

***Yersinia pestis*' in BiyoMEMS Tabanlı Elektrokimyasal Cihaz ile Tespiti**

Aylin Ersoy

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Kurumu, Bilişim ve Bilgi Güvenliği İleri Teknolojiler
Araştırma Merkezi, Kocaeli
*e-mail: aylin.ersoy@tubitak.gov.tr

Geliş tarihi/Received:03/04/2019

Kabul tarihi/Accepted:27/04/2019

Özet

Yersinia pestis (*Y. pestis*) tarihsel süreçte yaklaşık 200 milyon insanın ölümüne neden olduğu raporlanan, veba hastalığına neden olan bakteridir. *Y.pestis* ayrıca kategori A biyolojik ajan olarak sınıflanmaktadır. Hastalığın yayılımı enfekte olmuş insan ya da hayvan yoluyla olmakta, bulaşma sonrası kısa sürede ve yüksek oranda ölümle sonuçlanmaktadır. Bu nedenle müdahale süresini kısaltmak için salgının kaynağını hızlı tespit etmek çok önemlidir. Bu çalışmada, *Y. Pestis*'in hızlı tanısına yönelik biyosensör tabanlı elektrokimyasal ölçüm yöntemi geliştirilmiştir. Elektrokimyasal ölçümler TÜBİTAK BİLGEM' de geliştirilen elektrokimyasal ölçüm cihazı ile yapılmıştır. Geliştirilen yöntemde mikro işleme teknikleri kullanılarak üretilen altın elektrotların yüzeyine HRP enzimi ile işaretlenmiş ikincil antikora bağlanan *Y. pestis* in varlığı ve miktarı TMB ile oluşan reaksiyon sonucunda belirlenmiştir. Biyosensör tabanlı bu yöntem bakteriye spesifik olması, kısa sürede sonuç alınması nedeniyle gün yada saatler mertebesinde gerçekleşen konvansiyonel ölçüm yöntemlerinin yanında önem kazanmaktadır.

Anahtar kelimeler: *Y. pestis*, BioMEMS, Elektrokimyasal yöntem.

Detection of *Yersinia pestis* by BioMEMS Based Electrochemical Device

Abstract

Yersinia pestis (*Y. pestis*) is the bacterium causing plague disease, which is reported to cause death about 200 million people in the history. *Y. pestis* is also classified as category A biological agent. The spread of the disease occurs through the infected human or animal, resulting in a high rate of death in a short time after infection. For this reason, it is very important to quickly detect the source of the epidemic to shorten the inversion time. In this study, biosensor based electrochemical measurement method for rapid diagnosis of *Y. pestis* has been developed. Electrochemical measurements were done by a device developed in TÜBİTAK BİGEM. Presence and amount of *Y. pestis* was determined through the secondary anticore, marked by the HRP enzyme, on the surface of the gold electrodes produced using micro-processing techniques. Biosensor based methods are preferred because of easy handling and rapid.

Keywords: *Y. pestis*, BioMEMS, Electrochemical method.

Giriş

Mikro-nanoteknolojideki gelişmeler sayesinde, mikro-işleme teknikleri ile aktif alanı, mikro boyutlu MEMS tabanlı sensörler geliştirilmiştir. Bu sayede analizlerde kullanılan reajan miktarı azalmış, ölçüm maliyeti düşmüş, ölçüm süresi azalmıştır. Birden fazla analitin aynı anda teşhisini, vitro ve vivo analizi olanaklı kılmıştır. Mikro/nano işleme teknikleri ile üretilen biyosensörlerin başlıca kullanım alanları arasında tıp, farmasötik, çevre ve gıda güvenliği, ulusal güvenlik uygulamaları vardır (Tüylek, 2017). BiyoMEMS ve biyosensör üretiminde alttaş olarak silisyum, cam, polidimetilsiloksan, polimetilmetakrilat, kullanılarak

