

BIOSENZORY PRO DETEKCI BIOLOGICKÝCH AGENS

Miroslav POHANKA

Ústřední vojenský zdravotní ústav, Centrum biologické ochrany, Těchonín

Souhrn

V tomto review jsou charakterizovány biosenzory pro stanovení biologických agens. Po definici biosenzoru je věnován prostor jednotlivým biosenzorům děleným podle fyzikálně-chemických převodníků. Elektrochemické biosenzory jsou dále popsány jako potenciometrické, amperometrické a konduktometrické. Optické biosenzory jsou vysvětleny na použití chromogenu a nelineární optiky a následně jsou zmíněny piezoelektrické biosenzory.

Klíčová slova: Biosenzor; Optický; Elektrochemický; Piezoelektrický; Biologické agens.

Biosensors for Biological Agents' Detection

Summary

The biosensors for biological agents are mentioned in this review. After biosensor definition separate biosensors are introduced according to their physiochemical transducers. Electrochemical biosensors are further divided into potentiometric, amperometric and conductometric ones. Optical biosensors are presented as based on chromogen and/or nonlinear optics ones. Finally the piezoelectric biosensors are mentioned.

Key words: Biosensor; Optical; Electrochemical; Piezoelectric; Biological agents.

Biosenzory

Biosenzor můžeme široce definovat jako analytické zařízení obsahující selektivně citlivou složku biologického původu (biorekogniční složku) a senzorickou složku (fyzikálně-chemický převodník). Biorekogničních složek může být široké spektrum. Velice často se používají enzymy, receptory, buňky či dokonce tkáně. Pro detekci biologických agens jsou však nejvýznamnější protilátky, antigeny a případně specifické úseky nukleových kyselin. Biorekogniční složku je nutné vhodným postupem navázat na fyzikálně-chemický převodník. V tomto směru je možné použít fyzikální adsorpci nebo zachycení do vhodné membrány, avšak nejčastější metodou je chemická imobilizace. Pro konstrukci biosenzorů využitelných pro detekci biologických agens se prakticky používají tři typy fyzikálně-chemických převodníků: elektrochemické, optické a piezoelektrické. V následném popisu budou biosenzory děleny právě podle fyzikálně-chemického převodníku.

Elektrochemické biosenzory

Elektrochemický biosenzor obsahující glukóza-oxidázu pro stanovení glukózy připravený Lelan-

dem Clarkem na počátku 60. let minulého století (4) byl prvním publikovaným biosenzorem vůbec. O třináct let později bylo na trh firmou Yellow Springs Instruments Company uvedeno první komerční zařízení využívající biosenzor pro stanovení glukózy v lidské krvi (YSI 23A).

Prakticky můžeme elektrochemické biosenzory rozdělit do tří skupin: potenciometrické, amperometrické a konduktometrické (24). Potenciometrické jsou založeny na sledování koncentrace určitého iontu jako produktu enzymové značky. Pro potenciometrické elektrody je typické nulové zatížení proudem ($i = 0$). Amperometrické biosenzory sledují proudové změny ($i \neq 0$) poskytnuté v oxidoredukční reakci enzymovou značkou. Konduktometrické biosenzory využívají změny vodivosti (konduktivity) média. Pro konduktometrické biosenzory se využívá především značení ureázou. Nevýhodou konduktometrických biosenzorů je nižší citlivost ve srovnání s potenciometrickými a amperometrickými biosenzory.

Potenciometrické biosenzory mohou v jednoduchém uspořádání obsahovat například skleněnou pH elektrodu jako fyzikálně-chemický převodník. Skleněná membrána by v tomto případě byla chemicky modifikována a pokryta např. protilátkou jako biorekogniční složkou. V současné době jsou

však pro konstrukci potenciometrických biosenzorů využívány polovodičové převodníky – FET (field effect transistor). Oproti klasickým elektrodám mají výhodu ve značném zesílení výstupního signálu. Z polovodičových převodníků využívaných při stanovení biologických agens našli uplatnění ISFET (ion-sensitive field effect transistor) a především LAPS (light addressable potentiometric sensor).

