

# Elektrokemijsko ponašanje i analitička primjena modificiranih elektroda

---

**Mustapić, Olga**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:466455>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-26**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO–TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE I ANALITIČKA PRIMJENA**  
**MODIFICIRANIH ELEKTRODA**  
**Biosenzori za detekciju virusa**

**ZAVRŠNI RAD**

**OLGA MUSTAPIĆ**  
**Matični broj: 1168**

**Split, rujan 2021.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE**  
**KEMIJSKO INŽENJERSTVO**

**ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE I ANALITIČKA PRIMJENA**  
**MODIFICIRANIH ELEKTRODA**  
**Biosenzori za detekciju virusa**

**ZAVRŠNI RAD**

**OLGA MUSTAPIĆ**  
**Matični broj: 1168**

**Split, rujan 2021.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY:**  
**CHEMICAL ENGINEERING**

**ELECTROCHEMICAL BEHAVIOUR AND ANALYTICAL**  
**APPLICATION OF MODIFIED ELECTRODES**

**Biosensors for virus detections**

**BACHELOR THESIS**

**OLGA MUSTAPIĆ**

**Parent number: 1168**

**Split, September 2021**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko – tehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Kemijske tehnologije, smjer: Kemijsko inženjerstvo

**Znanstveno područje:** prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** kemija

**Tema rada** je prihvaćena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko–tehnološkog fakulteta

**Mentor:** doc. dr. sc. Nives Vladislavić

### ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE I ANALITIČKA PRIMJENA MODIFICIRANIH ELEKTRODA

**Biosenzori za detekciju virusa**

Olga Mustapić, 0011167090

**Sažetak:** Trend pronalaska brzih tehnika probira i kvantifikacije virusa je u fokusu današnjih istraživanja, jer zahtjevi tržišta diktiraju ubrzanu dijagnostiku. Pronalazak metode kvantifikacije virusa bez opsežne pripreme uzoraka trenutno u svijetu predstavlja globalni problem, ali s druge strane otvara i mogućnost velike zarade farmaceutskim i drugim kompanijama. U ovom radu opisane su komercijalne i elektrokemijske metode u dijagnostici virusa, njihove prednosti i mane, te važnost primjene. U fokusu rada su modificirane elektrode za detekciju virusa koji najčešće pogađaju čovječanstvo, kako i kada se primjenjuju i zašto ih je važno razvijati, te njihove prednosti nad komercijalnim metodama određivanja virusa. Posebno su istraženi biosenzori za detekciju SARS-COVID-19, virusa koji je snažno pogodio čovječanstvo i njihova primjena u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi primjenom elektrokemijskih metoda.

**Ključne riječi:** elektrokemijske metode, modificirane elektrode, pametna senzorska dijagnostika, biosenzori

**Rad sadrži:** 48 stranica, 20 slika, 1 tablicu, 1 shemu, 40 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za obranu:** 1. doc. dr. sc. Ivana Škugor Rončević –predsjednica  
2. doc. dr. sc. Boris-Marko Kukovec-člak  
3. doc. dr. sc. Nives Vladislavić –član-mentor

**Datum obrane:**

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko – tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

**University of Split**  
**Faculty of chemistry and technology Split**  
**Undergraduate study of chemical technology, field: Chemical engineering**

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Thesis subject** was approved by 28<sup>th</sup> Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology

**Mentor:** Assistant Prof. Nives Vladislavić

### **ELECTROCHEMICAL BEHAVIOUR AND ANALYTICAL APPLICATION OF MODIFIED ELECTRODES**

#### **Biosensors for virus detections**

Olga Mustapić, 0011167090

**Abstract:** The trend of finding rapid virus screenings and quantifications techniques is the focus of today's researches because the market demands rapid diagnostics. Finding a method of virus quantification without extensive sample preparation is currently a global problem, but it also opens up the possibility of large profits for pharmaceutical and other companies. This paper describes commercial and electrochemical methods in virus diagnosis, their advantages and disadvantages, and the importance of their application. The focus of the paper are modified electrodes for the detection of viruses that most commonly affect humanity, how and when are they applied, why it's important to develop them, and their advantages over commercial methods of virus detection. In particular, biosensors for the detection of SARS-COVID-19, a virus that has strongly affected humanity, and their application in qualitative and quantitative analysis using electrochemical methods have been described.

**Keywords:** electrochemical methods, modified electrodes, biosensors, sensors smart diagnostic

**Thesis contains:** 48 pages, 20 figures, 1 table, 1 scheme, 40 literature references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:** 1. Assistant Professor Ivana Škugor Rončević– chair person  
2. Assistant Professor Boris-Marko Kukovec -member  
3. Assistant Professor Nives Vladislavić PhD– advisor

**Defence date:**

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35

*Završni rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Nives Vladislavić u razdoblju od siječnja do ožujka 2021. godine.*



***Zahvala***

*Zahvaljujem se doc. dr. sc. Nives Vladislavić na mentorstvu i savjetima pri izradi završnog rada.*

## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

1. Pregledom suvremene literature utvrditi mogućnosti primjene elektrokemijskih metoda u detekciji virusa.
2. Predstaviti prednosti elektrokemijskih metoda u odnosu na druge sofisticirane metode u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi virusa.
3. „*Sensing smart diagnostics*“ - Objasniti princip pametne dijagnostike u današnje doba na primjeru biosenzora za SARS- COVID-19.

