

Altın Nanopartikül İşaretli Biyosensör ile E.Coli'nin Hızlı Ve Duyarlı Tespiti

Rapid and Sensitive Detection of E. Coli By Gold Nanoparticle-Labeled Biosensor

Sümevra Savaş

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araőtırmalar Kurumu,
Biliőim ve Bilgi Güvenliği İleri Teknolojiler Araőtırma Merkezi, Kocaeli

Yazıőma Adresi / Correspondence:

Sümevra Savaş

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araőtırmalar Kurumu, Biliőim ve Bilgi Güvenliği İleri Teknolojiler Araőtırma Merkezi, Kocaeli
T: +90 262 648 23 89 E-mail: sumevra.savas@tubitak.gov.tr

Orcid:

Sümevra Savaş, <https://orcid.org/0000-0001-5057-9178>

Geliő Tarihi / Received : **02.07.2018** Kabul Tarihi / Accepted : **19.08.2018**

Savaş S., Altın Nanopartikül İşaretli Biyosensör İle E.Coli'nin Hızlı Ve Duyarlı Tespiti
J Biotechnol and Strategic Health Res. 2018;2(2):101-107.

ÖZET

E.coli su ve gıda mikrobiyolojisinde en sık karşılaşılan bakterilerden birisidir. Bu sebeple gıda ve suya bağlı olarak halk sağlığını korumak adına bakterilerin özellikle *E. coli*'nin hızlı tespiti için yeni yöntemlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Bu çalışmada (gerçek örnekten) sudan izole edilen *E.coli* örneğinin hızlı tespiti için nanoparçacık etiketli bir sensör prosedürü, Tubitak-BİLGEM, Biyoelektronik grubu tarafından geliştirilen elektrokimyasal sensör cihazı (Misens V2) ile tekrar revize edilmiş ve belirleyici limit 50 cfu/ml'den 38 cfu/ml'ye düşürülmüştür. ELISA sisteminde enzim substrat ikilisinin reaksiyonu sonrası ortaya çıkan renk değişimi optik olarak absorbans değeri ile ölçülmektedir. MiSens V2 cihazında ise enzim ile substrat ikilisinin reaksiyonu ile ortaya çıkan değer, elektronlann üzerinden gerçek zamanlı olarak, beklenmeden ölçülmesi ile sinyal olarak elde edilmektedir. Bu prosedürde, enzim konjuge edilmiş sekonder antikor yerine, enzim ve sekonder antikor ile modifiye edilmiş altın paçacıklar kullanılmıştır. *E. coli* örneği, *E. coli* antikorunu immobilize edilmiş sensör yüzeyine enjekte edilmiştir. Ardından enzim ve sekonder antikor ile modifiye edilmiş 40 nm çapındaki altın nanoparçacıklar sensör yüzeyine gönderilmiş ve sonrasında da substrat enjeksiyonu sırasında amperometrik sinyaller alınmıştır. Çalışmada, Biyosensör teknolojisi, yüksek hassasiyet ve özgülük ile bakterileri tespit edebilmektedir. Altın nanopartikül etiketli sensöre göre optimize edilen ve uygulanan proses, tamamen yerli üretim olan elektrokimyasal sensör cihazı ile denenmiştir. Konvensiyonel yöntemler ile iki ila dört gün arası süren tespit süresinin bir saatten az bir zamana indirilebilmesi umut vaat edicidir.

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli*, antijen, antikor, AuNP, elektrokimyasal sensör

Abstract

E.coli is one of the most common bacteria in water and food microbiology. For this reason, it is very important to develop new methods for rapid detection of *E.coli* in order to protect public health due to food and water. In this study, a nanoparticle-labelled sensor procedure for rapid detection of *E. coli* samples isolated from water (real sample) was revised again with the electrochemical sensor device (Misens V2) developed by TÜBİTAK-BİLGEM, Bioelectronics group and the limit of detection was decreased from 50 cfu / mL to 38 cfu / mL. Biosensor technology can detect bacteria with high sensitivity and specificity. The process optimized and applied to the gold nanoparticle labeled sensor has been tested with the electrochemical sensor device, which is a completely domestic production. It is promising to be able to reduce the detection period from two to four days with conventional methods to less than one hour.