Zatímco ISFET má strukturu standardního tranzistoru potaženého selektivní membránou, LAPS využívá některá zjednodušení a miniaturizační postupy. LAPS senzor je vyroben z *n*-vodivého křemíku pokrytého 30 nm oxidu křemičitého a 100 nm nitridu křemičitého. Při měření se využívá selektivní aktivace pomocí LED (light-emitting diode). Senzor se pak v osvětlené zóně stane citlivým na přítomnost iontů produkovaných enzymovou značkou. K odstranění interference jiných iontů je třeba povrch LAPS chránit, stejně jako ISFET, vhodnou selektivní membránou. Značnou výhodou je možnost multikanálového uspořádání (20). Každý kanál (měřicí oblast) je vymezen dopadajícím světlem LED. Pro potenciometrické biosenzory se jako enzymové značky převážně používají ureáza, glukózaoxidáza, peroxidáza a alkalická fosfatáza.

LAPS imunosenzor byl použit pro detekci patogenního mikroorganismu *Francisella tularensis* (33) s limitem detekce $3,4 \times 10^3$ buněk a v obdobné aplikaci pro mikroorganismus *Brucella melitensis* (15) s limitem detekce 6×10^3 buněk. V obou případech byla použita preinkubace trvající jednu hodinu. Nižšího limitu detekce dosáhli Ercole a spol. (8) při měření 1 ml pufrovaného roztoku, který obsahoval *Escherichia coli* DH5 α – 10 buněk. Měření bylo realizováno v průtočné cele obsahující LAPS pokrytý pH selektivní membránou a skleněnou destičkou pokrytou primární protilátkou specifickou proti *E. coli*. Jako sekundární protilátka pro tvorbu sendvičového komplexu byla použita králičí polyklonální protilátka kovalentně značená peroxidázou. Nízký limit detekce dosažený touto metodou byl částečně vyvážen relativně dlouhou dobou potřebnou pro realizaci jednoho měřicího cyklu: 1,5 hodiny. LAPS biosenzor obsahuje i mobilní komerční zařízení Bio-Detector (Smith Detection, Warrington, UK). Zařízení je osmikanálové. Výrobce uvádí limit detekce 10^3 CFU/ml pro mikroorganismy a 0,1 ng/ml pro toxiny. Ve zcela automatickém provedení dochází k postupnému zachycení biotinem značených primárních protilátek na streptavidin, analytu a sekundárních protilátek značených ureázou.

Z hlediska současné jednoduchosti, vysoké citlivosti a dostatečných lineárních rozsahů jsou vysoce perspektivní amperometrické biosenzory (10). Amperometrické biosenzory mohou být ve velkém měřítku snadno připraveny sítotiskem (screen printing). V nejjednodušším případě může být jako fyzikálně-chemický převodník využit zlatý, stříbrný nebo platinový drátek. Komerčně dodávané (BVT, Brno) stripky obsahují 1, 8, 16 a dokonce i více integrovaných pracovních elektrod v kombinaci s referenční elektrodou. Amperometrické biosenzory, stejně jako potenciometrické, mohou obsahovat čistě jen enzym jako biorekogniční složku. Ovšem tehdy, pokud substrát enzymu je zároveň analytem. Pro stanovení biologických agens jsou převážně používány imunosenzory a enzym v nich hraje roli značky. Pro tyto účely se nejčastěji používají peroxidáza (HRP), alkalická fosfatáza, glukózaoxidáza a acetylcholinesteráza. Podmínkou je, aby enzym byl schopen poskytnout dostatečný transfer elektronů k (od) povrchu pracovní elektrody, tzn., aby měl co nejvyšší číslo přeměny.