## **SAŽETAK**

Trend pronalaska brzih tehnika probira i kvantifikacije virusa je u fokusu današnjih istraživanja, jer zahtjevi tržišta diktiraju ubranu dijagnostiku. Pronalazak metode kvantifikacije virusa bez opsežne pripreme uzoraka trenutno u svijetu predstavlja globalni problem, ali s druge strane otvara i mogućnost velike zarade farmaceutskim i drugim kompanijama. U ovom radu opisane su komercijalne i elektrokemijske metode u dijagnostici virusa, njihove prednosti i mane, te važnost primjene. U fokusu rada su modificirane elektrode za detekciju virusa koji najčešće pogađaju čovječanstvo, kako i kada se primjenjuju i zašto ih je važno razvijati, te njihove prednosti nad komercijalnim metodama određivanja virusa. Posebno su istraženi biosenzori za detekciju SARS-COVID-19, virusa koji je snažno pogodio čovječanstvo i njihova primjena u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi primjenom elektrokemijskih metoda.

**Ključne riječi:** elektrokemijske metode, modificirane elektrode, pametna senzorska dijagnostika, biosenzori

## **SUMMARY**

The trend of finding rapid virus screenings and quantifications techniques is the focus of today's researches because the market demands rapid diagnostics. Finding a method of virus quantification without extensive sample preparation is currently a global problem, but it also opens up the possibility of large profits for pharmaceutical and other companies. This paper describes commercial and electrochemical methods in virus diagnosis, their advantages and disadvantages, and the importance of their application. The focus of the paper are modified electrodes for the detection of viruses that most commonly affect humanity, how and when are they applied, why it's important to develop them, and their advantages over commercial methods of virus detection. In particular, biosensors for the detection of SARS-COVID-19, a virus that has strongly affected humanity, and their application in qualitative and quantitative analysis using electrochemical methods have been described.