Keywords: *Escherichia coli*, antigen, antibody, AuNP, electrochemical sensor

Giriş

Su insan yaşamının vazgeçilmez bir unsuru olması ile beraber sularda bakteri kaynaklı salgınlar dünya genelinde oldukça büyük bir problemdir. Dünya üzerinde her yıl yaklaşık 5 milyon bebeğin ölüm sebebinin sağlıksız içme suları olduğu belirtilmiştir.¹ İçme, kullanma ve yüzme sularının rutin mikrobiyolojik analizlerinde mikroorganizmaların özellikle de *E. coli*'nin varlığı bir indikatör olarak kullanılmaktadır. Su ve gıda mikrobiyolojisinde en sıklıkla çalışılan bakteriler *E. coli* ve Salmonella olup, enteritin çocuk ve yaşlılarda ki en önemli sebebinin de yine *E. coli* olduğu bildirilmiştir.² Patogenik olan bakterilerin hızlı tespiti, halk sağlığı, gıda ve su güvenliği beraberinde biyodezenfeksiyon için kritik öneme sahiptir.³ *E. coli* O157:H7 için özellikle son zamanlarda halk sağlığını tehlikeye sokan bir çok salgın bildirim olmuştur. Bu mikroorganizmanın tespiti geleneksel kültür yöntemi ile yaklaşık 2 ila 4 gün sürdüğü için hızlı tespit yöntemlerinin geliştirilmesi oldukça büyük önem taşımaktadır.^{4,5}

E. coli'nin tespitinde kullanılan çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bunlarda konvensiyonel yöntemler hala sıklıkla kullanılıyor olup, mikroskopi tanısı, biyokimyasal ve serolojik testleri içinde barındırır. Bununla birlikte son zamanlarda geliştirilen otomatik bakteriyel tespit cihazları (VITEK 2 System) sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak kullanılan bu geleneksel yöntemler birden fazla gün almasına rağmen genellikle makul sonuçların sağlanamaması, ayrıca uygulanan tekniğin zaman alıcı olması ve tespit edebildiği limitin yetersizliği sebebi ile son yıllarda moleküler teknikler kullanılmaya başlanmıştır.^{6,7} PCR metodu (polimeraz zincir reaksiyonu), özellikle de real-time (gerçek zamanlı) PCR yöntemi, hızlı, duyarlı ve özel bir teknik olmasına karşın, bu yöntemler nispeten karmaşık olup, pahalı cihazlara ve tecrübeli uzmanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Diğer bir risk, Taq DNA polimerazın PCR sürecinde biyolojik örnekte bulunabilecek inhibitörler tarafından aktivite kaybına uğrama ihtimalidir.^{8,9} Biyosensör teknolojisi, kullanımı, son derece hassas, hızlı ve kullanımı kolay biyoalgılama tekniği sunduğu için diğer teknikler karşısında güçlü bir alternatif yöntemdir. Günümüzde biyosensörler, bakterileri 1 cfu ml⁻¹'e kadar ölçebilmekte olup, patojen tespitinde kullanılmaya başlanmıştır. Bu özellikle, nanomalzemelerin biyosensör ve biyoalgılama prensipleri üzerindeki önemli etkisinden kaynaklanmaktadır. Mikrobiyal sensörlerin diğer bir artışı ise, mikrolitre aralığında hacimleri çok kısa süre de analiz edebiliyor olmasıdır.^{10,11} Elektrokimyasal biyosensörler, biyosensör platformu içerisinde patojenik bakterilerin tespitinde kullanılan en iyi örneklerden biridir.

