damlanın fotoğrafı çekildi. Temas açısının ölçülmesinde ImageJ programı kullanıldı.

Elde edilen fotoğraflarda yapılan analiz sonucunda kahve filtre kağıdının 106°, Whatman No:4 kağıdının ise 104,5° temas açısına sahip olduğu ve benzer hidrofobik bariyer özelliklerine sahip olduğu tespit edildi. Ayrıca hidrofobik bariyerlerin oluşumunun gözlenmesi ile kullanılan üretim yönteminin başarılı olduğu saptandı.




**Şekil 6. 6** Temas açısı ölçüm sonuçları **a)** Kahve filtre kağıdı temas açısı **b)** Whatman No.4 temas açısı

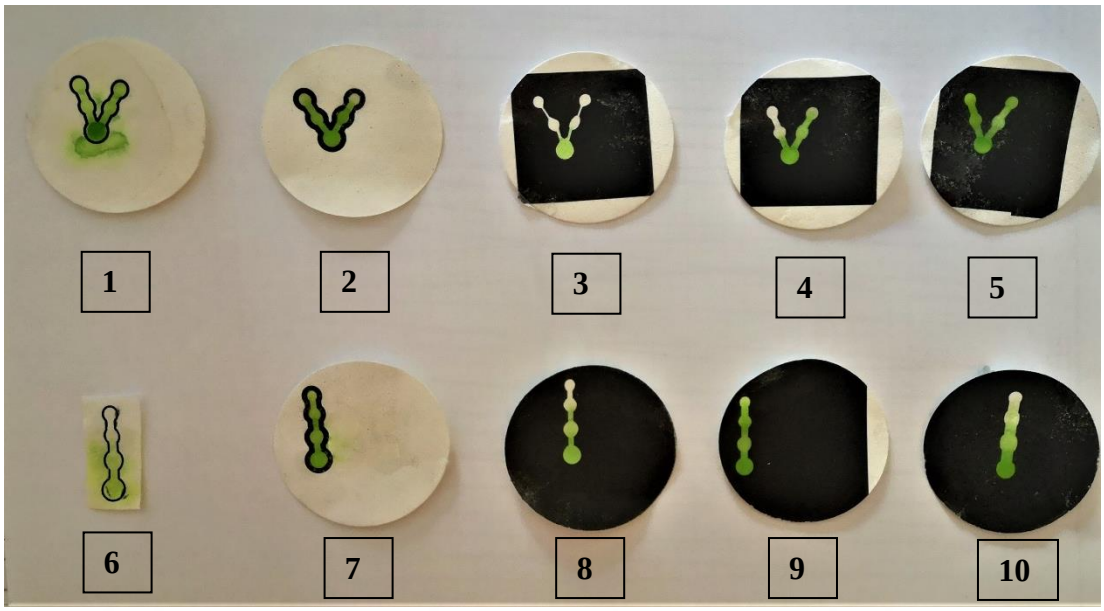
## 6. 4. µPAD Sistemlerinin Washburn Deney Sonuçları

Deneylerde kullanılabilecek en uygun µPAD tasarımı ve kağıt yapısını tespit edebilmek için Washburn deneyi yapıldı. Deney için hazır hale getirilen her bir µPAD sistemine, 10 µl yeşil renkte sıvı damlatarak kanal boyunca ilerleme hızları kronometre tutularak gözlemlendi. Ayrıca sıvının kılcal akış kuvveti ile ilerlemesinin video kaydı alındı.

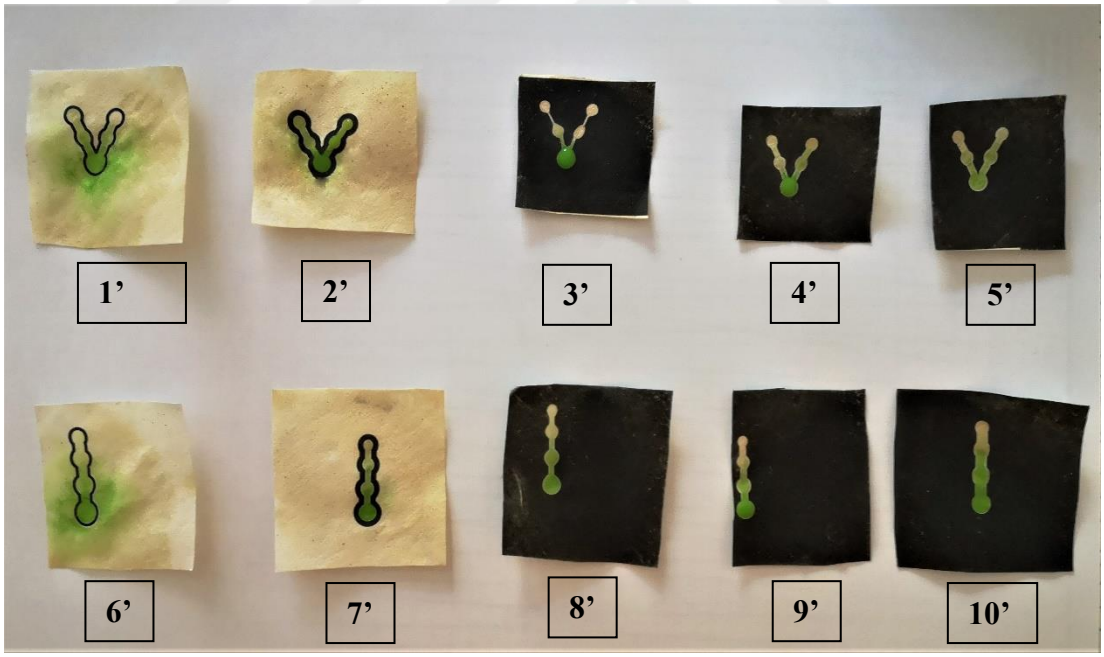
Whatman filtre kağıdına basılan tasarımlardan iki yönlü olanlar; 4 pt anahtar genişliğine ve 3,5 mm kanal genişliğine sahip tasarım 17,16 saniyede; 4 mm kanal genişliğine sahip tasarım ise 17 saniyede sistemi tamamlayarak uygun tasarım olarak seçildi. Tek yönlü olanlardan; 3 mm kanal genişliğine sahip olan tasarım 10,62 saniyede; 4 mm kanal genişliğine sahip olan tasarım ise 15,27 saniyede sistemi tamamlayarak uygun tasarım olarak seçildi. Whatman filtre kağıdına basılan tasarımlardan olan iki yönlü olanlardan; 2 pt anahtar genişliğine ve 3,5 mm kanal genişliğine sahip tasarım üzerine damlatılan sıvı sistemden taşarak kanal boyunca ilerleyemediği gözlendi. Ayrıca tek yönlü olanlardan; 2 pt anahtar genişliğine ve 3 mm kanal genişliğine sahip tasarım da aynı şekilde kanallardan taşarak kanal boyunca ilerleyemedi.

Kahve filtre kağıdına basılan tasarımlardan iki yönlü olanlar; 4 pt anahtar genişliğine ve 3,5 mm kanal genişliğine sahip tasarım 40 saniyede; 4 mm kanal genişliğine sahip olan tasarım 38 saniyede sistemi tamamlayarak uygun tasarım seçildi. Tek yönlü olanlardan; 4 mm kanal genişliğine sahip olan tasarım 25 saniyede; 4 pt anahtar genişliğine ve 3 mm kanal genişliğine sahip tasarım ise 35 saniyede sistemi tamamlayarak uygun tasarım seçildi. Kahve filtre kağıdına basılan tasarımlardan olan iki yönlü olanlardan; 2 pt anahtar genişliğine ve 3,5 mm kanal genişliğine sahip olan tasarım ve tek yönlü olanlardan; 2 pt anahtar genişliğine ve 3 mm kanal genişliğine sahip tasarım kanal dışına sıvı kaçırarak ilerleyemedikleri gözlendi.