**Keywords:** electrochemical methods, modified electrodes, biosensors, sensors smart diagnostic

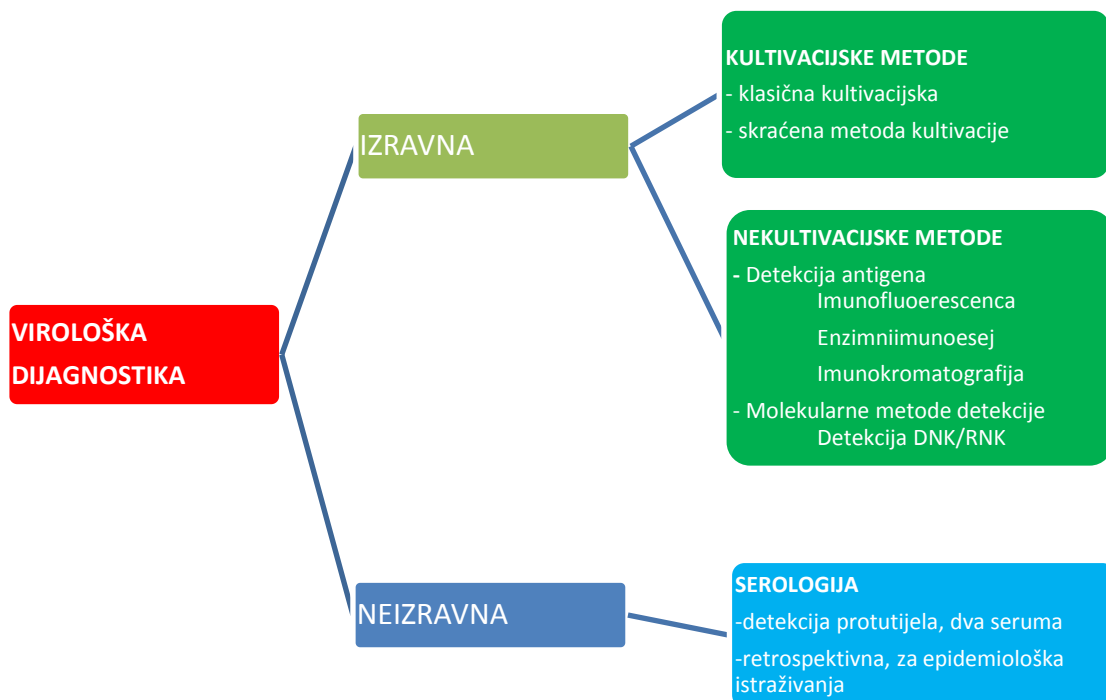
# SADRŽAJ

UVOD.....	1
SADRŽAJ.....	12
1. OPĆI DIO.....	3
1.1 Virusi i važnost brze dijagnostike.....	3
1.2 Komercijalne metode u dijagnostici virusa.....	5
<b>1.2.1. Mjerenje virusnih proteina i nukleinske kiseline.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.2. Izravno mjerenje čestica virusa.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.3. Metode identifikacije virusa.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.4. Mjerenje virusne infektivnosti.....</b>	<b>9</b>
1.3. Elektrokemijske metode u dijagnostici virusa.....	10
1.4. Modificirane elektrode i biosenzori.....	11
<b>1.4.1. Kemijski modificirane elektrode.....</b>	<b>12</b>
<b>1.4.2. Biosenzori.....</b>	<b>13</b>
2. BIOSENZORI ZA DETEKCIJU VIRUSA - PRIMJENA ELEKTROKEMIJSKIH METODA U BRZOJ DIJAGNOSTICI.....	19
2.1 Primjeri modifikacije elektroda.....	22
2.1.1 Primjer određivanja virusa hepatitisa B.....	22
2.1.2 Primjer određivanja virusa gripe.....	23
2.1.3 Primjer određivanja virusa HIV-a.....	23
2.1.4 Primjer određivanja Zika virusa.....	23
2.1.5 Primjer određivanja virusa Tristeze kod citrusa.....	24
2.1.6 Primjer određivanja biomolekularnog virusa gripe.....	25
2.1.7 Primjer određivanja virusa ptičije gripe.....	26
2.1.8 Primjer određivanja Humanog enterovirusa.....	27
2.1.9 Primjer određivanja agrovirusa.....	27
2.1.10 Primjer određivanja virusa hepatitisa C.....	28
2.1.11 Primjer određivanja virusa HPV.....	29
2.1.12 Primjer određivanja virusa sindroma bijele mrlje.....	29
2.1.13 Primjer određivanja virusa sindroma denge.....	31
2.1.14 Primjer određivanja virusa japanskog encefalitisa.....	32
2.1.15 Primjer određivanja rotavirusa.....	33
2.1.16 Primjer određivanja virusa leukemije kod ptica.....	33
2.1.17 Primjer određivanja virusa boginja šljive.....	34
1.2 Biosenzor za SARS-COVID-19.....	35
3. ZAKLJUČAK.....	44
4. LITERATURA.....	46

## UVOD

Virusi su metabolički neaktivne i zarazne čestice na granici nežive prirode i živog svijeta. Virusi posjeduju neka obilježja živih bića – umnožavanje, nasljeđivanje, razvijanje i prilagođavanje. Izvan domaćina virusi se mogu kristalizirati, što je obilježje nežive prirode. Veličine su od 0,02 do 0,3  $\mu\text{m}$ . Kako bi se razmnožavali, oni su u potpunosti ovisni o stanici (bakterijskoj, biljnoj ili životinjskoj). Virusi imaju vanjski bjelančevinski, a ponekad lipidni omotač te RNK ili DNK. Sam proces infekcije, gdje se virus pričvršćuje za stanicu domaćina, odvaja od vanjskog omotača i replicira unutar stanice odvija se vrlo brzo. Iz tog razloga rana detekcija virusa u organizmu je od nužne važnosti za sprječavanje pojave teških simptoma uzrokovanih virusom i širenja infekcije do razmjera pandemije jer virusi predstavljaju ozbiljnu prijetnju javnom zdravlju i svjetskom gospodarstvu. Često ih je teško otkriti, a njihove infekcije teško je liječiti. [1].

Budući da je ključno razviti brze, točne, isplative i *in-situ* metode za rano otkrivanje virusa, do sada su otkriveni razni senzori. Potreba za brzim, pouzdanim i ekonomski učinkovitim metodama otkrivanja virusa predmet je intenzivnog istraživanja u posljednjem desetljeću. [2].



Shema 1. [2].

Virološka dijagnostika se općenito može podijeliti na IZRAVNU I NEIZRAVNU. Kod izravnih metoda virusi se kultiviraju najčešće klasičnim metodama, što je dugotrajan i zahtjevan postupak. Potreba za zamjenom konvencionalnog uzgoja virusa u staničnim kulturama svakako je neophodna i nove su metodologije razvijene i kontinuirano se unaprjeđuju. Komercijalne metode danas se najčešće koriste za detekciju virusa. To su lančana reakcija polimeraze, ELISA metoda, *immunoblotting*, imunoprecipitacija, analiza hemaglutinacije, protočna citometrija, prijenosna elektronska mikroskopija, mikroskopija u staničnoj kulturi, imunofluorescentni test, analiza virusnih plakova, kvantitativna analiza TCID50, LD50, EID50, te analiza žarišta imunofluorescencije. [2].

Međutim, u posljednje vrijeme pojavila se nova generacija senzora koja uključuje nanočestice kao dio senzora, uglavnom, ali ne isključivo kao element prepoznavanja. Elektrokemijske metode detekcije virusa se danas sve više razvijaju. Biosenzori su učinkoviti u probiru i kvantifikaciji virusa, te se kliničke razine patogena mogu lako analizirati pomoću njih. [3].

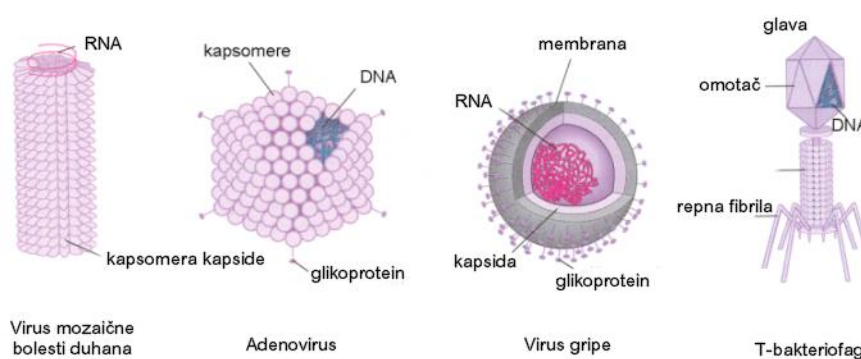
Elektrokemijske metode u dijagnostici virusa su voltametrijske metode, ciklička voltometrija, diferencijalna impulsna voltometrija, pravokutnovalna voltometrija (*square wave*), potenciometrijska metoda i amperometrijska metoda. Ove metode imaju brojne prednosti i mogu se koristiti za detekciju raznih virusa koji najčešće pogađaju žive organizme. Radna elektroda se specifično modificira za određivanje pojedinih virusa, te se virus može otkriti s određenom razinom detekcije i osjetljivosti. [4,5].