Bu çalışmada, TÜBİTAK-BİLGEM Biyoelektronik grubu tarafından geliştirilen entegre yazılım Mi-Cont App tarafından kontrol edilen, bir elektromanyetik üniteden oluşan, tam otomatikleştirilmiş ve özel tasarlanmış elektrokimyasal sensör cihazı ile ve gerçek örnekten elde edilen *E. coli* bakterisinin tespiti ve en alt tespit sınırı belirlenmiştir. Çalışmada altın nanopartikül ile güçlendirilmiş sandwich assay protokolü geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Ölçüm sistemi horseradish peroksidaz (HRP) ve 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) arasındaki enzimatik reaksiyona dayanıyor olup, belirteç antikor HRP ile etiketlenmiştir. Geliştirilen antikor biyosensör ile eser miktarda *E. coli* örneği ölçülebilmektedir. Bu çalışmada tamamen yerli bir üretim olan Misens cihazının ikinci versiyonu olan elektrokimyasal sensör cihazı ile Altın modifiye nanopartikül kullanılarak *E. coli*'nin sıvıdan tespiti için geliştirilen prosesin4 yeni versiyon ile tekrar denemesi ve tanı limitinin düşürülmesi hedeflenmiştir.

2- Materyal-Metot

2.1. Materyal ve Reajanler

Polyclonal rabbit anti-*E. coli* antikor (BioRad) ticari olarak satın alındı. *E. coli* örneği Ankara Nu-



Journal of BSHR
2018;2(2):87-100

TASHTOUSH
Nano-Amplification Strategy Using
Charge-Based Capacitance Measurement
for Pathogenic Bacteria Detection

mune Hastanesi, mikrobiyoloji laboratuvarından tedarik edildi. Geçmiş zamanda izole edilen ve -80°C saklanan suş tekrar canlandırıldı. Fosfat tamponlu tuz tabletleri (PBS, 0.01 M fosfat tamponu, 0.137 M sodyum klorür ve 0.0027 M potasyumklorür, pH 7.4), merkaptoundekanoik asit (MUDA), merkaptoetanol, N-hidroksisüksinimit (NHS), etanolamin, analitik sınıf etanol, horseradish peroksidaz (HRP), 3,3, 5,5 -tetrametilbenzidin (TMB) Sigma Aldrich (Poole, İngiltere)'den satın alınmıştır. 1-Etil-3- (3-dimetilaminopropil) -karbodiimid (EDC) Thermo Scientific'den satın alındı. Altın nanopartiküller (40 nm) BBI International'dan (Cardiff, İngiltere) temin edildi. Potasyum klorür (KCl) Fisher Scientific'den (Loughborough, UK). Milli-Q sudan ultra saf su (18 M cm⁻¹) elde edildi. (Millipore Corp., Tokyo, Japonya).

2.2. Elektrokimyasal Ölçüm Yapan Biyosensör Cihazı

Çalışmada Tübitak-Bilgem' de tasarlanan ve imal edilen elektrokimyasal sensör ölçüm cihazı kullanılmıştır (Misens V2). Cihaz wireless tablet üzerinden çalışılan Micont App yazılımı tarafından kontrol ediliyor olup, sensör çip Tubitak-Bilgem, biyoelektronik grubu tarafından tasarlanmış, üretilmiş ve üretilmektedir. Au kaplı çip 8 çalışma elektrotu, karşı elektrot ve referans elektrottan oluşuyor olup, tek parametre aynı anda 8 elektrot tarafından aynı anda real-time sonuç verebilmektedir. Kullanılan çipin ve elektrotların kalitesini belirlemek üzere 1M KCL çözeltisinde 1mM potasyum ferrosiyanat çözeltisi hazırlanmış ve -0,5V ve -0,2 V arasında döngüsel voltmetri yapılarak sistemin doğruluğu ve elektrotların kalitesi test edilmiştir.