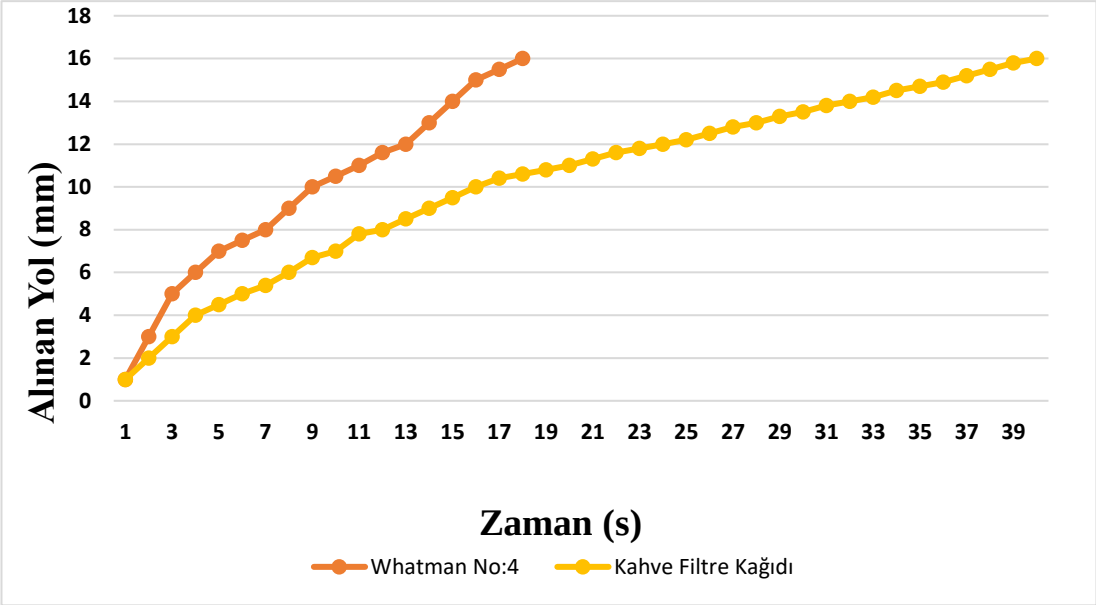
Deney sonuçlarına göre Whatman No.4 filtre kağıdının üzerine basılan tasarımların, kahve filtre kağıdı üzerine basılan tasarımlardan yaklaşık olarak iki kat daha hızlı sıvıyı emdiği ve hidrofilik kanallar boyunca sıvının ilerlediği gözlemlendi.




**Şekil 6. 7** Whatman No.4 filtre kağıdı yüzeyine uygulanan tasarımlar. (1-5 arası iki yönlü tasarımların deneysel sonuçları; 6-10 arası tek yönlü tasarımların deneysel sonuçları gösterilmiştir)

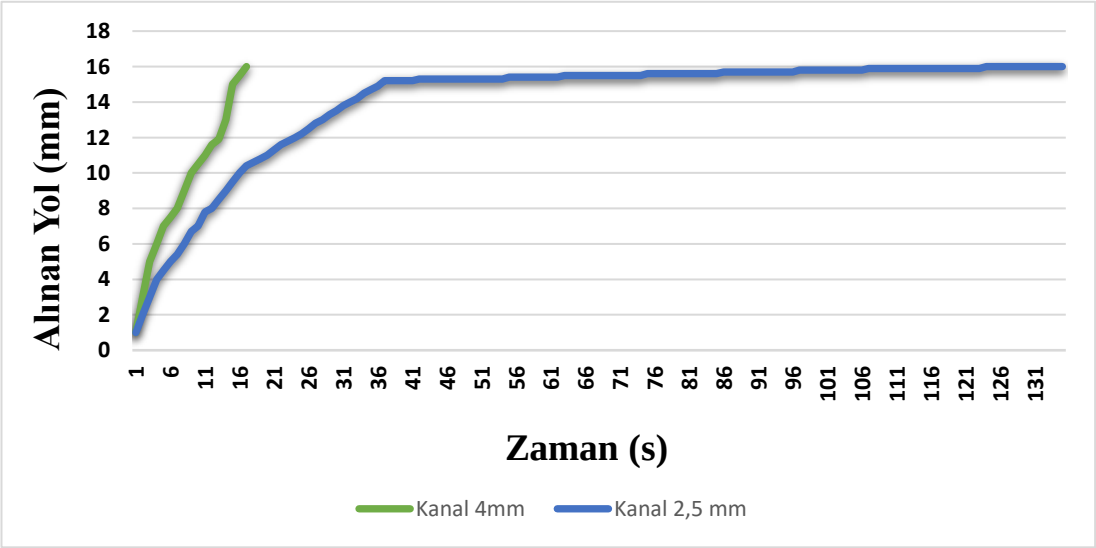



**Şekil 6. 8** Kahve filtre kâğıdı yüzeyine uygulanan tasarımlar. (1’-5’ arası iki yönlü tasarımların deneysel sonuçları; 6’-10’ arası tek yönlü tasarımların deneysel sonuçları gösterilmiştir.)




**Şekil 6. 9** İki farkı kağıt türünden üretilmiş µPAD sistemlerinin yol-zaman grafiği

Şekil 6. 9'daki grafikte aynı tasarım (iki yönlü 4 pt anahtar genişliği ve 3,5 mm kanal genişliği) fakat farklı kağıt türlerinden oluşan, aynı fabrikasyon yöntemleri uygulanarak üretilmiş olan µPAD sistemlerinin üzerine damlatılan sıvının zaman içinde aldığı yolu göstermektedir. Grafiğe göre Whatman No.4 filtre kağıdından üretilmiş olan µPAD sistemi içindeki sıvı, kahve filtre kağıdından üretilene göre iki kat daha hızlı şekilde sistemi tamamlamıştır.




**Şekil 6. 10** Whatman No.4 kağıdından üretilen farklı kanal genişliğine sahip µPAD sistemlerinin yol-zaman grafiği

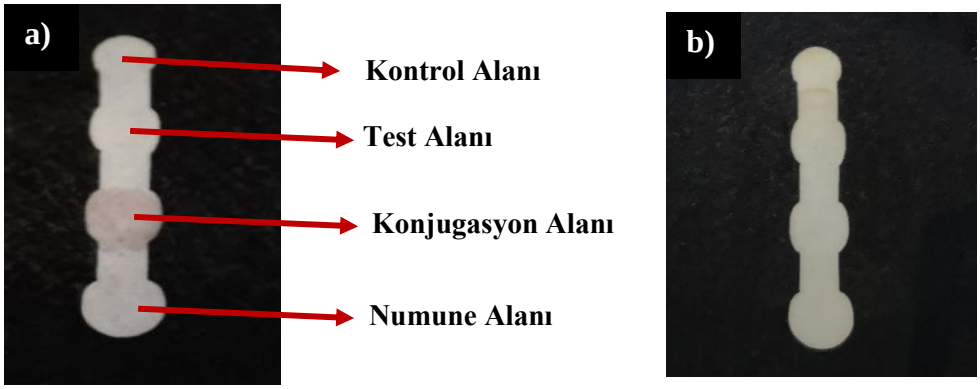
Şekil 6. 10'da ki grafikte Whatman No.4 kağıt türünden imal edilmiş, aynı tasarıma sahip fakat farklı kanal genişliklerindeki µPAD sistemlerinin üzerine damlatılan sıvının zaman içinde aldığı yolu gösterilmektedir. Grafiğe göre kanal genişliği 4 mm olan µPAD sistemindeki sıvı yaklaşık 17 saniyede sistemi tamamlamıştır. Fakat 2,5 mm genişliğe sahip kanal ancak 135 saniyede sistemi tamamlayabilmiştir.

Tüm bu veriler göre Whatman No.4 filtre kağıdına, 2,5 kanal genişliğinden büyük olan tasarımlar hız anlamında daha verimli sonuçlar verdiğinden dolayı deneysel çalışmalarda kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrıca Whatman No.4 filtre kağıdının, kahve filtre kağıdına göre daha kuvvetli emme gücü olduğu için sıvının µPAD sistemini daha hızlı bir şekilde tamamladığı tespit edildi.

## 6. 5. Geliştirilen Kâğıt Tabanlı Mikroakışkan Kitin Pozitif ve Negatif Hasta Serumlarında Uygulanması

Kahve filtre kağıdı ve Whatman No.4 kağıdı üzerinde oluşturulan toner baskı ile üretilen kağıt tabanlı mikroakışkan kitlerinin test alanına eriyik antijen, kontrol alanına protein A ve konjugasyon alanına en verimli konjugatlardan olan $K_5P$, $K_6P$ ve $K_7P$ immobilize edildi. Numune alanına ise çalışma tamponunda 1:10 oranında seyreltilen numuneden 30'ar µl ekledi. Bir dakikadan kısa bir sürede, çalışma tamponunda seyreltilmiş numune hidrofilik kanal boyunca hiç dışarıya taşmadan ilerleyip kontrol alanına kağıdın kılcal kuvveti vasıtasıyla başarılı bir şekilde ilerlediği gözlendi.