Brzo i rano otkrivanje trebalo bi biti jedan od najboljih načina sprječavanja epidemija i jedan od zahtijeva razvoja biosenzora koji bi u idealnom slučaju proizveo kvantitativni signal za pojedine virusne čestice. Ove metode bi bile korisne u kliničkoj dijagnostici virusa, jer bi se virus mogao odrediti u malim uzorcima, te su uređaji za provedbu određivanja miniaturizirani što olakšava detekciju. Nedavni napredak u elektrokemijskim istraživanjima pokazuje da su biosenzori vrlo jednostavni, precizni i jeftini u otkrivanju virusa, stoga istraživači pronalaze velik interes u ovom polju. Biosenzor može se koristiti i za detekciju virusa SARS-COVID-19.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1 Virusi i važnost brze dijagnostike

Virusi se mogu smatrati jednostavnim strukturama koje imaju genetske informacije (genom) i mogu se replicirati preko domaćina. Metabolički su neaktivne i zarazne čestice. Nemaju stanične dijelove nego potpuno ovise o mehanizmu stvaranja energije i bjelančevina stanica domaćina. Izvan stanica su inertne molekule koje postoje kao proteinski omotač ili kapsid, ponekad zatvoren unutar membrane. Čestica virusa sastoji se od nukleokapsida koju tvori nukleinska kiselina (DNK ili RNK) koja sadrži nasljedne upute potrebne za umnožavanje virusa pa tvori virusni genom. Značajna je za infektivnost virusa. Sastoji se i od kapsida, ljuske koja obavija nukleinsku kiselinu od djelovanja enzima stanice. Građena je od kapsomera i nositelj je virusnih antigena. Neki su virusi obavijeni lipidskom ovojnicom koja potječe od stanice u kojoj se umnožavaju. Iz nje strše glikoproteinski izdanci kojima se virus prihvaća na stanicu primatelja (slika 1). [1].



*Slika 1. Građa virusa [1]*

Virus se replicira u stanici domaćina. Kad ne može pronaći stanicu domaćina, transformira se u kristale u kojima može dugo preživjeti u stanju mirovanja. Umnožavanje (replikacija) virusa je enzimski proces prepisivanja vlastitog genoma kojeg čini jedna od nukleinskih kiselina. Ono se razlikuje od razmnožavanja ostalih mikroorganizama, jer se odvija samo u živoj i primjenjivoj stanici. Za vrijeme umnožavanja virusa nastaju promjene na površini i u unutrašnjosti inficirane stanice. Ciklus umnožavanja virusa sastoji se od pričvršćivanja virusa na površinu stanice s odgovarajućim receptorima (adsorpcija), prodiranja virusa kroz staničnu membranu u stanicu (penetracija), razgradnje kapside i aktivacije nukleinske kiseline, iskorištavanja stanične sinteze bjelančevina i nukleinske kiseline za prijenos svoje nasljedne upute (biosinteze), stvaranja nukleokapside (sastavljanja viriona) i izlaska iz inficirane stanice



(lizom ili pupanjem). Virusi se repliciraju koristeći metabolizam stanice domaćina i mogu mutirati tijekom kopiranja. Mutacija uzrokuje povećanje genetske raznolikosti. Tako se virusi mogu lako prilagoditi različitim uvjetima okoline.

Kao što je ranije spomenuto, virus koristi stanice domaćina za stvaranje virusnih proteina i novih virusnih čestica; te su nove čestice nazvane virionima, koji napuštaju stanice domaćina i mogu zaraziti druge stanice. Bakteriofag je vrsta virusa koja inficira bakterije. Antibiotici ne djeluju na viruse, jer nemaju enzimske sustave. [1] Postoji mnogo porodica virusa koje su povezane s različitim ljudskim bolestima, na primjer, Herpesviridae, Parvoviridae i Adenoviridae koji su DNA virusi i Retroviridae, Astroviridae i Rhabdoviridae koji su RNA virusi. Virusi mogu zaraziti sve vrste životnih formi. Virusne infekcije mogu biti uzrok akutnih bolesti koje ne zahtijeva hospitalizaciju u razvijenim zemljama, a s druge strane mogu uzrokovati smrtnosti i trajni invaliditet među zemljama u razvoju, posebno među dojenčadi i djecom. Na primjer, virus varicella-zoster, koji je član porodice virusa Herpesviridae uzrokuje bolesti vodenih kozica kod djece i herpes zoster u odraslih. Virusne infekcije mogu se izravno prenositi među populacijom, ali i putem kontaminirane vode konzumacijom hrane i drugim načinima neizravnog kontakta. Virusni gastroenteritis, koji se smatra uzrokom smrti gotovo milijun djece mlađe od 5 godina starosti vrlo je česta infekcija koja se prenosi hranom. S druge strane, prijenos hepatitisa B moguć je samo u kontaktu s tjelesnim tekućinama zaražene osobe. Virusi ne zaražavaju samo ljude nego i biljke i životinje. Virus citrusisteza koji je član obitelji closteroviridae zaražava pojedine vrste citrusa i može uzrokovati ozbiljne bolesti na drveću koje rezultiraju gubitkom voća i smrću stabala agruma. Virus bjesnoće iz porodice rhabdoviridae uzročnik je bjesnoće koja je zoonoza (bolest koja se može prenijeti iz životinje na ljude). Svjetska zdravstvena organizacija (WHO - *World Health Organization*) smatra upravo prijenos virusa i patogena s životinje na čovjeka ozbiljnim rizikom za zdravlje ljudi i životinja. Neki podaci pokazuju da se širok spektar već utvrđenih virusnih bolesti može proširiti i uzrokovati dugoročne posljedice ili niz drugih ozbiljnih ljudskih bolesti, poput maloljetničkog dijabetesa, reumatoidnog artritisa, raznih neuroloških i imunoloških poremećaja i nekih tumora. [6].