2.3. Sensör Çip Yüzeyinin Modifikasyonu ve Kullanıma Hazırlanması

Başarılı bir yüzey modifikasyonu ve temiz bir sensör yüzeyi elde edebilmek için plazma yöntemi uygulandı.⁴ Sensör çipler 2mM MUDA (%100) da 1 gece bekletildi. Elektrot dizileri kurutulmadan önce alkol ve %70 ethanol ile yıkandı, kurutuldu, vakumlu paketlenme yapıldı ve kullanana kadar +4°C'de saklandı. Sensör çip, ikinci versiyon olan elektrokimyasal sensör cihazı için özel tasarlanan kartuşa yerleştirildi ve kartuşun konnektör ve mikro akışkan sistem ile teması sağlanacak şekilde cihaza yerleştirildi. Döngüsel voltmetri ölçümleri sonrasında, sensör yüzeyi 1:1 0.4 M EDS and 0.1 M NHS ile aktive edildi, sonrasında yüzeye sodyumsülfat (pH: 4.5) içerisinde hazırlanmış 200 ul anti-*E.coli* antikor gönderildi. Bağlanamayan esterler PBS ile uzaklaştırıldı ve kalan kısımlar 30 µg/ml-1 BSA ile dolduruldu ve 1M ethanol amin (pH:4.5) ile reaksiyon durduruldu.

2.4. Nanomateryal destekli Sandwich Assay

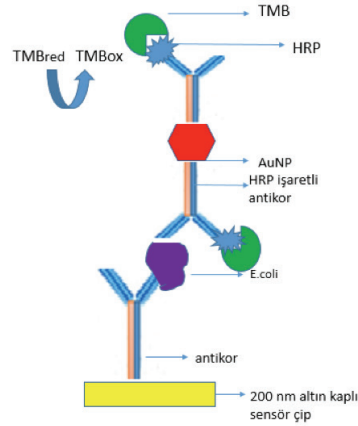
Çalışmada sensörün algı kapasitesini artırmak amacıyla enzim altın nanopartiküllere bağlandı. Bunun için 40 nm çapında 1000 ul AuNP (Altın nanopartikül) üzerine 5 ul (0,2 M) NaOH eklenerek karıştırıldı. 1.5 µl tespit için kullanılan antikor ile 2 µl HRP (1 µg/ml) AuNP üzerine eklendi ve 45 dakika 600 rpm'de karanlık ortamda karıştırıldıktan sonra 30 dakika 1000 rpm' de, +4 derecede santrifüjlendi. Santrifüj sonunda süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı ve pellet 40 µl BSA ve 60 µl PBS (10 mM) çözeltisi ile çözüldü.

Dilüsyon faktörüne göre altını seyreltebilmek için 525 nM dalga boyunda spektrofotometre de ölçümü yapıldı ve OD değeri dikkate alınarak, AuNP çözeltisi, hesaplanan dilüsyon faktörüne bağlı olarak seyreltildi.

Sensör çip üzerinde *E. coli* spesifik poliklonal antikorlar farklı bölgelere bağlandıktan sonra, hedef örnek (*E.coli*) konsantrasyon ölçümü ve buna bağlı olarak gerekli dilüsyonlar yapıldıktan sonra yü-

zeye gönderildi. Arkasından uygun konsantrasyondaki AuNP ile birlikte HRP etiketli tespit antikor ve HRP enzimine özel TMB süstratı yüzeye gönderilerek amperometrik ölçüm gerçek zamanlı olarak izlenerek, tespit edildi.