Amperometrický biosenzor byl např. vyvinut pro stanovení bakterie *Staphylococcus aureus* ve vzorcích mléka a masa (17). Tento biosenzor byl schopen detekovat 10^3 CFU/ml *S. aureus*. Sítotisková elektroda s imobilizovanou protilátkou byla schopna detekovat 9×10^2 *Listeria monocytogenes* buněk/ml během 3,5 hodiny dlouhého měřicího cyklu (5). Amperometrickým biosenzorem byl stanovován antigen z *Klebsiella pneumoniae* (30) s limitem detekce 5 μ g/ml. Čtyřkanálový amperometrický imunosenzor pracující v plnoprůtočné aparatuře byl použit pro detekci *Francisella tularensis* (31). Imunosenzor obsahoval purifikovanou polyklonální protilátku vázanou přes cysteamin, glutaraldehyd a protein A na zlatou elektrodu. Sekundární protilátka byla značená peroxidázou z křenu selského (HRP). Tímto imunosenzorem bylo možné detekovat již 100 živých buněk/ml. Amperometrický biosenzor byl úspěšně použit pro diagnostiku sér odebraných z pacientů nakažených patogenem *Salmonella typhimurium* (27). Tento biosenzor byl schopen pozitivně diagnostikovat všechny sérové vzorky z 28 pacientů nakažených *S. typhimurium* a statisticky relevantně je odlišit od kontrolních sér získaných ze zdravých lidí. Jedna kompletní analýza tímto biosenzorem byla hotová během 75 minut. Komerční zařízení pro stanovení několika mikroorganismů: Midas Pro (Biosensori SpA, Miláno, Itálie) je běžně dostupné. Výrobce zaručuje limit detekce mini-

málně 10^6 buněk/ml v průběhu 20minutové analýzy. Toto zařízení bylo např. použito pro testování jezerní vody (28).

Konduktometrické biosenzory vykazují menší citlivost a vyšší limity detekce pro případnou detekci mikrobiálních buněk. Perspektivnější je aplikace konduktometrických biosenzorů pro sledování vodivostních změn, které nastanou v médiu metabolickou aktivitou mikroorganismů zachycených biorekogniční složkou (7). Komerční zařízení Malthus 2000 (Malthus Instruments, Crawley, UK), pracující na uvedeném principu, může být použito pro měření rostoucí mikrobiální populace. Tímto zařízením byla např. stanovena parazitická houba *Ichthyophonus hoferi* (32) nebo plíseň *Erwinia carotovora* (9).

Optické biosenzory

Pro stanovení biologických agens můžeme zvážit použití dvou možných základních typů převodníků. Buď použití klasických fotometrických, nebo převodníků využívajících nelineární optiku. Klasické fotometrické převodníky jsou převážně spojeny s protilátkou značenou chromogenem, popsány byly i metody využívající fluorescence vlastního analytu (11). Biosenzory využívající nelineární optiku mohou být technicky řešeny různě: interferometry, SPR (surface plasmon resonance), RM (resonant mirror). Velkou výhodou převodníků využívajících nelineární optiku je možnost přímého stanovení bez použití značek (label-free).

Klasických fotometrických převodníků může být použita řada variant. Jako chromogen může posloužit substrát enzymu, přičemž enzym je vázán na protilátku nebo fluorogen. Limit detekce dosažený fluorescenčními biosenzory je zpravidla obdobný elektrochemickým biosenzorům, nicméně fluorescenční biosenzory mají obvykle kratší lineární rozsah. Moderním trendem ve fotometrických a převážně fluorometrických stanoveních jsou array techniky (6).

Biosenzor tvořený optickým vláknem pokrytým primární protilátkou proti původci moru, bakterii *Yersinia pestis* byl schopen detekovat již 5 ng/ml jejího povrchového antigenu během 30minutové preinkubace se sekundární monoklonální protilátkou značenou rhodaminem (2). Pro rozpoznání analytu se nemusí používat pouze protilátky. Například dengue virus sérotyp 3 bylo možné detekovat fluo-

rescenční analýzou jeho RNA (14). Tato analýza využila lipozomů obsahujících barvu s povrchově vázanou sekvencí DNA jako próbou. Próby hybridizovaly s cílovou RNA a následně byly magneticky separovány. Limit detekce pro tuto metodu byl stanoven na 10 pM. Automatickou tříkanálovou průtočnou analýzu zvolili Koch a spol. (13). Primární protilátky byly imobilizovány na povrchu kapilár. Zařízení obsahovalo LED a jednoduchý fotodetektor pro každý kanál. Parametry měření byly demonstrovány na zástupci toxinu – stafylokokový enterotoxin B (SEB), viru – bakteriofág M13 a bakteriálním zástupci – *E. coli*. Dosažené limity detekce byly relativně vysoké: 10 ng/ml pro SEB, 10^6 PFU/ml pro bakteriofág M 13 a 10^7 CFU/ml pro *E. coli*. Jeden měřicí cyklus bylo možné uskutečnit v rámci 15 minut. Fluorescenční microarray detekční zařízení bylo aplikováno pro detekci několika toxinů včetně SEB, letálního faktoru z bakterie *Bacillus anthracis*, beta-podjednotce cholerního toxinu a C-fragmentu tetanového toxinu (29).