Çalışılan numune pozitif bir numune olduğu için konjugasyon alanına gelen anti *Leishmania* antikorlarının konjugata bağlanarak önce test alanındaki antijenlere bağlanıp renklenmesi, ardından kontrol alanına gelerek protein-A ile bağlanıp renklenmesi beklendi. Fakat konjugasyon renginin kağıt yüzeyine immobilizasyonundan sonra açılmaya başlaması nedeniyle test sonucu net bir şekilde gözlemlenemedi. Şekil 6.11'de hazırlanan kitin, test uygulanmadan önce ve test uygulandıktan sonraki görüntüleri gösterilmektedir.




**Şekil 6. 11 a)** µPAD sistemine reaktiflerin immobilizasyon alanları **b)** test sonucu

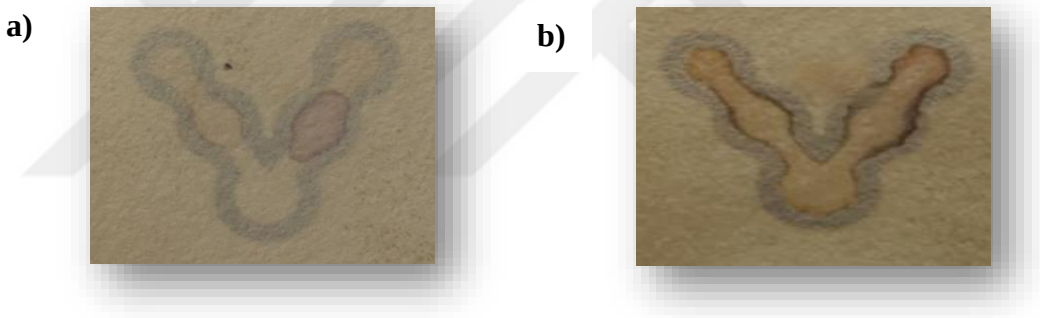
## 6. 6. Lateral Flow Tekniğinde Çalışan Reaktiflerin µPAD Sisteminde Uygulanması

µPAD sistemi için hazırlanan konjugasyon çözeltisinin kağıda immobilizasyonu sonrası açık renkli olmasından kaynaklı pozitif numenin, kitin numune alınana ilavesinden sonra test ve kontrol alanlarında kolorimetrik olarak sonuç görülmedi. Bu nedenle VISION Biotechnology firmasının SARS-CoV-2 tanısı için üretmiş oldukları çalıştığı bilinen ve piyasada satışı bulunan kit reaktifleri, µPAD sisteminin çalışabilirliğini kontrol etmek için kullanıldı. Bu kapsamda firmanın yanal akış immünokromatografik test kitleri üzerine immobilize ettikleri reaktifler µPAD sisteminde uygulandı. Test ve kontrol alanı için iki farklı konjugasyon çözeltisi hazırlandı ve 13.500 rpm' de 30 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant atıldı ve üzerine 900 µl tampon eklenerek pipetaj yapılarak rengi optimize edildi. Kağıdın konjugasyon alanlarına immobilize edilen reaktifler etüvde 37 °C'de 15 dakika kurumaya bırakıldı. Pozitif numune çalışma tamponu ile seyreltilme yapılmadan direkt numune alanına 30 µl eklendi. Beş dakika sonra konjugasyon çözeltisinin test alanındaki antikorlarla bağlanması sonucu kırmızı rengin oluşumu gözlendi. En iyi sonuç 10 dakikadan sonra gözlendi.

## 6. 7. µPAD Sistemlerinin Sodyum Hipoklorit (NaClO) ile Ağartılması

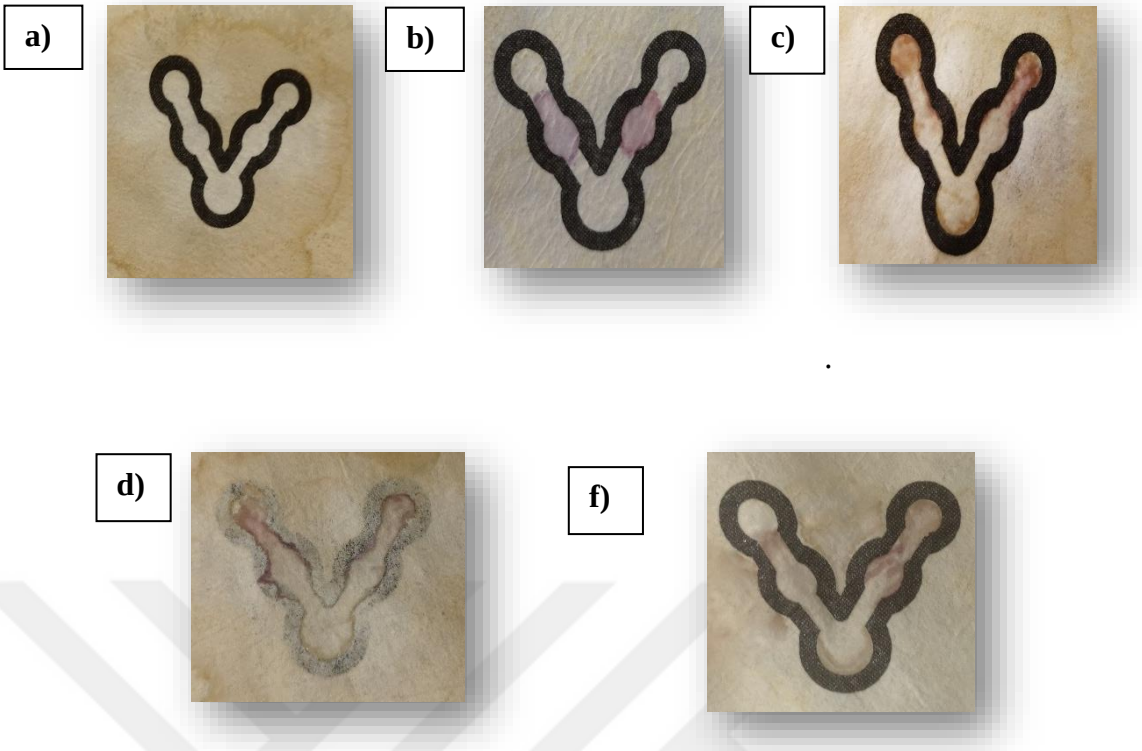
µPAD sistemi için tasarlanan desenin lazer yazıcı ile basımından sonra hot plate üzerinde 200 °C'de 60 dakika boyunca ısıtılarak hidrofobik bariyerlerin oluşmasını sağlamak µPAD sisteminin üretim aşamalarından biridir. Hot plate üzerinde kağıdın ısıtılması kağıdın orijinal rengini koyulaştırmaktadır. Bu nedenle kağıdın konjugasyon alanına emdirilen konjugasyon çözeltisinin rengi dağişmektedir ve kolorometrik sonucu engellemektedir. Çözüm olarak, kağıtlar hot plate üzerinde ısıtıldıktan sonra bir saat boyunca hidrofilik kanallarının rengi sodyum hipoklorit (NaClO) ile ağartıldı. Daha sonra 30 dakika boyunca distile su ile durulandı.

Bu işlem sonrasında kahve filtre kağıdının hidrofobik bariyerlerinin stabilitesinin korunduğu tespit edildi, bu nedenle deneylere kahve filtre kağıdı ile devam edildi.




**Şekil 6. 12 a)** Hem kontrol alanı için hem de test alanı için ayrı konjugasyon alanları (900 µl tamponda çözdürülmüş) **b)** Pozitif numune uygulandıktan sonra test ve kontrol alanlarında oluşan renklenme

Şekil 6.12.' de görüldüğü üzere kağıdın rengi ısıtıldığı için koyulaşmıştır ve oluşan renk kolorometrik analizi güçleştirmektedir. Bu nedenle kağıdın renginin açılması için sodyum hipoklorit ile ağartıldı. Ayrıca konjugasyon çözeltisinin hazırlanması aşamasında 900 µl tampon yerine 100 µl tampon ile yapılarak daha yoğun ve koyu renk elde edildi.




**Şekil 6. 13 a)** Sodyum hipoklorit ile ağartılan kit **b)** 100 µl tamponda hazırlanan yoğun konjugasyonlar **c)** Pozitif numune sonucu ön yüzeyi **d)** Pozitif numune sonucu arka yüzeyi f) Negatif numune sonucu

Sodyum hipoklorit ile ağartılan kitin hidrofilik kanallarının ısıtılma işlemi nedeniyle koyulaşan renginin açıldığı gözlemlendi (Şekil 6. 13 a). Ayrıca pozitif numunenin µPAD sistemi üzerinde hem test alanında hem de kontrol alanında oluşan sonuçların kolorimetrik olarak tespiti sağlandı (Şekil 6. 13 c). Negatif numunenin kontrol alanında renk oluşturmadığı ancak kit sistemin geçerli bir şekilde çalıştığının ispatı olarak kontrol alanının pozitif olduğu tespit edildi (Şekil 6. 13 f).