Kirli sudan enfekte olan hastadan izole edilen ve -80'de saklanan *E. coli* örneği Ankara Numune Hastane'sinden temin edilmiştir. Kültürde canlandırılan *E. coli* örneği PBS ile sulandırılarak istenilen konsantrasyon elde edilmiştir. İlk konsantrasyonu $1,52 \cdot 10^{-7}$ cfu/ml olarak hazırlanan gerçek *E. coli* örnekleri 0,99 konsantrasyon aralığında dilüe edildi. Tek bir konsantrasyon, 8 dakika 50 ul/min akış hızı ile mikroakışkan sistemden antikor immobilize edilmiş yüzeye gönderildi. Ardından HRP ile etiketli olan tespit antikor 8 dakika 50 ul/min akış hızı ile sensör çip yüzeyine gönderildi. -0.1 V'da 8 dakika, 50 ul/min akış hızı ile TMB reaktifi yüzeye gönderilmeye başladığı andan itibaren, elektrotlardaki ölçüm gerçek zamanlı olarak izlenmeye başladı. Diğer konsantrasyonların aynı immobilize yüzey üzerinde denenebilmesi için 0,5 M HCL ile rejenerasyon yapıldı. Yüzeye gönderilen örnek ve reagenlerin arkasından 120ul/min akış hızı ile 4 dakika PBS (10 mM) ile çip yüzeyi kahlınlardan arındırıldı.⁴ Şekil 1'de *E.coli*'nin tespitinde kullanılan assay şematik olarak gösterilmiştir.



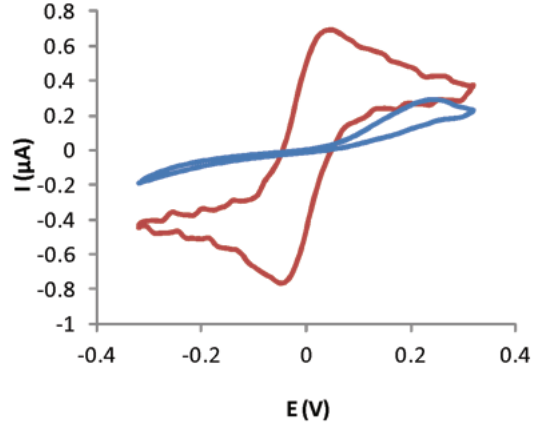
Şekil 1: AuNP kullanılarak gerçekleştirilen *E. Coli*'nin tespitinde kullanılan assay prosedür şeması.

3. Bulgular

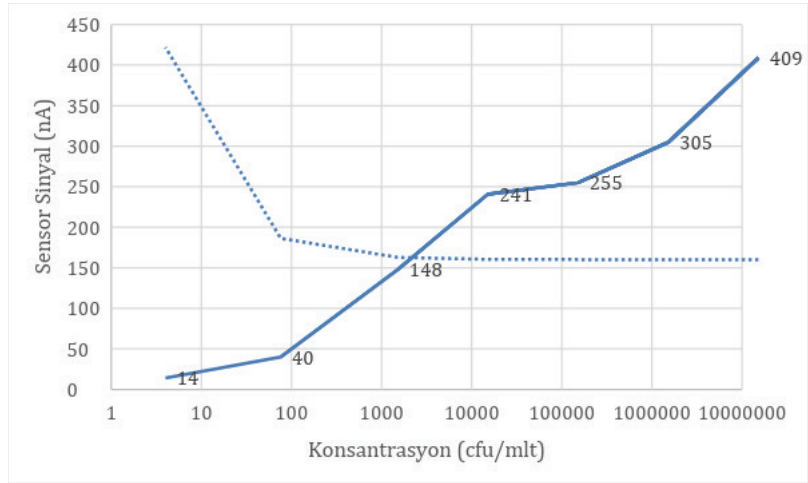
Bu çalışmada gerçek örnekten izole edilen *E.coli* örneğinin elektrokimyasal sensör cihazı ve ona entegre Micont App programı ise ölçülebildiği en az limitin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla $1,52 \cdot 10^{-7}$ cfu/mlt ilk konsantrasyonu olan *E.coli* örneği, dilüe edilerek, $1,52 \cdot 10^{-7}$, $1,52 \cdot 10^{-4}$; $1,52 \cdot 10^{-2}$; $7,6 \cdot 10^{-1}$; $3,8 \cdot 10^{-1}$ konsantrasyonlarında ölçüm alınmış ve en alt belirleyici sınırın 38 cfu/mlt olduğu tespit edilmiştir. Daha alt konsantrasyonlar da amperometrik ölçümde nA düzeyinde sinyal seviyesinde tespit sınırını değiştirecek bir fark gözlenmemiştir. nA düzeyinde izlenen en yüksek seviyenin 400, en alt seviyenin 14 nm olduğu belirlenmiştir.