Druhou skupinou optických biosenzorů jsou ty, které využívají nelineární optiku. Pravděpodobně nejrozšířenějším zástupcem této skupiny jsou SPR biosenzory, proto bude fyzikální princip těchto přístrojů nastíněn právě na nich. Velkou výhodou těchto biosenzorů je možnost pracovat bez použití speciálních prób. Technicky využívá SPR světelného svazku dopadajícího přes optický hranol na tenký kovový film a odráží se. V přesně definovaném úhlu dochází k interakci světelného záření s delokalizovanými elektrony kovového filmu, to má za následek prudký pokles intenzity světla vystupujícího z optického hranolu. Úhel, při kterém dochází k interakci záření, záleží i na fyzikálních vlastnostech kovového filmu. Biorekogniční složka se imobilizuje na vnější povrch tohoto filmu. Právě změny v biorekogniční složce (vazba analytu) jsou jediným proměnným parametrem a pouze ty ovlivňují přesnou hodnotu úhlu, při kterém dochází k interakci záření.

SPR byl např. použit pro detekci glykoproteinu gp 120 z HIV-1 (1). Autoři použili zařízení BIAcore (Pharmacia, Uppsala, Švédsko), gp 120 se vázal na imobilizovaný T-buněčný receptor CD 4. SPR bylo použito i pro detekci betatoxinu z *Clostridium perfringens* v rámci 20minutové analýzy (12) a *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium*, *Legionella pneumophila* a *Yersinia enterocolitica* (19). SPR s protilátkou proti *Salmonella typhimurium* imobilizovanou přes protein G umožnila detekovat tento patogen v roz-

mezi 10^2 až 10^9 CFU/ml (18). Protilátky v séru infikovaných prasat proti kapsidovému proteinu viru PCV2 byly detekovány SPR a výsledky porovnány s metodou ELISA (3). Protilátky bylo možno detekovat již od koncentrace 0,001 µg/ml. SPR byla schopna pozitivně detekovat 87 % infikovaných prasat na rozdíl od metody ELISA, která označila za pozitivní jen 64 %.

Piezoelektrické biosenzory

Piezoelektrické biosenzory, stejně jako SPR, jsou rovněž schopné pracovat bez použití značek. Fyzikální princip vzniku signálu při vazbě analytu je však odlišný od dosud uvedených metod měření. Piezoelektrické biosenzory pracují na principu piezoelektrického jevu, to znamená, že piezoelektrický krystal (základní část piezoelektrického převodníku) vykonává mechanické oscilace po přivedení střídavého napětí. Výsledná frekvence kmitání v oscilačním obvodu je dána mechanickými vlastnostmi piezoelektrického biosenzoru, zvláště pak celkovou hmotnostní látkou navázanou na jeho povrch (23). Jako piezoelektrický krystal může posloužit jakýkoli anizotropní (mající v jednotlivých osách symetrie různé vlastnosti) krystal. Pro konstrukci piezoelektrických biosenzorů se však nejčastěji používají komerční křemenné krystaly – QCM (quartz crystal microbalance) se základní frekvencí kmitání 5, 10 nebo 20 MHz.

Piezoelektrický biosenzor obsahující monoklonální protilátku imobilizovanou přes protein A byl schopen detekovat *S. typhimurium* v množství 10^5 buněk/ml (26), stejné množství *V. cholerae* (34) a *E. coli* v pitné vodě (21). SEB bylo možné měřit piezoelektrickým biosenzorem v rozsahu 2,5 až 60 µg/ml (16). Piezoelektrický biosenzor s imobilizovaným antigenem byl schopen detekovat 5×10^5 buněk/ml *F. tularensis* ve formě imunoprecipitátu s monoklonální IgM během 30minutového měřicího cyklu (22). Piezoelektrický biosenzor se osvědčil i pro rychlou a přitom jednoduchou sérodiagnostiku probíhající tularemické infekce (25).