Kod virološke dijagnostike, bilo izravne (kultivacijska i nekultivacijska), ili neizravne (serologijom), važno je uzeti uzorak za dijagnostiku tijekom prvih dana bolesti. Ako usporedimo uzorak uzet tijekom prvih šest dana bolesti i uzorak uzet sedmog dana, učestalost dijagnoze virusa opada za 50%.

## 1.2 Komercijalne metode u dijagnostici virusa

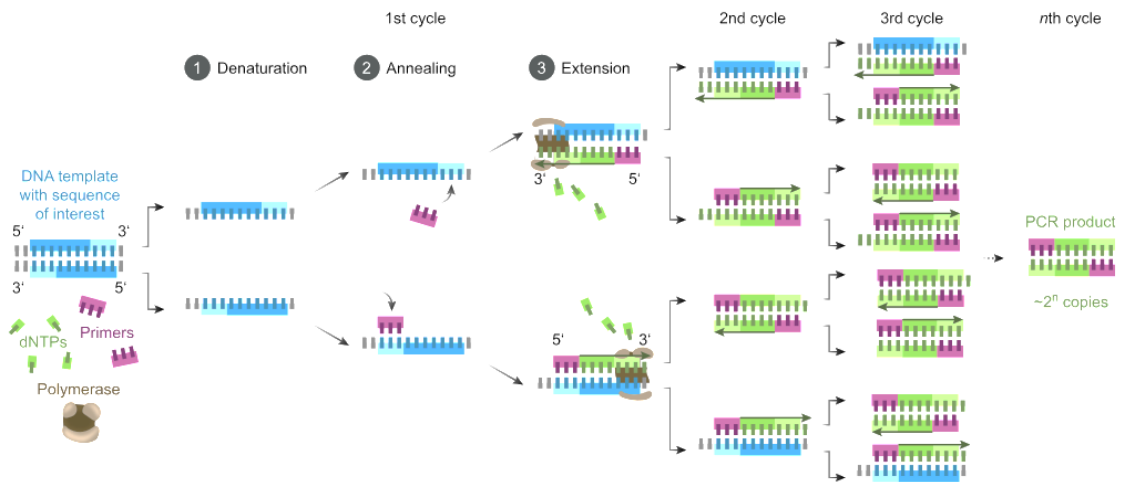
Razvijene su mnoge tehnike za identifikaciju virusnih uzoraka. Najčešće korištene konvencionalne i komercijalne metode za otkrivanje virusa su dugotrajne, skupe, često ne daju ponovljive rezultate i zahtijevaju posebne ustanove, skupu i tehnički zahtjevnu instrumentaciju i obučeno osoblje. Jednostavna instrumentacija metode te brzo i jeftino otkrivanje virusa metodom od velikog je interesa, jer se tako može brzo prepoznati prijetnju koju virus izaziva i spriječiti širenje. Najčešće korištene metode za detekciju virusa mogu se podijeliti u sljedeće kategorije, navedene u poglavlju 1.2.1.

### 1.2.1. Mjerenje virusnih proteina i nukleinske kiseline

#### Lančana reakcija polimeraze (PCR metoda)

PCR metoda (engleski: *Polymerase Chain Reaction*) je vrlo važna metoda u molekularnoj biologiji i biotehnologiji. Relativno kratki dio DNA umnožava se u veliki broj identičnih kopija. Omogućeno je povećanje izuzetno male količine DNA, poput jedne sekvence gena, na milijun primjeraka, u uvjetima *in vitro* koristeći enzime. Na taj se način osigurava dovoljna količina DNA za daljnje analize iz uzorka. Uz DNA uzorak, za PCR postupak neophodni su *primeri*, Taq polimeraza, nukleotidi i termocikler. PCR je značajna tehnika ne samo za mjerenje virusnih nukleinskih kiselina nego i za medicinsku dijagnostiku, industriju biljaka, ekološke studije i gensku terapiju. PCR je jedna od najčešće korištenih metoda za otkrivanje virusnih nukleinskih kiselina. Korištenjem PCR-a možemo utvrditi identitet i/ili količinu virusnih genoma viriona i zaražene stanice. PCR, kao jako osjetljiva metoda, omogućava određivanje više mogućih virusa u uzorcima i prepoznavanje grupa virusa kroz uobičajene sekvence. Unatoč svim tim prednostima, doista je teško spriječiti kontaminaciju uzoraka uzetih od pacijenata koja će se koristiti za dijagnostičku PCR analizu, što se može smatrati neuspjehom. PCR analiza, također poznata kao PCR reverzne transkripcije (RT-PCR), također se može koristiti za identificiranje virusne RNA dodavanjem početnog koraka ili pretkoraka, u kojem se RNA pretvara u DNA. Transkripcija se provodi pomoću enzima, tzv. reverzna transkriptaza. Ovaj je korak pretvorbe važan jer omogućuje dobivanje DNA koji je stabilniji od RNA i nije ga lako denaturirati poput RNA za PCR proces. Polimerazna lančana reakcija odvija se u uređaju koji automatski i precizno