# 7. TARTIŞMA

Harvard Üniversitesi'ndeki Whitesides grubunun 2007 yılında, ucuz, kolay ulaşılabilir, hızlı ve hassas sonuç veren, başta biyomedikal alanlarda kullanılan ve tüm dünyaya tanıtılan µPAD sistemini, pahalı ve uzun süren laboratuvar testlerine alternatif olarak geliştirdiği bilinmektedir [8]. µPAD sisteminin pek çok üretim yöntemi vardır. Bunlardan başlıcaları; fotolitografi, mürekkep püskürtmeli baskı, balmumu baskı, kağıt kesme, plotting ve plazma işlemidir [116].

Tez çalışması kapsamında öncelikle µPAD üretiminin balmumu baskı (wax printing) kullanılarak yapılması amaçlanmıştır. Fakat yaygın olarak kullanılan balmumu baskı yazıcı modeli olan ColorQube 8000 serisinin üretiminin durdurulması ve ayrıca balmumu kartuşlarının da bulunulmasının eskiye oranla güçleşmesi nedeniyle wax printing yöntemine karşılık olarak toner lazer yazıcı kullanılarak tasarımın üretimi tarafımızca sağlanmıştır. Balmumu yazıcıya göre ulaşılması daha kolay, daha ucuz ve daha hızlı fabrikasyon özelliklerine sahip olduğu için hidrofobik desenleri toner yardımıyla lazer yazıcı kullanılarak literatürde de önerildiği üzere elde edildi [97].

*Leishmania*, *Trypanosomatidae* ailesinin protozoon parazitlerinden olup, farklı *Phlebotominae* türleri tarafından insan ve hayvanlara bulaştırılan Leishmaniasis hastalığına sebep olur. Hastalığın tanısı için çeşitli laboratuvar yöntemleri geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan yöntemler; serolojik testlerden olan ELISA ve IFAT testleridir [5, 118]. Bu yöntemler yeterince hassas olmamakla beraber, zaman ve maliyet açısından da zorluklar çıkarmaktadır. Erken teşhiste başarılı olamayan laboratuvar testleri diğer patojenlerle çapraz reaksiyona girerek yalancı pozitiflik oluşturabilmektedir [119].

Bu tez çalışmasında; gelişmekte olan ve gelişmemiş ülkelerde yaygın olarak görülen leishmaniasis hastalığının hızlı, ucuz ve kolay bir şekilde tespiti için kağıt tabanlı mikroakışkan tanı kiti geliştirilmesi amaçlanmıştır. Literatürde daha önce leishmaniasis hastalığının kağıt tabanlı olarak tanısı için K9-K39-K26 rekombinant kimerik antijen (rCAg) kullanılarak yanal akış test kitleri (LTF) üretildiği bilinmektedir. Leishmaniasis'in tespiti için kağıt tabanlı üretilen bu test kiti için çalışma tamponu ile seyreltilmiş 70 µl serum kullanılmıştır [7].

Yapılan tez çalışmasında ise yanal akış test tasarımından daha küçük ölçekli test kiti tasarlanmış ve çalışma tamponu ile seyreltilmiş 30 µl serum kullanılarak tespitin, daha az numune kullanılarak yapılması sağlanmıştır.

Serolojik yöntemlerle leishmaniasisin tespiti için kağıt tabanlı bir diğer çalışma ise köpek serumlarında anti *Leishmania* antikorlarının tespiti için kağıt tabanlı ELISA test kitinin geliştirilmesidir. Bu çalışmada geleneksel ELISA yöntemi 96 kuyulu mikroplaka yerine kağıt tabanlı tek kuyulu platformda gerçekleştirilmiştir. Testin inkübasyon ve yıkama adımları bulunduğundan dolayı test süresi ortalama bir saat sürmüştür [76]. Bu tez çalışmasında ise ortalama test süresi on dakika olarak ölçülerek çok daha kısa sürede sonuç alınan bir serolojik test yöntemi hedeflenmiştir. Ancak konjugasyon çözeltilerinin hazırlanması için yeterli malzeme tedarik edilemediği için yeterince optimizasyon çalışmaları yapılamamıştır.

Tez kapsamında yapılan çalışmalar üç basamaktan oluşmuştur. Birinci basamakta leishmaniasis teşhisi için kullanılacak olan µPAD sisteminin tasarımı yapılmıştır. Whatman No.4 ve kahve filtre kağıtları üzerine lazer yazıcı kullanılarak, tasarlanmış olan µPAD sistemi toner ile basılmıştır. İkinci basamakta ise kâğıt üzerine basılan desenlerin hidrofobik özellik göstermesi için ısıtma işlemleri yapılmıştır. Washburn testleri ve temas açısı ölçümleri yapılarak sistemin biyomedikal tanı için ön optimizasyon işlemleri yapılmıştır. Üçüncü basmakta kullanılacak reaktiflerin hazırlanması ve konjugasyon çözeltilerinin optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Çalışmanın birinci basamağında, kağıtların üzerine CrolDRAW programı ile tasarlanan desenler lazer yazıcı ile basılmıştır. Basılan desenlerin hidrofobik olabilmesi için 200 °C' de bir saat boyunca hot plate üzerinde ısıtılmıştır. Toner içeriği, poliester bazlı reçine oluştuğu için eriyerek kağıdın arka yüzeyine nüfuz etmiştir, böylelikle hidrofobik bariyerlerin oluşturulması sağlanmıştır.

Çalışmanın ikinci basamağında temas açısı ölçümleri ve whasburn deneyleri yapılmıştır. Temas açısı ölçümlerine göre whatman No.4 filtre kağıdının temas açısı 104.5° iken kahve filtre kağıdının temas açısı 106° olarak ölçülmüştür. Literatürde lazer printer kullanılarak whatman No.1 kağıt üzerinde toner ile elde edilen desenlerin temas açısı 120.8° olarak ölçülmüştür [97]. Başka bir çalışmada ise 3D wax printer yazıcı kullanılarak oluşturulan hidrofobik bariyerlerin temas açısının 104° olarak ölçülmüştür [120].

Literatürde farklı kanal genişliğine sahip olan biyosensörlerin, sıvının kağıt üzerinde ilerleme hızının değişebildiği belirtilmiştir. Kanal genişliği sırasıyla 1,2; 1,6 ve 2 mm olan desenlerden genişliği en fazla olan kanal üzerinde sıvının en hızlı ilerleme yaptığı gösterilmiştir [96]. Bu tez çalışmasında ise Whatman No.4 ve kahve filtre kağıtlarına Wasburn deneyi yapılmıştır. Sırasıyla 2,5; 3,5 ve 4 mm hidrofilik kanal genişliğine sahip olan desenler tasarlanmıştır. Kanal genişliği 2,5 mm olan desende sıvının diğerlerine göre daha yavaş ilerlediği tespit edilmiştir. Ayrıca toner ile basılan hidrofobik bariyerlerin kalınlığının artmasıyla, sıvının kanallardan dışarıya doğru taşma ihtimalinin azaldığı tespit edilmiştir. Hidrofilik kanal boyunca kağıt yüzeyinde kılcal akış kuvveti ile hareket eden sıvıların hızları karşılaştırılmıştır. Whatman kağıdının porlu yapısından dolayı sıvıyı daha hızlı emdiği için kahve filtre kağıdına göre sıvının iki kat hızlı hareket ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca µPAD sisteminin üretim aşamasında hot plate üzerinde kağıdın ısıtılması, kağıdın orijinal rengini koyulaştırmaktadır. Bu nedenle kağıdın konjugasyon alanına emdirilen konjugasyon çözeltisinin rengi dağişmektedir ve kolorometrik sonucu engellemektedir. Literatürde de benzer sorunlarla karşıldığı ve çözüm olarak, kağıtların hot plate üzerinde ısıtıldıktan sonra bir saat boyunca hidrofilik kanallarının renginin sodyum hipoklorit (NaClO) ile ağartıdığı ve daha sonrasında 30 dakika boyunca distile su ile durulandırma yapıldığı görülmüştür [97]. Bu nedenle sunulan tez çalışmasında benzer şekilde kağıtlar, sodyum hipoklorit (NaClO) ile ağartılıp 30 dakika boyunca distile su ile durulanmıştır. Bu işlemlerin ardından literatürde olduğu gibi ısıtma işleminden sonra koyulaşan µPAD sisteminin rengi yapılan işlemlerden sonra açılarak kolorimetrik analiz için uygun hale getirilmiştir.