Závěr

Instrumentální metody jsou nezbytnou a nenahraditelnou součástí analytických metod pro stanovení biologických agens. Souběžně s rozvojem ostatních

instrumentálních metod je patrný rozvoj i na poli biosenzorů. Biosenzory představují zajímavou alternativu ke klasickým metodám z hlediska nízkých limitů detekce, které se mohou pohybovat již na úrovni desítek buněk, a značné citlivosti k logaritmické koncentraci buněk. Aplikace biosenzorů není technicky náročná a měřicí cykly v řádu několika málo minut jsou spíše obvyklé než výjimečné a představují nezanedbatelnou výhodu. Moderním trendem ve vývoji nových biosenzorů je multikanálové uspořádání spojené s celkovou miniaturizací. Některé aplikace biosenzorů se již dočkaly komerční produkce a v následujících letech lze předpokládat pokračování tohoto trendu.

Literatura

1. BRIGHAM-BURKE, M. – EDWARDS, JR. – O'SHANNESSEY, DJ. Detection of receptor ligand interactions using surface plasmon resonance: model studies employing the HIV-1 GP120/CD4 interaction. *J. Anal. Biochem.*, 1992, vol. 205, p. 125–131.
2. CAO, KL., et al. Detection of *Yersinia pestis* Fraction 1 antigen with a fiber optic biosensor. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, vol. 33, p. 336–341.
3. CHO, HS., et al. Serodiagnostic comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and surface plasmon resonance for the detection of antibody to *Porcine circovirus type 2*. *Can. J. Vet. Res.*, 2006, vol. 70, no. 4, p. 263–268.
4. CLARK, LC. – LYONS, C. Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, vol. 148, p. 133–153.
5. CROWLEY, EL. – O'SULLIVAN, CK. – GUILBAULT, GG. Increasing the sensitivity of *Listeria monocytogenes* assay: evaluation using ELISA and amperometric detection. *Analyst.*, 1999, vol. 124, no. 3, p. 295–299.
6. DUBOIS, J., et al. An array-based approach for bacterial identification by infrared spectroscopy. *Microsc. Microanal.*, 2004, vol. 10, p. 1326–1327.
7. EHRET, R., et al. Monitoring of cellular behaviour by impedance measurements in interdigitated electrode structures. *Biosens. Bioelectron.*, 1997, vol. 12, no. 1, p. 29–41.
8. ERCOLE, C., et al. A biosensor for *Escherichia coli* based on a potentiometric alternating biosensing (PAB) transducer. *Sensor. Actuat. B*, 2002, vol. 83, p. 48–52.
9. FRAAIJE, BA., et al. Detection of soft rot *Erwinia* spp. On seed potatoes: conductimetry in comparison with dilution plating, PCR and serological assays. *Eur. J. Plant. Pathol.*, 1994, vol. 103, no. 2, p. 183–193.
10. GHINDILIS, AL., et al. Immunosensors: electrochemical sensing and other engineering approaches. *Biosens. Bioelectron.*, 1998, vol. 13, p. 113–131.
11. GLAZIER, SA. – WEETALL, HH. Autofluorescence detection of *E. coli* on silver membrane filters. *J. Microbiol. Methods*, 1994, vol. 20, p. 23–27.