Yapılan döngüsel voltmetrik ölçümlerde yüzey kaplamanın ve çiplerin kalitesi test edilmiş olup, Şekil 2'de gösterilmiştir. Sonuç olarak, farklı konsantrasyonlarda örnek ölçümü yapılmış elektrotların ortalaması alınarak konsantrasyon eğrisi çizilmiş ve Şekil 3'de gösterilmiştir. Benzer şekilde tek bir elektrotun farklı konsantrasyonlar da gösterdiği amperometrik ölçüm grafiği sensogram olarak Şekil 4'de verilmiştir.



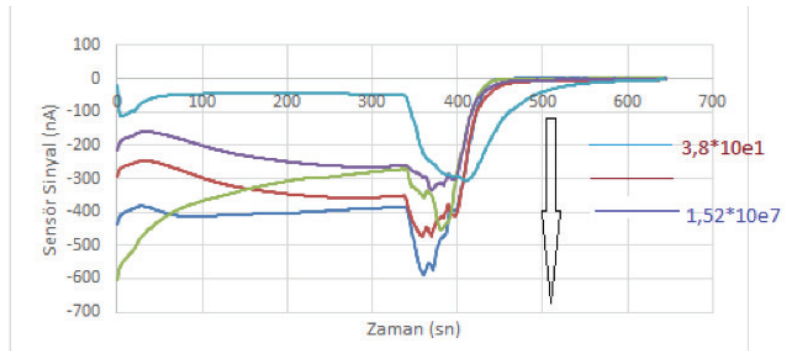


Şekil 2: Döngüsel voltametri metodu ile sensör elektrotları yüzey kimyası kalite kontrolü.
Kırmızı: yüzey kaplaması uygulanmamış elektrot; Mavi: yüzey kimyası uygulanmış elektrot



Şekil 3: Deney sonucu, logaritmik regresyon analizi

Yukarıdaki sensogramda da görüldüğü üzere, $1,52 \cdot 10^7$ cfu/ml konsantrasyonda E.coli barındıran numune'de 409 nA sensör sinyal, $1,52 \cdot 10^6$ cfu/ml konsantrasyonda 305 nA, $1,52 \cdot 10^4$ cfu/ml konsantrasyonda 255 nA, $1,52 \cdot 10^3$ cfu/ml konsantrasyonda 241 nA, $1,52 \cdot 10^2$ cfu/ml konsantrasyonda 148 nA, $7,6 \cdot 10^1$ cfu/ml konsantrasyonda 40 nA ve $3,8 \cdot 10^1$ konsantrasyonda 14 nA sensör sinyal gözlenmiş ve altın nanopartikül kullanılarak güçlendirilen çalışmada gerçek örnekten izole edilen *E. coli* örneği için en alt belirleme düzeyi 38 cfu/ml olarak saptanmıştır.



Şekil 4: Belirli bir elektrot üzerinde, AuNP fonksiyonelleştirilmiş *E.coli* konsantrasyona bağlı gerçek

zamanlı sensorgram.

Yukarıda ki şekilde 4. Elektrotun konsantrasyona bağlı olarak azalış ve artışı gösterilmiş olup, amperometrik ölçüm değerleri 50-300 saniye aralığındaki değerler olarak alınmıştır.

Tartışma

Biyosensörler, biyolojik olayın, elektriksel sinyal olarak ifade edildiği, analitin alınması ve sonuçların elde edilmesi arasında geçen süreyi oldukça kısaltmaktadır.