kontrolira promjene temperature tijekom ciklusa amplifikacije (PCR termoblok). Taj uređaj zagrijava i hladi reakcijsku smjesu u epruvetama koje se nalaze u termobloku i osim kontrole temperature, termoblok kontrolira i dužinu trajanja pojedinih dijelova ciklusa amplifikacije. U prvom ciklusu nastaju dvije stanice, a s brojem ciklusa broj DNA eksponencijalno raste, te nakon dvadesetog ciklusa prelazi milijun stanica (Slika 2). [3,6,7].



**Slika 2.** Eksponencijalno povećanje molekule DNA u PCR metodi[7].

### Immunoblotting

*Immunoblotting*, poznat i kao *Western blotting*, koristi se za identificiranje proteina i promjene koncentracije proteina u uzorcima s antitijelima. Proteini su fiksirani na površini membrane i lako dostupni za analize npr. protutijelima ili drugim ligandima Tehnika *imunoblottinga* određuje specifične virusne proteine izolirane iz stanice, tkiva, organa ili tjelesne tekućine. Metodom *imunoblottinga* može se odrediti stadij infekcije pacijenta, ovisno o tome koje je antitijelo razvijeno protiv kojeg antigena. Poteškoće i troškovi tumačenja rezultata *imunoblottinga* rezultiraju smanjenjem ukupne upotrebe metode, usprkos tome, ovom se tehnikom znanstvenici još uvijek široko koriste u dijagnostičke i istraživačke svrhe. [2,3,8].

### Imunoprecipitacija

Imunoprecipitacija je metoda taloženja proteinskog antigena iz otopine pomoću antitijela koje se veže za taj specifični protein. Ovom se tehnikom može izolirati i koncentrirati određeni protein iz uzorka koji sadrži tisuće različitih bjelančevina. Metoda je korisna, jer omogućuje počišćivanje virusa koji se ne mogu pročistiti

standardnim metodama, a omogućuje i brzo pročišćivanje netaknutih viriona od malih tkiva za analizu transmisijske elektronske mikroskopije. Ipak, antitijela specifična za virus su bitna za imunoprecipitaciju, što se može smatrati nedostatkom ove metode.[2,3]

#### **Imunoenzimska metoda (ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*)**

ELISA testovi provode se jednostavnom enzimskom analizom, određivanjem antitijela koristeći antigene ili antitijela koja su povezana s enzimom, koji se lako analizira. Osnovni princip ELISA tehnike je postupak radioimunološkog ispitivanja koji uključuje antitijela označena enzimom vezanim za supstrat, fluorescentnom molekulom ili radioaktivnim izotopom, kako bi se otkrili antigeni. ELISA se koristi u raznim područjima kao što su studije zaštite okoliša kako bi se otkrile onečišćujuće tvari, prehrambenoj industriji kako bi se otkrili toksini ili alergeni, te medicinskim studijama kako bi se otkrili lijekovi i biljezi bolesti. ELISA testovi se mogu koristiti za otkrivanje virusa ili antitijela iz uzorka pacijenta zaraženog virusom. Može se otkriti količina virusa iz stanične kulture/uzorka ili određenog antitijela za određeni virusni patogen. ELISA je mnogo brža metoda od *immunoblotinga* za otkrivanje određenog virusnog proteina. Smatra se metodom s velikom osjetljivošću, koja može otkriti vrlo niske količine bjelančevina. S druge strane, ELISA testovi ponekad mogu biti prilično skupi zbog cijene reagensa. Izravni ELISA, neizravni ELISA, sendvič ELISA i konkurentni ELISA su različite vrste ELISA testova koji se koriste za različita znanstvena područja. [2,3].

#### **Hemaglutinacijski test (HA - *hemagglutination assay*)**

U osnovi se hemaglutinacija može opisati kao nakupljanje crvenih krvnih stanica zbog prisutnosti hemaglutinirajućih sredstava kao što su virusi. Hemaglutinacija je proces kojim se crvena krvna zrnca aglutiniraju. Aglutinin koji je uključen u hemaglutinaciju naziva se hemaglutinin. Neki virusi, poput virusa gripe, bjesnoće, rubeole, zaušnjaka i ospica, imaju površinske proteine hemaglutinina koji se vežu za površinu glikoproteina eritrocita. Hemaglutinacija je metoda koja se oslanja na činjenicu da mnogi virusi sadrže proteine koji se mogu vezati i aglutinirati eritrocite. Princip ovog ispitivanja je jednostavan; međutim, priprema uzorka smatra se zahtjevnom što je nedostatak ove metode. Hemaglutinacija je jedna od najčešće korištenih tehnika za otkrivanje prisutnosti i količine virusa u različitim uzorcima. Međutim, ne može dati informacije o razini ili mjeri virusne zaraznosti.