Çalışmanın son basamağında hazırlanan kitler için reaktifler hazırlanmıştır. Öncelikle GNR ve GNP'lerin yüzeylerinin protein-A ile kaplanmasıyla konjugasyon literatüre uygun şekilde hazırlanmıştır [7]. Hazırlanan konjugatların UV-VIS spektrofotometre cihazı kullanılarak inkübasyon öncesi ve sonrası spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir. 400-600 nm aralığında ölçülen absorpsiyon spektrumlarına göre inkübasyonda kalan konjugasyon çözeltilerinin maksimum dalga boylarında kayma oluşmuştur. Literatür çalışmaları incelendiğinde ise *Escherıichia Coli* ve *Salmonella Enteritidis* tayinine yönelik yatay akış analiz sistemi oluşturulurken bakterinin tespiti için hazırlanan konjugasyon çözeltisi olarak benzalkonyum klorür ile sitrat bazlı AuNPs sentezledikleri görülmüştür. Bu çalışmada en verimli konjugasyon çözeltisini

tespit edebilmek için farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak 400-600 nm aralığındaki absorpsiyon spektrumları alınmış ve en verimli konjugasyonun, elde edilen grafiğe göre değerlendirdirildiği görülmüştür [121]. Belirtilen çalışmada olduğu gibi tez kapsamında da maksimum dalga boyunda inkübasyon sonrası kayma tespit edilmiş ve bu sonucun literatür ile uyumlu ilerlediği görülmüştür.

Literatüre uygun olarak bu tez çalışmasında yapılan ön çalışma kapsamında hazırlanan çözeltinin, konjugasyon oluşturmada başarılı olduğu tespit ederek protein-A'nın hem GNP ile hem de GNR ile konjugasyonlarının optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Her adımdan sonra 400-600 nm aralığında absorpsiyon spektrumları ölçülmüştür. Bu ölçümlere göre protein-A'nın GNP ile konjugasyonu sonucunda maksimum dalga boyunda daha fazla kayma olduğundan GNR'a göre daha iyi bir konjugasyon gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Ancak elde edilen konjugasyon çözeltileri kağıt yüzeyine emdirildikten sonra tespit için gerekli olan renk yoğunluğunu sağlayamadığından dolayı leishmaniasis tespiti yapılamamıştır.

Tüm bu nedenlerden dolayı toner ile oluşturulan kağıt tabanlı sistemin başarısını kontrol etmek amacıyla çalışan reaktifler kullanılarak sistemin test edilmesi yoluna gidilmiştir. Bu amaçla dünya genelinde piyasaya sürülen SARS-CoV-2 için hazırlanmış ticari hızlı tanı testleri araştırılmıştır (Tablo 7.1). Ayrıca ülkemizde de SARS-CoV-2 virüsünün tespitine yönelik serolojik tanı kitleri üreten VISION Biotechnology firması ile görüşülmüştür. Tez kapsamında oluşturulan sistemin başarısını test etmek için Türkiye'de üretilen SARS-CoV-2 tanı kitlerinin reaktifleri tez kapsamında toner ile basılarak elde edilen sistem üzerinde denenmiştir. Yanal akış test sistemi için kullanılan numune ve reaktif miktarından, çok daha az miktarda kullanılarak sistemin başarılı bir şekilde sonuç verdiği tespit edilmiştir.

**Tablo 7. 1** Sars-Cov-2 için en çok kullanılan ticari hızlı tanı testleri

| Geliştirici | Test | Açıklama |
|---|---|---|
| Jiangsu Medomics Medical Technologies (Nanjing Chine)[122] | SARS-CoV-2 hızlı kombine IgM / IgG antikor test kiti | SARS-CoV-2'ye yönelik IgM ve IgG antikorlarını tespit eden yanal akış 15 dakikalık immünolojik test. |
| Guangzhou Wondfo Biotech (Guangzhou Chine)[123] | Wondfo SARS-CoV-2 antikor testi | SARS-CoV-2'ye yönelik IgM ve IgG antikorlarını tespit eden 15 dakikalık yanal akış immünolojik testi |
| Mammoth Biosciences[124] | SARS-CoV-2 Detectr | 30 dakikalık yanal akış testi |
| Snibe Diagnostic (Shenzhen, China)[125] | MAGLUMI 2019-nCoV IgM/IgG kit | MAGLUMI kemilüminesans immünolojik test sistemi üzerinde çalışan otomatik merkezi laboratuvar hızlı testi |
| Zhejiang Orient Gene Biotech (Zhejiang, China)[126] | COVID-19 IgG / IgM Hızlı Test | Katı fazlı immünokromatografik test |
| Sugentech (Daejeon, South Korea)[127] | SGTi-flex COVID-19 IgM/IgG | SARS-CoV-2'ye yönelik IgM ve IgG antikorlarını tespit eden on dakikalık yanal akış immünolojik testi |

Maliyet açısından da değerlendirildiğinde lateral flow tekniği ile üretilen tanı kitleri üç farklı kağıdın sistematik bir şekilde birleştirilmesi ile oluşturulmaktadır. Ayrıca kağıt üzerine immobilizasyonu yapılan reaktiflerin ve kullanılan numunenin miktarı tez kapsamında geliştirilen kağıt tabanlı mikroakışkan sisteme göre daha fazladır. Geliştirilen sistem hem kullanılan reaktif ve kağıt bakımından hem de sistemin daha hızlı sonuç vermesi bakımından daha fazla avantaj sağlamaktadır.

# 8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasının amacı geleneksel laboratuvar cihazlarına alternatif oluşturabilecek, hızlı, düşük maliyetli, üretimi basit ve ulaşılması kolay olan kağıt tabanlı mikroakışkan tanı kitlerinin geliştirilmesidir. Yapılan tez çalışması kapsamında geliştirilen sistemin fabrikasyonu lazer yazıcılarda kullanılan toner ile yapıldığı için şimdiye kadar gerçekleştirilen maliyeti en düşük ve en ulaşılabilir yöntemlerden biri olduğu görülmektedir.

Bu tez çalışması sonucunda antijenler, tamponlar ve konjugasyon çözeltilerinin hazırlanması ve kağıt tabanlı mikroakışkan kitler konusunda bilgi birikimi sağlanmıştır. Kağıt tabanlı mikroakışkan kitler geleneksel üretim yöntemlerinden farklı olarak fabrikasyonu oldukça kolay olan lazer yazıcılarda bulunan toner kullanılarak geliştirilmiştir. Toner ile oluşturulan hidrofobik bariyerlerin ıslanmazlığını test etmek için temas açısı ölçülmüştür.

Kit üzerine kolorimetrik analizin yapılmasını sağlayan konjugasyon işleminin verimli olduğu görülmüştür. Fakat konjugasyonların, malzeme sıkıntısı nedeniyle kit üzerinde optimizasyonu gerçekleştirilemediğinden deney sonuçlarında istenilen yoğunlukta renk oluşumu da elde edilememiştir. Bilindiği gibi GNP renkleri, partiküllerin boyutlarına ve konsantrasyonuna bağlı değişmektedir. Konjugasyon çözeltisi hazırlanırken kullanılan GNR ve GNP' lerinin koyu renkte bir konjugasyon çözeltisi oluşturmak için yeterli boyuta sahip olmamaları (20 nm ; 27,5 nm) kolorimetrik analizin yapılmasını güçleştirmiştir. Ayrıca pH'ın sabit kalması için konjugasyonda kullanılan borat tamponu da konjugasyon renginin seyrelmesine neden olmuştur. Yapılan deneyler sonucunda, 30 nm boyutundaki bir GNP ile protein-A konjugasyonunun daha az miktarda borat tamponu ile hazırlanmasının kolorimetrik analiz için uygun bir rengin oluşturulması için uygun olabileceği öngörülmektedir. Ancak kullanılan malzemelerin kısıtlı olması ve yeterli özellikte nanogold materyale ulaşılamaması Leishmaniasise karşı kitin geliştirilmesini engellemiştir. Ayrıca yine malzeme teminindeki zorluklardan dolayı test kitinin test alanında kullanılması için *Leishmania* promastigotlarından dondurup/çözme yöntemi ile antijen elde edilmiştir. Ancak literatürde daha önce leishmaniasis hastalığının kağıt tabanlı olarak tanısı için

K9-K39-K26 rekombinant kimerik antijen (rCAg) kullanılarak yanal akış test kitleri (LTF) üretildiği bilinmektedir [7].