temel mikro işleme teknikleri olan ince film kaplama, şekillendirme, aşındırma ve derin aşındırma teknikleri kullanılmaktadır. MEMS ve BiyoMEMS üretiminde ayrıca yaygın olarak kullanılan mikro işleme tekniklerine ek olarak, mikro kalıplama, solvent destekli mikro kalıplama, enjeksiyonla kalıplama yöntemleri de kullanılmaktadır (Judy, 2001). *Y. pestis* Enterobacteriaceae ailesine mensup bir gram negatif bakteri türüdür. Yayılımı evcil hayvanlardan, kemirgen pire ısırıkları, çizikler veya ısırıklar, enfekte hayvan dokularının doğrudan taşınması, enfekte olmuş hayvanlardan gelen solunum salgılarından, enfekte insanlardan, kontamine gıda tüketimi veya laboratuvar maruziyeti yoluyla olmaktadır. *Y. pestis* tarih boyunca birçok salgınlara sebep olmuştur. Hastalığın tansısı kan tahlilleri ve lenf bezi biyopsisi ile konulmaktadır. (Simon ve ark., 2013). Ölümle sonuçlanmaması için erken tanı ve tedavi çok önemlidir. Hızlı tanı salgının kaynağının tespiti ve ölüm oranlarını azaltmak için önemlidir. Vebanın teşhisi, organizmada mikroorganizmanın izole edilmesi ya da serolojik testlerle saptanabilir. *Y. pestis* 'in polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) veya enzim bağlı immünosorbent testlerle de tanısı yapılabilir ancak çok yaygın değildir (Yang, 2018; Perry ve ark., 1997).

Bu çalışmada, *Y. pestis*'in hızlı tanısına yönelik biyosensör tabanlı elektrokimyasal ölçüm yöntemi geliştirilmiştir. Elektrokimyasal ölçümler, Palmsens firmasına ait potansiyotat kartı ve karta ait PSTrace yazılımı ile kontrol edilen, tam otomatikleştirilmiş ve özel tasarlanmış elektrokimyasal sensör cihazı ile yapılmıştır. Çalışma, turp otu enzimi (HRP) ve 3,3' 5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) arasındaki enzimatik reaksiyonunun elektrokimyasal yöntemle sensör yüzeyinde algılanması temeline dayanmaktadır.

Materyal-Metot

Materyal ve Reajenler

Monoklonal anti-*Y. pestis* antikor Tetracore (Belward, USA), peroksidaz-işaretli goat *Y. Pestis* secondary antikor, (BacTrace®*Y. Pestis* Antibody) ve *Y. pestis* Sera Care yaşam bilimleri (Gaithersburg, MD, USA) firmalarından temin edilmiştir. Pozitif kontrol olarak ısı ile öldürülmüş *Y. pestis* kullanılmıştır. Fosfat tamponlu tuz tabletleri (PBS, 0.01 M fosfat tamponu, 0.137 M sodyum klorür ve 0,0027 M potasyumklorür, pH 7,4), merkaptoundodekanoik asit (MUDA), N-hidroksisüksinimit (NHS), etanolamin, analitik sınıf etanol, horseradish peroksidaz (HRP), 3,3, 5,5-tetrametilbenzidin (TMB) Sigma Aldrich (Poole, İngiltere)'den satın alınmıştır.

Sensör Üretimi

Çalışmada TÜBİTAK BİLGEM 'de tasarlanan ve üretimi gerçekleştirilen MEMS tabanlı elektrokimyasal ölçüm cihazı kullanılmıştır. Cihaz TÜBİTAK-BİLGEM Biyoelektronik grubu tarafından tasarlanmış, üretilmiştir. Çip üretimi mikro işleme teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sensör üretimi için 750 µm kalınlığında kuvarz alltaş kullanılmıştır. Kuvarz alltaş üzerine 20 nm kalınlığında krom ve 180 nm kalınlığında altın kaplanmıştır. Kaplama işlemi Nanovak firmasına ait N-VEB 600 cihazında elektron demeti ile buharlaştırma yöntemi ile yapılmıştır. Şekillendirme işlemi Microchemicals firmasına ait AZ 1512 fotoresist kullanılarak Heidelberg DWL 66 cihazı ile 8 çalışma elektrotu, karşı elektrot ve referans elektrotlu oluşan sensör yapısı alltaş üzerine yazdırılarak

yapılmıştır. Yazdırma işlemi sonrasında sırasıyla altın ve krom aşındırılarak elektrot yapıları oluşturulmuştur. Üretilen elektrotlar 1M KCL çözeltisinde 1mM potasyum ferrosiyanat çözeltisi ile -0,5V ve -0,2 V arasında döngüsel voltametri yapılarak test edilmiştir. Döngüsel voltametri grafiği Şekil 1’ de görülmektedir.