Hemaglutinacija se također koristi za otkrivanje razine antitijela naspram specifičnih virusa u uzorcima pacijenta. Prisutnost specifičnih antitijela spriječit će hemaglutinaciju eritrocita vežući viruse. [2,3].

### 1.2.2. Izravno mjerenje čestica virusa

#### **Protočna citometrija (FCM - *flow cytometry*)**

FCM je tehnika koja se često koristi u biologiji, mikrobiologiji, virologiji i imunologiji. FCM tehnika uključuje istraživanje stanica, staničnih populacija i antigena u uzorcima poput ljudskih tjelesnih tekućina. Danas, uz trenutna tehnološka poboljšanja, FCM metoda omogućuje određivanje čestica veličine od 100 do 1000 nm, poput virusa/virusnih čestica. FCM je postao važan uređaj u virusologiji, zbog svojih primjena u virusnoj replikaciji i interakcijama virusnih stanica, kao i zbog svoje sposobnosti za kvantitativno određivanje proteina. FCM se koristi za dijagnozu virusnih bolesti. [2,3]

#### **Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM - *transmission electron microscopy*)**

Transmisijska elektronska mikroskopija značajna je metoda za područje dijagnostike. Može se opisati kao tehnika mikroskopije u kojoj elektroni prolaze kroz razne uzorke i stvaraju sliku uzorka. Metoda omogućava prikazivanje vrlo malih čestica i zbog toga se koristi u medicinskim znanostima, virologiji, fizičkim znanostima i sličnim znanostima. Virusi su vrlo mali, a većinu se može pregledati samo metodom prijenosne elektronske mikroskopije. Ovom metodom je napravljen značajan doprinos virologiji u otkriću mnogih virusa, dijagnozi različitih virusnih infekcija i temeljnim istraživanjima interakcija stanica domaćina virusa. Iako je relativno brza metoda, te pruža kvalitativne i kvantitativne informacije o virionima, nedostatak TEM metode je što ima visok prag otkrivanja i može se primijeniti samo na visoke koncentracije virusa. [2,3]

### 1.2.3. Metode identifikacije virusa

#### **Mikroskopija u staničnoj kulturi**

Stanična kultura podrazumijeva uzgoj živih stanica izvan živih organizama u kontroliranim uvjetima. Da bi se stvorila stanična kultura, najvažnije je vršiti uzgoj u sterilnim uvjetima. Prvi korak u stvaranja stanične kulture je izolacija i usitnjavanje potrebnog tkiva. Nakon toga se različiti enzimi poput kolagenaze nanose na tkivo zbog

razgradnje izvanstaničnog matriksa i oslobađanja stanica. Sljedeći korak koji se primjenjuje je centrifugiranje. Kasnije se stanice i mediji za rast kombiniraju s kulturama za uzgoj u posudicama i spreme u inkubator određene vlažnosti, na temperaturu od 37 °C i sa 5% CO<sub>2</sub>. Na kraju, stanice rastu i dijele se povezivanjem s kulturama u posudici. Izolacija virusa zasnovana na staničnoj kulturi prihvaćena je kao „zlatni standard“ u otkrivanju i identificiranju virusa i tehnika je s kojom se sve ostale metode ispitivanja uspoređuju. [3].

#### **Imunofluorescentni test (IFA - *Immunofluorescence assay*)**

Imunofluorescentni test je dijagnostička tehnika koja se koristi za interakciju između virusa i specifičnih antitijela. Test se može smatrati relativno brzom metodom, a lako se primjenjuje bez posebnih tehničara, te pruža pouzdanu identifikaciju virusa. To je jedna od najčešće korištenih tehnika za brzo otkrivanje virusnih infekcija identificiranjem antigena virusa. Imunofluorescentni test pruža podatke za identifikaciju virusa temeljem obojenja za otprilike 12 sati. Nažalost, tehnika možda neće moći dati informaciju o vrsti svih sojeva virusa i testovi mogu biti poprilično skupi zbog cijene korištenih antitijela. Prije razvijenih i standardiziranih ELISA testova, imunofluorescentni test je bio korišten za dijagnostiku, ali sada se koristi samo za istraživačke studije.[3].

#### **1.2.4. Mjerenje virusne infektivnosti**

##### **Analiza virusnih plakova**

Analiza virusnih plakova jedna je od najčešće korištenih metoda u virologiji za određivanje virusnih plakova titra, a smatra se da je ova tehnika učinkovita samo za viruse koji mogu zaraziti jednostanične stanice i replicirati stanice. Ovom metodom moguće je odrediti zaraznu dozu; drugim riječima, kvantitativnu količinu zaraznog virusa čestice. Rezultati su izraženi kao jedinice za stvaranje plaka. Ova metoda obično zahtijeva 4 do 10 dana, ovisno o virusu koji se analizira i smatra se dugotrajnom. Rezultati ispitivanja virusnih plakova mogu varirati ovisno o uvjetima ispitivanja i pronađenim rezultatima u jedinicama za stvaranje plaka. Moguće je da neće uvijek pokazati određenu količinu zaraznih virusnih čestica, što ovu metodu čini dosta nepouzdanom. [3].