Karşılaşılan zorluklar nedeniyle elde edilen konjugasyon çözeltilerinin renk yoğunluğunun, kağıt üzerine immobilizasyonu sonrasında istenilen düzeyde olmadığı gözlemlenmiştir. Bu durumda test sonucunu belirleyecek olan kolorimetrik analiz de yapılamamıştır.

Ancak tasarlanan µPAD sisteminin çalışalabilirliğinin gösterilmesi amacıyla, VISION Biotechnology firmasının SARS-CoV-2 tanısı için üretmiş oldukları reaktifler, µPAD sistemine uygulanmıştır. Yapılan deneysel çalışmalarda SARS-CoV-2 için hazırlanmış olan konjugasyon çözeltisinin çok yoğun renkte olduğu gözlemlenmiş ve kağıt yüzeyine immobilizasyonu sonrasında rengini korumuştur. Pozitif olduğu bilinen numune çalışma tamponu ile seyreltilmeden 30 µl numune eklenmiştir. Beş dakika sonra konjugasyon çözeltisi test alanındaki antikorlarla bağlanarak kırmızı rengin oluşumu gözlenmiştir. En iyi sonucun 10 dakikadan sonra oluştuğu belirlenmiştir. Negatif kontrol numune bölümüne eklendiğinde sadece kontrol alanının renklendiği tespit edilerek, kitin doğru çalıştığı gözlemlenmiştir. µPAD sistemine uygun bir şekilde optimize edilmiş reaktiflerin uygulanmasıyla sistemin çalışılabilirliği kanıtlanmıştır.

Gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde teşhisin daha pratik yapılması amacıyla düşük maliyetli, kolay fabrikasyona sahip kağıt tabanlı mikroakışkan kitin üretimi lazer yazıcı kullanılarak toner ile yapılmıştır. Tez kapsamında geliştirilen kâğıt tabanlı kitin sahada hızlı bir şekilde laboratuvar personeline ve tıbbi ekipmanlara ihtiyaç duymadan, başta leishmaniasis olmak üzere birçok hastalığın tanısında kullanılabilecek ticari ürün potansiyeli bulunmaktadır. Gelecek çalışmalarda bu sistemin hem leishmaniasis için optimize edilmesi hem de farklı hastalık tanılarında kullanılması amacıyla projelendirilerek çalışmaların devam ettirilmesi planlanmaktadır.

# KAYNAKLAR


1. Moradi, M., et al., *A label-free, PCR-free and signal-on electrochemical DNA biosensor for Leishmania major based on gold nanoleaves.* Talanta, 2016. **161**: p. 48-53.
2. Souto, D.E., et al., *Development of a label-free immunosensor based on surface plasmon resonance technique for the detection of anti-Leishmania infantum antibodies in canine serum.* Biosensors and Bioelectronics, 2013. **46**: p. 22-29.
3. Perinoto, A.n.C., et al., *Biosensors for efficient diagnosis of leishmaniasis: innovations in bioanalytics for a neglected disease.* Analytical chemistry, 2010. **82**(23): p. 9763-9768.
4. Toubanaki, D.K., E. Athanasiou, and E. Karagouni, *Gold nanoparticle-based lateral flow biosensor for rapid visual detection of Leishmania-specific DNA amplification products.* Journal of microbiological methods, 2016. **127**: p. 51-58.
5. Leifso, K., et al., *Genomic and proteomic expression analysis of Leishmania promastigote and amastigote life stages: the Leishmania genome is constitutively expressed.* Molecular and biochemical parasitology, 2007. **152**(1): p. 35-46.
6. Srividya, G., et al., *Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade.* Parasitology research, 2012. **110**(3): p. 1065-1078.
7. Anfossi, L., et al., *A versatile and sensitive lateral flow immunoassay for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis.* Analytical and bioanalytical chemistry, 2018. **410**(17): p. 4123-4134.
8. Martinez, A.W., et al., *Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices*. 2010, ACS Publications.
9. Prabowo, M.H., et al., *Dengue NS1 detection in pediatric serum using microfluidic paper-based analytical devices.* Analytical and bioanalytical chemistry, 2020: p. 1-11.
10. Li, X. and X. Liu, *A microfluidic paper‐based origami nanobiosensor for label‐free, ultrasensitive immunoassays.* Advanced healthcare materials, 2016. **5**(11): p. 1326-1335.
11. Nuchtavorn, N. and M. Macka, *A novel highly flexible, simple, rapid and low-cost fabrication tool for paper-based microfluidic devices (μPADs) using technical drawing pens and in-house formulated aqueous inks.* Analytica chimica acta, 2016. **919**: p. 70-77.
12. Carrilho, E., A.W. Martinez, and G.M. Whitesides, *Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics.* Analytical chemistry, 2009. **81**(16): p. 7091-7095.
13. Klasner, S.A., et al., *based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva.* Analytical and bioanalytical chemistry, 2010. **397**(5): p. 1821-1829.
14. Li, X., et al., *based microfluidic devices by plasma treatment.* Analytical chemistry, 2008. **80**(23): p. 9131-9134.
15. Kumar, A., et al., *A paper based microfluidic device for easy detection of uric acid using positively charged gold nanoparticles.* Analyst, 2015. **140**(6): p. 1817-1821.
16. Chitnis, G., et al., *Laser-treated hydrophobic paper: an inexpensive microfluidic platform.* Lab on a Chip, 2011. **11**(6): p. 1161-1165.
17. Ali, J., et al., *Biosensors: their fundamentals, designs, types and most recent impactful applications: a review.* J. Biosens. Bioelectron, 2017. **8**(1): p. 1-9.
18. Bulut, Y. *Biyosensörlerin Tanımı ve Biyosensörlere Genel Bakış*. in *6th International Advanced Technologies Symposium (IATS'11)*. 2011.
19. TÜYLEK, Z., *Biyosensörler ve nanoteknolojik etkileşim.* Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 2017. **6**(2): p. 71-80.

20. Sağbaş, B. and N. Durakbaşa, *TIBBİ ÖLÇÜM VE ANALİZLERDE KULLANILAN BİYOSENSÖRLER.* Engineer & the Machinery Magazine, 2010(600).
21. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology 2nd Edition*

*(1997). (1992), International Union of Pure and Applied Chemistry*. Research Triangle Park, NC, USA.
22. Otlu, B. *Biyosensörler: biyoreseptör moleküller*. in *6th International Advanced Technologies Symposium (IATS'11)*. 2011.
23. Kökbaş, U., L. Kayrın, and A. Tuli, *Biyosensörler ve tıpta kullanım alanları.* Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 2013. **22**(4): p. 499-513.
24. Bhalla, N., et al., *Introduction to biosensors.* Essays Biochem, 2016. **60**(1): p. 1-8.
25. Renneberg, R., et al., *Frieder Scheller and the short history of biosensors.* Adv Biochem Eng Biotechnol, 2008. **109**: p. 1-18.
26. Sassolas, A., L.J. Blum, and B.D. Leca-Bouvier, *Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors.* Biotechnology advances, 2012. **30**(3): p. 489-511.
27. Clark Jr, L.C. and C. Lyons, *Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery.* Annals of the New York Academy of sciences, 1962. **102**(1): p. 29-45.
28. Nambiar, S. and J.T. Yeow, *Conductive polymer-based sensors for biomedical applications.* Biosensors and Bioelectronics, 2011. **26**(5): p. 1825-1832.
29. Shuichi, S., et al., *Ethanol and Lactic Acid Sensors Using Electrodes Coated with Dehydrogenase—Collagen Membranes.* Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1975. **48**(11): p. 3246-3249.
30. Schultz, J.S., *Optical sensor of plasma constituents*. 1982: U.S.
31. Liedberg, B., C. Nylander, and I. Lundstrom, *Biosensing with surface plasmon resonance--how it all started.* Biosens Bioelectron, 1995. **10**(8): p. i-ix.
32. Liu, H., et al., *Advanced biomaterials for biosensor and theranostics*, in *Biomaterials in Translational Medicine*. 2019, Elsevier. p. 213-255.
33. Monošík, R., M. Streďanský, and E. Šturdík, *Biosensors-classification, characterization and new trends.* Acta Chimica Slovaca, 2012. **5**(1): p. 109-120.
34. Uyar, İ., Ö. Güven, and I. Artıktay. *Dokuz Eylül Üniversitesi Buca Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Eğitimi Anabilim Dalı* Available from: http://kisi.deu.edu.tr/bulent.cavas/ders/bok10.pdf.
35. Yüce, M., *Bazı ağır metallerin tayininde kullanılmak üzere mikrobiyal biyosensör geliştirilmesi*, in *Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü*. 2011, Ankara Üniversitesi. p. 128.
36. Koyun, A., et al., *Biosensors and their principles.* A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones, 2012: p. 117-142.
37. Rasooly, A., *Biosensor technologies.* Methods, 2005. **1**(37): p. 1-3.
38. Çil, B., *Fenollere Duyarlı Potansiyometrik Mikro Biyosensörler ve Uygulamalar*. 2014.
39. Yüce, M., *Bazı Ağır Metallerin Tayininde Kullanılmak Üzere Mikrobiyal Biyosensör Geliştirilmesi.*, in *Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı*. 2011, Ankara Üniversitesi.
40. ÇAKAR, B., *Mikrobiyal Ped Biyosensörü ile Su Toksitesi İzlenmesi.* Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi. **7**(2): p. 484-491.
41. Bhattarai, P. and S. Hameed, *Basics of Biosensors and Nanobiosensors.* Nanobiosensors: From Design to Applications, 2020: p. 1-22.
42. Patel, P., *(Bio) sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2002. **21**(2): p. 96-115.
43. Zhu, Y.-C., et al., *Enzyme-Based Biosensors and Their Applications*, in *Advances in Enzyme Technology*. 2019, Elsevier. p. 201-223.
44. Ghindilis, A.L., et al., *Immunosensors: electrochemical sensing and other engineering approaches.* Biosensors and Bioelectronics, 1998. **13**(1): p. 113-131.