Sensör Yüzey Modifikasyonu

Sensör altın elektrotların yüzeyi öncelikle argon plazma işlemi yapılarak temizlenmiştir. Plazma işleminin hemen ardından 2mM MUDA (%100) da 1 gece bekletilmiştir. Altın elektrotlar önce su ve %70 etanol ile yıkanmış, kurutulmuştur. Kurutulan çipler azot atmosferinde paketlenerek 4 °C’ de muhafaza edilmiştir. Sensör çip, elektrokimyasal sensör cihazının kartuşuna, kartuşun konnektör ve mikro akışkan sistem ile teması sağlanacak şekilde yerleştirilmiştir. Döngüsel voltametri ölçümleri sonrasında, sensör yüzeyi birincil antikoron kovalent bağlanmasını sağlamak için 1:1 0.4 M EDS and 0.1 M NHS ile aktive edilmiştir. Sonrasında yüzeye deizyone su içerisinde hazırlanmış 100 ug/mlt 200 ult anti- *Y. pestis* antikor gönderilmiştir. Bağlanamayan gruplar PBS ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Sensör yüzeyinde bağlanmayan kısımlar 30 µg/ml-1 BSA ile doldurularak ardından ve 1M ethanol amin (pH:4.5) ile reaksiyon sonlandırılmıştır (Savaş, 2018).

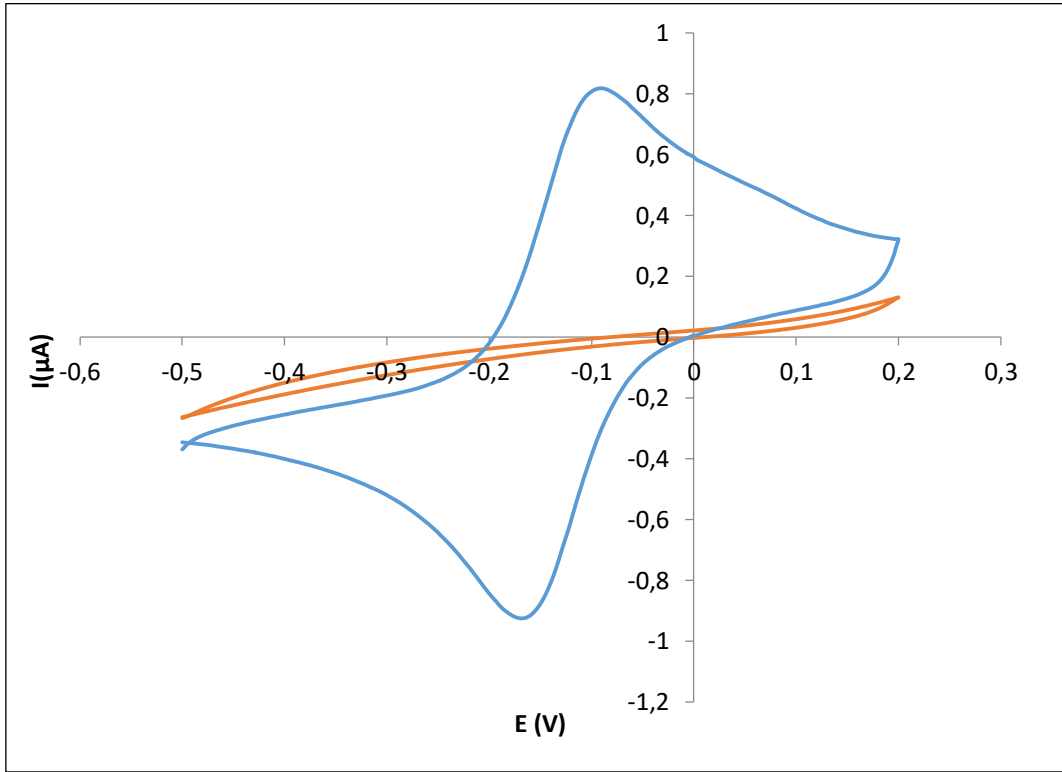
Antikor İmmobilize Edilmiş Sensor Geliştirilmesi