12. HSIEH, HV., et al. Measurement of *Clostridium perfringens* beta-toxin production by surface plasmon resonance immunoassay. *Vaccine*, 1998, vol. 16, p. 997–1003.
13. KOCH, S., et al. Optical flow-cell multichannel immunosensor for the detection of biological warfare agents. *Biosens. Bioelectron.*, 2000, vol. 14, p. 779–784.
14. KWAKYE, S. – BAUMMER, A. A microfluidic biosensor based on nucleic acid sequence recognition. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, vol. 376, p. 1062–1068.
15. LEE, WE., et al. Characteristics of the biochemical detector sensor. *Suffield Memorandum*, 1993, vol. 1402, p. 1–23.
16. LIN, HC. – TSAI, WC. Piezoelectric crystal immunosensor for the detection of staphylococcal enterotoxin B. *Biosens. Bioelectron.*, 2003, vol. 18, no. 12, p. 1479–1483.
17. MIRHABIBOLLAHI, B. – BROOKS, JL. – KROLL, RG. An improved amperometric immunosensor for the detection and enumeration of protein A-bearing *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1990, vol. 11, no. 3, p. 119–122.
18. OH, BK., et al. Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of *Salmonella typhimurium*. *Biosens. Bioelectron.*, 2004, vol. 19, no. 11, p. 1497–1504.
19. OH, BK., et al. The fabrication of protein chip based on surface plasmon resonance for detection of pathogens. *Biosens. Bioelectron.*, 2005, vol. 20, p. 1847–1850.
20. OWICKY, JC., et al. The light addressable potentiometric sensor: principles and biological applications. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1994, vol. 23, p. 87–113.
21. PLOMER, M. – GUILBAULT, GG. – HOCK, B. Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of *Enterobacteria*. *Enzyme. Microb. Technol.*, 1992, vol. 14, p. 230–235.
22. POHANKA, M. – SKLÁDAL, P. Piezoelectric immunosensor for *Francisella tularensis* detection using immunoglobulin M in a limiting dilution. *Anal. Lett.*, 2005, vol. 38, no. 3, p. 411–422.
23. POHANKA, M. Piezoelektrické biosenzory. *Zprav. voj. Farm.*, 2006, roč. 16, č. 4, s. 15–17.
24. POHANKA, M. Elektrochemické biosenzory. *Zprav. voj. Farm.*, 2007, roč. 17, č. 2, s. 32–34.
25. POHANKA, M. – PAVLIŠ, O. – SKLÁDAL, P. Diagnosis of tularemia using piezoelectric biosensor technology. *Talanta*, 2007, vol. 71, no. 2, p. 981–985.
26. PRUSAK-SOCHACZEWSKI, E. – LUONG, JHT. – GUILBAULT, GG. Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of *Salmonella typhimurium*. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 1990, vol. 12, p. 173–177.
27. RAO, VK., et al. Amperometric immunosensor for detection of antibodies of *Salmonella typhi* in patient serum. *Anal. Chim. Acta*, 2005, vol. 531, p. 173–177.
28. ROSSETTI, C. – POMATI, F. – CALAMARI, D. Microorganisms' activity and energy fluxes in Lake Varese (Italy): a field method. *Water Res.*, 2001, vol. 35, no. 5, p. 1318–1324.
29. RUCKER, VC. – HAVENSTRITE, KL. – HERR, AE. Antibody microarrays for native toxin detection. *Anal. Biochem.*, 2005, vol. 339, no. 2, p. 262–270.
30. SAFINA, GR., et al. Amperometric enzyme immunosensor for determination of *Klebsiella pneumoniae* antigen. *Biomed. Khim.*, 2005, vol. 51, no. 2, p. 212–219.
31. SKLÁDAL, P. – SYMERSKÁ, Y. – POHANKA, M. – ŠAFÁŘ, B. – MACELA, A. Electrochemical immunosensor for detection of *Francisella tularensis*. In MORRISON, D. (ed.). *Defense against bioterror: detection technologies, implementation strategies and commercial opportunities*. Springer, 2005, p. 221–232.
32. SPANGGAARD, B., et al. Growth of the fish-pathogenic fungus, *Ichthyophonus hoferi*, measured by conductimetry and microscopy. *J. Fish Dis.*, 1994, vol. 17, no. 2, p. 145–153.
33. THOMPSON, HG. – LEE, WE. Rapid immunofiltration assay of *Francisella tularensis*. *Suffield Memorandum*, 1992, vol. 1376, p. 1–17.
34. WONG, YY., et al. Immunosensor for the differentiation and detection of *Salmonella* species based on a quartz crystal microbalance. *Biosens. Bioelectron.*, 2002, vol. 17, p. 676–684.

Korespondence: Npor. RNDr. Miroslav Pohanka
Ústřední vojenský zdravotní ústav
Centrum biologické ochrany
561 66 Těchonín
e-mail: rau@atlas.cz

Do redakce došlo 7. 2. 2007