Bu çalışmada TÜBİTAK-BİLGEM, Biyoelektronik grubu tarafından geliştirilen ve üretilen elektrokimyasal sensör cihazında sudan enfekte olduğu bilinen, -80'de saklamaya alınmış gerçek örnekten izole bir *E. coli* örneği çalışılmış ve en düşük belirleyici limit saptanmıştır. Cihazın birinci versiyonu olan Misens cihazında ticari olarak (BIORAD) satın alınan bir *E.coli* örneği daha önce çalışılmış olup⁴, bu çalışmada cihazın ikinci versiyonu (V2) ile *E.coli*'nin belirleyici alt limiti tekrar çalışılmıştır. Daha önce ticari olarak satın alınan *E.coli*'nin Misens-1 cihazı ile çalışılması sonucunda, 50 cfu/mlt olarak belirlenen alt limit, gerçek örnekten izole edilen *E.coli*'nin 2 versiyon elektrokimyasal sensör cihazı ile çalışılması sonucu 38 cfu/mlt'ye düşürülmüştür. Altıntaş ve ark., (2018) yaptıkları çalışmada 50 cfu/mlt *E.coli*'yi 16,98 nA sinyalde ölçmüşlerdir.⁴ Bizim çalışmamızda aynı cihazın 2. Versiyonunda bu değer 14 nA de 38 cfu/mlt *E.coli*'nin tespiti olarak azaltılmıştır. Yaptığımız çalışmada immobilize olmuş bir sensör çipten enzimatik olarak ölçümün alınma süresi ortalama 8 dakika sürmekte olup (Şekil 4), Varshney ve arkadaşları yaptıkları sensör çalışmasında gıda örneğinden izole ettikleri *E.coli* için belirleyici en düşük tanı limitini, enzimatik bir reaksiyon kullanmadan 35 dakikada $1,6 \cdot 10^2$ olarak belirlemişlerdir.¹² Ma ve arkadaşlarına ise, multiplex real-time PCR assay ile gıda örneklerinden *E.coli*'nin tespitini 8 saat de gerçekleştirmiş ve en alt limiti 10^{-10} olarak saptamışlardır.¹³ Zhao ve arkadaşları *E.coli* tespiti için DNA temelli bir elektrokimyasal sensör geliştirmişler ve belirleyici limiti 50 cfu/mlt olarak saptamışlardır ve tıp dünyası için kullanıma sunulan güçlü bir yöntem olduğunu ileri sürmüşlerdir¹⁴. Li ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, *E. coli* için birkaç saat süren bir deney süreci geliştirmiş ve tanı limitini 103 cfu/ml olarak belirlemişlerdir.¹⁵ AuNP-amplifiye edilmiş sandviç analizleri kullanılarak benzer testler kuvars kristal mikrobalsı (QCM) ve yüzey plazmon rezonansı (SPR) tekniği diğer bakterilerin tespiti için kullanılmıştır ancak, bu sensörlerin duyarlılığı düşük olup, SPR tekniği için penetrasyon da ayrıca problem teşkil etmektedir.^{4,16}

Yapılan çalışmalarda dikkate alındığında *E.coli*'nin tespitinde nanopartikül kullanarak tanı limiti bir miktar daha aşağı çekilebilmiştir. Bundan sonraki çalışmalar da, enzim-substrat ilişkisine bağlı reaksiyonlar kullanılmaksızın, farklı nanopartiküller kullanılarak, label-free sensörler geliştirilerek tanı süresinin kısaltılması hedeflenmektedir.

Teşekkür

Bu çalışmada kullanılan gerçek örnekten'dan izole edilen *E.coli* örneğini temin eden Dr. Gülşen Hazırolan'a, prosesi uygulamama imkan sağlayan ve bu sonuca ulaşmam için cihazın ikinci versiyonunda çalışan TÜBİTAK-BİLGEM, Biyoelektronik grubundaki herkese teşekkürlerimi sunarım.