Bu çalışmada sensör yüzeyine öncelikle *Y. pestis* spesifik monoklonal antikorlar bağlanmıştır. Hedef *Y. pestis* 287 cfu/ mL ve 5.74 10⁸ cfu /mL konsantrasyon aralığında hazırlanarak yüzeye gönderilmiştir. HRP enzimi ile işaretlenmiş ikincil antikor ise yüzeye gönderilerek -0.1 V değerinde HRP enziminin substratı olan TMB ile amperometrik ölçüm yapılarak sinyal alınmıştır. Arka arakaya yapılan ölçümlerde sensör yüzeyinin rejenerasyonu 0.1 M HCl ile yıkanarak yapılmıştır.

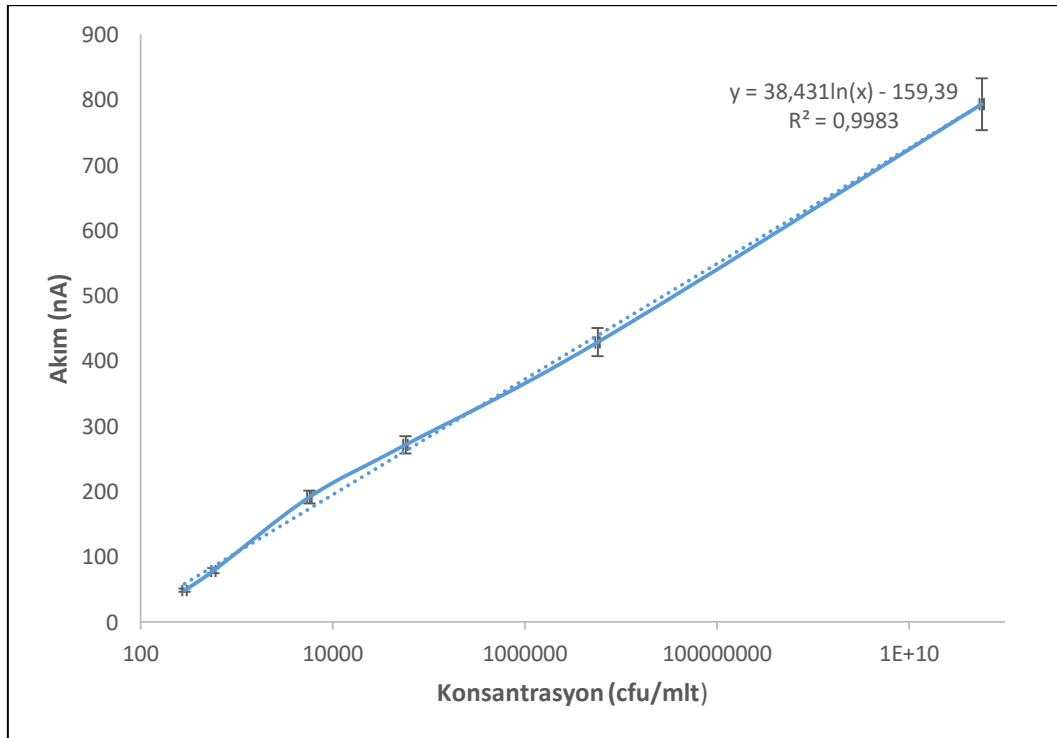
İlk konsantrasyonu 5.74 10⁸ cfu /mL olarak hazırlanan *Y. pestis* örnekleri 287 cfu/ml aralığında seyreltilmiştir. Her bir farklı konsantrasyondaki 200 µl *Y. pestis* örneği 50 µl/dk. besleme hızı ile sensör yüzeyine gönderilmiştir. HRP ile etiketli olan ikincil antikor 50 ul/min akış hızı ile sensör çip yüzeyine gönderilmiştir. HRP ve TMB reaksiyonu sonucu amprometrik olarak -0.1 V’da, gerçek zamanlı olarak izlenmiştir. Her ölçümden sonra 120ul/min akış hızı ile PBS ile (10 mM) ile çip yüzeyinin temizlenmesi sağlanmıştır (Savas ve ark, 2018).