45. Skottrup, P.D., M. Nicolaisen, and A.F. Justesen, *Towards on-site pathogen detection using antibody-based sensors.* Biosensors and Bioelectronics, 2008. **24**(3): p. 339-348.
46. Gizeli, E. and C.R. Lowe, *Immunosensors.* Current Opinion in Biotechnology, 1996. **7**(1): p. 66-71.
47. Ruan, C., L. Yang, and Y. Li, *Immunobiosensor chips for detection of Escherichia c oli O157: H7 using electrochemical impedance spectroscopy.* Analytical Chemistry, 2002. **74**(18): p. 4814-4820.
48. Rogers, K.R., *Principles of affinity-based biosensors.* Molecular biotechnology, 2000. **14**(2): p. 109-129.
49. Jiang, X., et al., *Immunosensors for detection of pesticide residues.* Biosensors and Bioelectronics, 2008. **23**(11): p. 1577-1587.
50. Pirinçci, Ş.Ş., *Küçük molekül yapılı analitlerin piezoelektrik immunobiyosensörler ile tespitinde duyarlık geliştirilmesi.* 2018.
51. Arora, P., et al., *Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens.* Biosensors and Bioelectronics, 2011. **28**(1): p. 1-12.
52. Vogiazi, V., et al., *A comprehensive review: Development of electrochemical biosensors for detection of cyanotoxins in freshwater.* ACS sensors, 2019. **4**(5): p. 1151-1173.
53. Ronkainen, N.J., H.B. Halsall, and W.R. Heineman, *Electrochemical biosensors.* Chemical Society Reviews, 2010. **39**(5): p. 1747-1763.
54. Sołoducho, J. and J. Cabaj, *Electrochemical nanosized biosensors: Perspectives and future of biocatalysts.* J Anal Bioanal Tech S, 2013. **7**.
55. Vizzini, P., et al., *Electrochemical and Optical Biosensors for the Detection of Campylobacter and Listeria: An Update Look.* Micromachines, 2019. **10**(8): p. 500.
56. Li, Y., *Li, Yanbin. 2006. Section 2.3 Biosensors, pp. 52-93, of Chapter 2 Hardware, in CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI Information Technology. Edited by CIGR-The International Commission of Agricultural Engineering; Volume Editor, Axel Munack. St. Joseph, Michigan, USA: ASABE. Copyright American Society of Agricultural Engineers. Çevirmenler: Pınar DEMİRCİOĞLU ve İsmail BÖĞREKCİ.*
57. Martin, J.E., *Composite Films for Modifying Evanescent Wave Characteristics in Long-Period Grating Biosensors*. 2001, Virginia Tech.
58. ALTUNTAŞ, D.B. and Ö. TAVUKÇUOĞLU, *Micro-Sized glucose biosensor based on composite pH sensor Mikro boyutta pH temelli potansiyometrik glikoz biyosensör.*
59. Urusov, A., A. Zherdev, and B. Dzantiev, *Immunochemical methods of mycotoxin analysis (review).* Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia, 2010. **46**(3): p. 276-290.
60. Ramos-Jesus, J., et al., *A piezoelectric immunosensor for Leishmania chagasi antibodies in canine serum.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **401**(3): p. 917-925.
61. Naklua, W., R. Suedee, and P.A. Lieberzeit, *Dopaminergic receptor–ligand binding assays based on molecularly imprinted polymers on quartz crystal microbalance sensors.* Biosensors and Bioelectronics, 2016. **81**: p. 117-124.
62. Vaughan, R.D., et al., *Piezoelectric immunosensors for environmental monitoring.* International Journal of Environmental & Analytical Chemistry, 2003. **83**(7-8): p. 555-571.
63. Srivastava, S.K., C.J. Van Rijn, and M.A. Jongsma, *Biosensor-based detection of tuberculosis.* RSC advances, 2016. **6**(22): p. 17759-17771.
64. Siediuko, D. and Y. Haluzinska, *Different types of biosensors and their features.* Проблеми екологічної біотехнології, 2016(2).
65. Jainish, P. and P. Prittesh, *Biosensors and biomarkers: promising tools for cancer diagnosis.* Int J Biosen Bioelectron, 2017. **3**(4): p. 00072.

66. Chaplin, M. *Enzyme Technology*. Calorimetric biosensors 2004 6 August, 2014 [cited 26.06.2020; Available from: http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/calorimetric.html#:~:text=Enzyme%20Technology-,Calorimetric%20biosensors,generally%20applicable%20type%20of%20biosensor.
67. Bennett, A., *Enzyme Kinetics and Regulation*. 2018: Scientific e-Resources.
68. Cooper, M.A., *Optical biosensors in drug discovery.* Nature reviews Drug discovery, 2002. **1**(7): p. 515-528.
69. Borisov, S.M. and O.S. Wolfbeis, *Optical biosensors.* Chemical reviews, 2008. **108**(2): p. 423-461.
70. Fan, X., et al., *Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review.* analytica chimica acta, 2008. **620**(1-2): p. 8-26.
71. Sharma, S., et al., *Optical Biosensing with Electromagnetic Nanostructures.* Reviews in Physics, 2020: p. 100044.
72. Becker, H. and C. Gärtner, *Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems.* Analytical and bioanalytical chemistry, 2008. **390**(1): p. 89-111.
73. Friend, J. and L. Yeo, *Fabrication of microfluidic devices using polydimethylsiloxane.* Biomicrofluidics, 2010. **4**(2): p. 026502.
74. Ren, K., J. Zhou, and H. Wu, *Materials for microfluidic chip fabrication.* Accounts of chemical research, 2013. **46**(11): p. 2396-2406.
75. Peeling, R.W., et al., *Rapid tests for sexually transmitted infections (STIs): the way forward.* Sexually transmitted infections, 2006. **82**(suppl 5): p. v1-v6.
76. Costa, M., et al., *A low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: lab-on-paper.* Nanotechnology, 2014. **25**(9): p. 094006.
77. Parolo, C. and A. Merkoçi, *based nanobiosensors for diagnostics.* Chemical Society Reviews, 2013. **42**(2): p. 450-457.
78. Bhushan, B. and Y.C. Jung, *Natural and biomimetic artificial surfaces for superhydrophobicity, self-cleaning, low adhesion, and drag reduction.* Progress in Materials Science, 2011. **56**(1): p. 1-108.
79. Kurdekar, A., et al., *Comparative performance evaluation of carbon dot-based paper immunoassay on Whatman filter paper and nitrocellulose paper in the detection of HIV infection.* Microfluidics and Nanofluidics, 2016. **20**(7): p. 99.
80. Martinez, A.W., et al., *Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis.* Analytical chemistry, 2008. **80**(10): p. 3699-3707.
81. Li, X., et al., *Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing.* Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 2010. **76**(2): p. 564-570.
82. Mahato, K., A. Srivastava, and P. Chandra, *Paper based diagnostics for personalized health care: Emerging technologies and commercial aspects.* Biosensors and Bioelectronics, 2017. **96**: p. 246-259.
83. Ge, X., et al., *Nanomaterial-enhanced paper-based biosensors.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2014. **58**: p. 31-39.
84. Kuswandi, B. and A.A. Ensafi, *Perspective—paper-based biosensors: trending topic in clinical diagnostics developments and commercialization.* Journal of The Electrochemical Society, 2019. **167**(3): p. 037509.
85. Martinez, A.W., et al., *Patterned paper as a platform for inexpensive, low‐volume, portable bioassays.* Angewandte Chemie, 2007. **119**(8): p. 1340-1342.
86. Ge, L., et al., *3D origami-based multifunction-integrated immunodevice: low-cost and multiplexed sandwich chemiluminescence immunoassay on microfluidic paper-based analytical device.* Lab on a Chip, 2012. **12**(17): p. 3150-3158.