Journal of BSHR
2018;2(2):101-107

SAVAŞ
Altın Nanopartikül İşaretli Biyosensör ile
E.Coli'nin Hızlı ve Duyarlı Tespiti

1. Anderson JM, Baird-Parker AC. A rapid and direct plate method for enumerating *Escherichia coli* biotype i in food. *J Appl Bact* 1975; 39: 111-117. (English)
2. Ekici K, Korkoca H, Sancak YC, Atalan E. Van Yöresi İçme Sularında Koliiform ve *E. Coli* Araştırması. *Uludag Univ J Fac Vet Med* 2010; 29: 2: 21-25. (Türkçe)
3. Wang Y, Alocilja EC. Gold nanoparticle-labeled biosensor for rapid and sensitive detection of bacterial pathogens. *J Biol Eng* 2015; 2:9-16. (English)
4. Altıntaş Z, Akgun M, Kocurk G, Uludag Y. A fully automated microfluidic-based electrochemical sensor for real-time bacteria detection. *Biosensor and Bioelectronics* 2018; 100:541-548.(English)
5. Tüylek, Z. Biyosensör and Nanoteknolojik Etkileşim.BEU Journal of Science 2017; 6(2); 71-80. (Türkçe)
6. Hay A, Macdonald E, Evans R, Davidson M. Use of VITEK for surveillance of antibiotic resistance in *Escherichia coli* in the Scottish Highlands: results over 15 years. *J Infection* 2007; 55,e87–e88.doi:10.1016/j.jinf.2007.04.132. (English)
7. Derong D, Liu W, Li H, Wang Y, Li X, Zou D, Yang Z, Huang S, Zhou D, Huang L, Yuan J. Survey and rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* in clinical samples targeting the *rcaA* gene in Beijing, China. *Front. Microbiol* 2015; 6:519. (English)
8. deFranchis R, Cross NC, Foulkes NS, Cox TM. Apotent inhibitor of Taq polymerase copurifies with human genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 1988; 16. 10355.doi:10.1093/nar/16.21.10355. (English)
9. Chen L, Mediavilla JR, Endimiani A, Rosenthal ME, Zhao Y, Bonomo RA. Multiplex real-time PCR assay for detection and classification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene (*bla* KPC) variants *J Clin Microbiol* 2011; 49; 479-585. (English)
10. Malhotra R, Patel V, Chikkaveeraiah BV, Munge BS, Cheong SC, Zain RB, Abraham MT, Dey DK, Gutkind JS, Rusling JF. Ultrasensitive Detection of Cancer Biomarkers in the Clinic by Use of a Nanostructured Microfluidic Array, *Analytical Chemistry* 2012; 84: 6249-6255. (English)
11. Afonso AS, Uliana CV, Martucci DH, Faria RC. Simple and rapid fabrication of disposable carbon-based electrochemical cells using an electronic craft cutter for sensor and biosensor applications. *Talanta* 2016; 146: 381-387. (English)
12. Varshney M, Li YB. Srinivasan B, Tung S. *Sens. Actuators B Chem* 2007; 128 (1): 99–107. (English)
13. Ma K, Deng Y, Bai Y, Xu D, Chen E, Wu H, Li B, Gao L. *Food Control* 2014; 42: 87–93. (English)
14. Zhao YW, Wang HX, ST Bie, Shao Q, Wang CH, Li Z. Application of DNA based electrochemical biosensor in rapid detection of *Escherichia coli* exist in licorice decoction. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2018; 43; 1209-1214. (English-abstract)
15. Li Y., Mn S, Li J, Chai H, Fan W, Liu Z, Gao W. The antitumor effect of formosanin C on HepG2 cell as revealed by ¹H-NMR based metabolic profiling. *Chemico-Biological Interaction* 2014; 220; 193-199. (English)
16. Masdor NA, Altıntaş Z, Tothill IE. Sensitive detection of *Campylobacter jejuni* using nanoparticles enhanced QCM sensor. *Biosensor and Bioelectronics* 2016; 78; 328-336. (English)