Bulgular

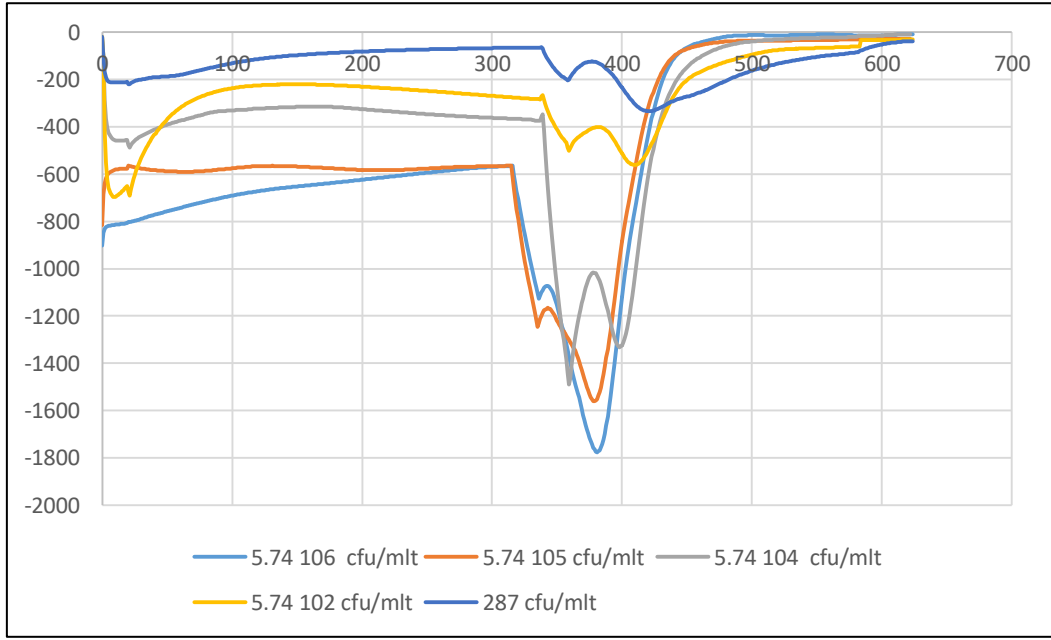
Bu çalışmada, öncelikle üretilmiş altın kalplı ve yüzey kimyası uygulanmış olan elektrotlara döngüsel voltametri işlemi uygulanarak kalite kontrol testi yapılmıştır (Şekil 1). *Y. pestis* örneğinin mikro işleme teknikleri kullanılarak üretilen sensör ile elektrokimyasal yöntemle ölçüm alınmıştır. Ölçüm verileri, cihazında kullanılan potansiyotat kartı ‘Emstat’ kartı ile kartın arayüz programı olan ‘Pstrace’ ile alınmıştır. Bu amaçla 5.74 10⁸ cfu/mlt ilk konsantrasyonu olan *Y. pestis* örneği, seyreltilerek, 5.74 10⁶ cfu/mlt, 5.74 10⁴ cfu/mlt, 5.74 10³ cfu/mlt, 5.74 10² cfu/mlt ve 287 cfu/mlt konsantrasyonlarında ölçüm alınarak tespit edilebilen en düşük limit değeri belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda örnek ölçümü yapılmış elektrotların ortalaması alınarak konsantrasyon eğrisi çizilmiş ve Şekil 2’de gösterilmiştir. Benzer şekilde tek bir elektrotun farklı konsantrasyonlar da gösterdiği amperometrik ölçüm grafiği sensogram olarak Şekil 3’de verilmiştir.



Şekil 1. MUDA kaplanmış (mavi) ve kaplanmamış elektrot yüzeyi döngüsel voltametri ölçüm grafiği.



Şekil 2. *Y. pestis* amperometrik ölçüm konsantrasyon akım grafiği.



Şekil 3. Konsantrasyona bağlı oluşturulan amperometrik ölçüm sensogramı.