87. Rattanarat, P., et al., *A microfluidic paper-based analytical device for rapid quantification of particulate chromium.* Analytica chimica acta, 2013. **800**: p. 50-55.
88. Mentele, M.M., et al., *Microfluidic paper-based analytical device for particulate metals.* Analytical chemistry, 2012. **84**(10): p. 4474-4480.
89. Santhiago, M., C.S. Henry, and L.T. Kubota, *Low cost, simple three dimensional electrochemical paper-based analytical device for determination of p-nitrophenol.* Electrochimica Acta, 2014. **130**: p. 771-777.
90. Songjaroen, T., et al., *Blood separation on microfluidic paper-based analytical devices.* Lab on a Chip, 2012. **12**(18): p. 3392-3398.
91. Chandra, P., Y.N. Tan, and S.P. Singh, *Next generation point-of-care biomedical sensors technologies for cancer diagnosis*. Vol. 10. 2017: Springer.
92. Ansari, N., et al., *A portable microfluidic paper-based analytical device for blood detection and typing assay.* Australian Journal of Forensic Sciences, 2020: p. 1-12.
93. Han, T., et al., *Microfluidic Paper-based Analytical Devices in Clinical Applications.* Chromatographia, 2020: p. 1-9.
94. Fauziyah, N.i., et al. *Developing a Mickey-Mouse-Designed Microfluidic Paper-Based Analytical Device (μPAD) to Determine The Antioxidant Activity of Green Tea*. in *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2019. IOP Publishing.
95. Fenton, E.M., et al., *Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping.* ACS applied materials & interfaces, 2009. **1**(1): p. 124-129.
96. Zhong, Z., Z. Wang, and G. Huang, *Investigation of wax and paper materials for the fabrication of paper-based microfluidic devices.* Microsystem technologies, 2012. **18**(5): p. 649-659.
97. Ng, J.S. and M. Hashimoto, *Fabrication of paper microfluidic devices using a toner laser printer.* RSC Advances, 2020. **10**(50): p. 29797-29807.
98. Aydar, A.Y. and N. BAĞDATLIOĞLU, *Yemeklik Yağların Yüzey Gerilimi ve Temas Açılarının Belirlenmesinde Uygulanan Yöntemler.* Akademik Gıda, 2014. **12**(1): p. 108-114.
99. Guo, X., et al., *An inkjet printing paper-based immunodevice for fluorescence determination of immunoglobulin G.* Analytical Methods, 2019. **11**(27): p. 3452-3459.
100. Younas, M., et al., *Parametric analysis of wax printing technique for fabricating microfluidic paper-based analytic devices (μPAD) for milk adulteration analysis.* Microfluidics and Nanofluidics, 2019. **23**(3): p. 38.
101. David, C.V. and N. Craft, *Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis.* Dermatologic therapy, 2009. **22**(6): p. 491-502.
102. Ertem, M., et al., *Diyarbakır Dicle ilçesi Dedeköy ve Durabeyli'de kutanöz leishmaniasis olgularının incelenmesi.* Türkiye Parazitol Derg, 2004. **28**(2): p. 65-68.
103. Sirekbasan, S., et al., *Leishmania infantum'un Etken Olduğu Bir Kutanöz Leishmaniasis Olgusu.* Türkiye Parazitol Derg, 2019. **43**(1): p. 41-3.
104. Organization, W.H., *Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Commitee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010*. 2010: World Health Organization.
105. Harman, M., *Kutanöz Leishmaniasis.* Turkish Journal of Dermatology/Turk Dermatoloji Dergisis, 2015. **9**(4).
106. Gürel, M.S., et al., *Türkiye'de kutanöz leishmaniasisin durumu.* Türkiye Parazitol Derg, 2012. **36**: p. 121-9.
107. Dinçer, D., et al., *Ülkemizin Endemik Olmayan Bir İlinde (Ankara) Saptanan Leishmania infantum'a Bağlı Bir Kütanöz Leyşmanyazis Olgusu.* Mikrobiyol Bul, 2012. **46**(3): p. 499-506.
108. Zeyrek, F.Y., et al., *Kutanöz Leishmaniasis tanısında serolojinin yeri.* Kafkas Univ Vet Fak Derg, 2012. **18**(Suppl A): p. A121-4.

109. Atasoy, A., *Ege bölgesinde köpeklerde visseral leishmaniasis' in seroprevalansı*. 2005, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
110. Banuls, A.-L., M. Hide, and F. Prugnolle, *Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans.* Advances in parasitology, 2007. **64**: p. 1-458.
111. *WHO (1990). Control of Leishmaniases. Geneva: World Health Organization.*

.
112. Özlem Çalışkan, S., *Fotodinamik tedavinin leishmania tropica üzerine olan in vitro etkisi.* 2015.
113. Fatma, A., et al., *Leishmaniasisin tedavisinde antimon bileşiklerinin kullanımı.* Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2011. **22**(1): p. 53-57.
114. Ser, Ö. and H. Çetin, *Kutanöz Leishmaniasis ve Antalya ilindeki durumu.* Türkiye Parazitol Derg, 2013. **37**: p. 84-91.
115. AAT Bioquest, I. *Sodium Borate Buffer (1 M, pH 8.5) Preparation.* [cited 24 Jan. 2021; Available from: https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/sodium-borate-buffer-ph-8-5.
116. Ghosh, R., et al., *Fabrication of laser printed microfluidic paper-based analytical devices (LP-µPADs) for point-of-care applications.* Scientific reports, 2019. **9**(1): p. 1-11.
117. Hodgson, K.T. and J.C. Berg, *The effect of surfactants on wicking flow in fiber networks.* Journal of colloid and interface science, 1988. **121**(1): p. 22-31.
118. Ferreira, E., et al. *Leishmania spp. detection using a surface plasmon resonance biosensor*. in *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*. 2017.
119. Heli, H., et al., *An electrochemical genosensor for Leishmania major detection based on dual effect of immobilization and electrocatalysis of cobalt-zinc ferrite quantum dots.* Talanta, 2016. **156**: p. 172-179.
120. Chiang, C.-K., et al., *Single step and mask-free 3D wax printing of microfluidic paper-based analytical devices for glucose and nitrite assays.* Talanta, 2019. **194**: p. 837-845.
121. İlhan, H., *Escherichia Coli ve Salmonella Enteritidis Tayinine Yönelik Yatay Akış Analiz Sistemi Geliştirilmesi.* 2019.
122. Li, Z., et al., *Development and clinical application of a rapid IgM‐IgG combined antibody test for SARS‐CoV‐2 infection diagnosis.* Journal of medical virology, 2020. **92**(9): p. 1518-1524.
123. Serrano, M.M., et al., *Comparison of commercial lateral flow immunoassays and ELISA for SARS-CoV-2 antibody detection.* Journal of Clinical Virology, 2020. **129**: p. 104529.
124. Broughton, J.P., et al., *Rapid detection of 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2 using a CRISPR-based DETECTR lateral flow assay.* MedRxiv, 2020.
125. Padoan, A., et al., *Analytical performances of a chemiluminescence immunoassay for SARS-CoV-2 IgM/IgG and antibody kinetics.* Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), 2020. **58**(7): p. 1081-1088.
126. Dellière, S., et al., *Evaluation of the COVID-19 IgG/IgM rapid test from orient gene biotech.* Journal of clinical microbiology, 2020. **58**(8).
127. Sheridan, C., *Fast, portable tests come online to curb coronavirus pandemic.* Nat Biotechnol, 2020. **38**(5): p. 515-8.