Tartışma

Günümüzde immunoassay yöntemine dayalı testlerde, niteleyici olarak pozitif ve negatif sonuç veren tek kullanımlık kitler kullanılmaktadır. Bu testler laboratuvar ortamında uzmanlar tarafından yapılan testlerdir. Son yıllarda mikroelektronik üretim tekniklerindeki gelişmeler ve biyolojik test yöntemlerinin birleştirilmesiyle biyosensör cihazları geliştirilmiştir. Biyosensör içeren cihazlar ile testler sahada uzman olmayan kişiler tarafından yapılabilir hale gelmiştir. Bu gelişme özellikle *Y. pestis* gibi patojen bakterilerin hızlı tanı yapılarak salgın kaynağının bulunması ve gerekli önlemlerin alınması konusunda önem kazanmıştır (Tüylek, 2017; Judy, 2001; Simon ve ark., 2013).

Son on yılda Dünya Sağlık Örgütü tarafından binlerce veba vakası bildirmiştir. Bu durum vebanın hala elimine edilmediğini göstermektedir. Hastalığın yayılma ve bulaşma riski halk sağlığı ve yaşam koşullarının zayıf olduğu yerlerde özellikle fazladır (Yang, 2018). *Y. pestis* bulaşma sonrası gelişen ağır tablo ve yüksek ölüm oranı nedeniyle biyolojik ajan sınıfına girmektedir. *Y. pestis* kapsül benzeri yüzey antijeni salgılayabilir (antigen F1) Yapılmış çalışmalarda *Y. pestis*' in varlığını F1 antijenine karşı antikorların tespit edilerek bulunmuştur. Splettstoesser ve çalışma arkadaşları *Y. pestis* spesifik F1 antijeni geliştirdikleri ELISA tabanlı yöntemle tayin edebildikleri en düşük bakteri konsantrasyonu 4 ng/ml olmuştur (Cao, 1995; Splettstoesser, 2004). *Y. pestis* in tayininde altın standart metot indirek hemaglutinasyon assay (IHA) metodudur. (Simon, 2013). ELISA, PCR analizi ve optik yöntemlerle ölçüm için yapılan çalışmalar da vardır. Anderson ve çalışma arkadaşları fiber optik sensör¹ ile F1 antijen algılama çalışmalarında ölçebildikleri alt sınırı 0.25µg/ml olarak bulmuşlardır. Litertürde yapılmış çalışmaların çoğu PCR yada gerçek zamanlı PCR yöntemi ile yapılmıştır. Bu yöntem uzman kişiler tarafından yapılabilen ve laboratuvar alt yapısı gerektiren yöntemdir (Chase ve ark., 2005; Lorenz ve ark., 2003; Matero ve ark., 2009; Amoako ve ark., 2003; Stewart ve ark., 2008; Wei ve ark., 2006).

Bu çalışmada, salgın kaynağının hızlı, hassas ve düşük maliyetli tespiti için yöntem geliştirilmiştir. Bu amaçla, $5.74 \cdot 10^8$ cfu/mlt ilk konsantrasyonu olan *Y. pestis* içeren örnek seyreltilerek, $5.74 \cdot 10^6$ cfu/mlt, $5.74 \cdot 10^4$ cfu/mlt, $5.74 \cdot 10^3$ cfu/mlt, $5.74 \cdot 10^2$ cfu/mlt ve 287 cfu/mlt konsantrasyonlarında çözeltiler elde edilmiştir. Bu çözeltilerin her birinin sırasıyla -100 Volt gerilim değerinde amperometrik ölçümleri yapılmış 793, 428, 191, 78, 48 nA akım değerleri elde edilmiştir. Amperometrik ölçüm sonuçlarından görüldüğü gibi ölçülebilen endüşük *Y. pestis* konsantrasyonu 287 cfu/ml olarak belirlenmiştir. Şekil 2’den görüldüğü gibi çalışılan konsantrasyon aralığında yapılan regresyon analizinde ise elde edilen model ile yüksek korelasyon halinde olduğu belirlenmiştir. Şekil 3 de elektrotun konsantrasyona bağlı olarak azalış ve artışı gösterilmiş olup, amperometrik ölçüm değerleri 50-300 saniye aralığındaki değerler olarak alınmıştır.

Kaynaklar

- Amoako, K. K., Goji, N., McAvin, J. C., McConathy, M. A., Rohrer, A J., Huff, W. B., Barnes, W. J., Lohman, K. L. (2003). A real-time fluorescence polymerase chain reaction assay for the identification of *Yersinia pestis* using a field-deployable thermocycler. *Mil Med.* 168, 852–855.
- Cao, L. K., Anderson, G. P., Ligler, F. S., Ezzell, J. (1995). Detection of *Yersinia pestis* fraction 1 antigen with a fiber optic biosensor. *J Clin Microbiol.* 33(2), 336–41.
- Chase, C. J., Ulrich, M. P., Wasieloski, L. P., Kondig, J. P., Garrison, J., Lindler, L. E., Kulesh, D. A. (2005). Realtime PCR assays targeting a unique chromosomal sequence of *Yersinia pestis*. *Clin Chem.* 51:(22), 1778–1785.
- Judy, J., (2001). Microelectromechanical systems (MEMS): Fabrication, design and applications, *Smart Materials and Structures* 10(6), 1115-1134.
- Lorenz, C., Herwegh, S., Wallet, F., Armand, S., Guinet, F., Courcol, R. J. (2003). Detection of *Yersinia pestis* in sputum by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 41(10), 4873–4875.
- Matero, P., Pasanen, T., Laukkanen, R., Tissari, P., Tarkka, E., Vaara, M., Skurnik, M., Martti, V., Mikael S. (2009). Real-time multiplex PCR assay for detection of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *APMIS* . 117, 34–44.
- Perry, R., Fetherston, J. (1997). *Yersinia pestis*—Etiologic Agent of Plague, *Clinical Microbiology Reviews.* 10(1), 35–66.
- Savas, S., Ersoy, A., Gulmez, Y., Kilic, S., Levent, B., Altintas, Z. (2018). Nanoparticle Enhanced Antibody and DNA Biosensors for Sensitive Detection of *Salmonella*. *Materials*, 11(9), 1541.
- Savaş, S. (2018). Altın Nanopartikül İşaretli Biyosensör ile *E. Coli*’ nin Hızlı ve Duyarlı Tespiti. *J Biotechnol and Strategic Health Res.* 2(2):101-107.
- Simon. S., Demeure, C., Lamourette. P., Filali, S., Plaisance, M., Cre´minon. C., Volland, H., Elisabeth, C. (2013). Fast and Simple Detection of *Yersinia pestis* Applicable to Field Investigation of Plague Foci, *PLOS ONE.* 8(1), e54947
- Splettstoesser, W. D., Rahalison, L., Grunow, R., Neubauer, H., Chanteau, S. (2004). Evaluation of standardized F1 capsular antigen capture ELISA test kit for the rapid diagnosis of plague. *FEMS Immunol Med Microbio.* 141(2):149–55.
- Stewart, A., Satterfield, B., Cohen, M., O’Neill, K., Robison, R. (2008). A quadruplex real-time PCR assay for the detection of *Yersinia pestis* and its plasmids. *J Med Microbiol* 57, 324–331.
- Tomaso, H., Jacob, D., Eickhoff, M., Scholz, H. C., Al Dahouk, S., et al. (2008). Preliminary validation of real-time PCR assays for the identification of *Yersinia pestis*. *Clin Chem Lab Med.* 46, 1239–1244.
- Tüylek, Z. (2017). Biyosensör and Nanoteknolojik Etkileşim. *BEU Journal of Science.* 6(2): 71-80.

- Wei, H., Zhao, Y., Bi, Y., Liu, H., Guo, Z., Song, Y., Zhai, J., Huang, H., Yang, R. (2007). Direct detection of *Yersinia pestis* from the infected animal specimens by a fiber optic biosensor. *Sensors Actuators B*. 123, 204–10.
- Woron, A. M., Nazarian, E. J., Egan, C., McDonough, K. A., Cirino, N. M., Limberger, R. J., Musser, K. A. (2006). Development and evaluation of a 4-target multiplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection and characterization of *Yersinia pestis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 56, 261–268.
- Yang, R. (2018). Plague: Recognition, Treatment, and Prevention, *Journal of Clinical Microbiology*. 56(1) e01519-17.