#### **✚ Kvantitativna analiza TCID50, LD50, EID50**

Postupci, kao što su testovi TCID50, LD50 i EID50, koriste se za određivanje zaraznog titra tipova virusa koji mogu uzrokovati citopatske učinke u kulturi tkiva tijekom razdoblja od 5 do 20 dana.[2].

#### **✚ Analiza žarišta imunofluorescencije (IFA - *Immunofluorescence foci assay*)**

Analiza žarišta imunofluorescencije brza je metoda titracije virusa koja omogućuje mjerenje virusa u staničnim linijama, koja ne potiče pojavu plaka i ne pokazuje se prepoznatljivi citopatski učinak. [3].

### **1.3. Elektrokemijske metode u dijagnostici virusa**

Brza procjena patogenosti i virulencije ključ je za poduzimanje odgovarajućih zdravstvenih mjera u vremenu epidemija. Najvažniji preduvjet za borbu protiv virusa je rana izolacija virusa iz tijela domaćina ili iz okoliša u kojem se virus nalazi i otkrivanje prisutnost virusne nukleinske kiseline (RNK virusa). Važno je pronaći brze metode za otkrivanje virusa u okolišu, tjelesnim tekućinama i tkivima na jednostavan, jeftin, osjetljiv i selektivan način.

Uobičajene dijagnostičke tehnike za različite vrste i sojeve virusa uključuju test plaka, enzimski imunosorbentni test, lančanu reakciju polimeraze u stvarnom vremenu, reverznu transkriptazu, imunobloting i imunofluorescentne testove. Ove metode su široko korištene za kliničku dijagnostiku, ali zahtijevaju dugotrajnu pripremu uzoraka, skupe reagense, opremu i obučeno osoblje, te nisu prikladne za zemlje u razvoju zbog troškova obrade i ograničenog pristupa patološkim laboratorijima.

Biosenzor se može definirati kao analitički uređaj koji sadrži dio pretvarača i biološki element. Koristi se za otkrivanje analita i kombinira biološku komponentu sa fizikalno-kemijskim detektorom. U usporedbi s konvencionalnim tehnikama, elektrokemijski nanosenzori su brži, praktičniji, precizni, selektivni i ekonomični. Upotreba nanočestica u kombinaciji s elektrokemijskom detekcijom obećavajuća je metoda u otkrivanju virusa. Biosenzor na bazi nanočestica može se razviti tako da u potpunosti zadovoljava zahtjeve specifičnosti, odnosno selektivnosti na određeni patogen, može se lako koristiti, ne zahtjeva velike troškove i brzo i ponovljivo otkriva patogene mikroorganizme u kliničkim uzorcima.

Navedene su elektrokemijske metode u dijagnostici virusa:

- ✚ voltametrijske
- ✚ ciklička voltometrija
- ✚ diferencijalna impulsna voltometrija
- ✚ pravokutnovalna voltometrija (square wave)
- ✚ potenciometrijske metode
- ✚ amperometrijske metode

#### 1.4 Modificirane elektrode i biosenzori

Voltametrijski (amperometrijski) senzori su mjerna osjetila (elektrokemijske ćelije) u kojima se mjeri jakost struje kao funkcija narinutog napona i koncentracije elektroaktivne vrste, analita. Mnoge molekulske vrste mogu se oksidirati ili reducirati pri potencijalu elektrode karakterističnom za dotičnu vrstu. Držimo li potencijal elektrode konstantnim, u količini potrebnoj za brzu reakciju redukcije ili oksidacije, jakost struje (tzv. granična struja) izravno je proporcionalna koncentraciji elektroaktivne vrste, tj. analita. Mijenja li se potencijal elektrode od potencijala pri kojem je reakcija redukcije (oksidacije) vrlo spora do graničnog potencijala, jakost struje ovisi o koncentraciji analita, ali i brzini i vremenskoj ovisnosti promjene potencijala.

Sadrži li ispitivana otopina veći broj elektroaktivnih vrsta (analita), izborom (regulacijom) potencijala radne elektrode postizemo selektivnu redukciju (oksidaciju) pojedine vrste. Međutim, granice električnoga potencijala u kojima provodimo redukciju/oksidaciju elektroaktivnih vrsta u vodenim otopinama jesu oko 2,5 V. To je određeno redukcijom  $H^+$  iona u elementarni vodik na negativnoj granici i oksidacijom  $OH^-$  u elementarni kisik na pozitivnoj granici, što je tzv. elektrokemijski prozor.

Uz pretpostavku da su uvjetni potencijali pojedine vrste ravnomjerno raspoređeni te da su elektrodne reakcije elektrokemijski reverzibilne, možemo razlučiti približno 13 elektroaktivnih vrsta. Praktično možemo nedvojbeno razlučiti i detektirati, regulacijom potencijala radne elektrode, od 4 do 6 vrsta tvari. Dakle, izbor potencijala radne elektrode kod voltametrijskih senzora omogućuje relativno malu selektivnost. Selektivnost amperometrijskih senzora može se povećati djelovanjem na formalni potencijal ometajuće vrste optimiranjem aktivacijskog prenapona, blokiranjem prijenosa ometajuće vrste do površine radne elektrode ili selektivnom adsorpcijom. Prijenos



elektroaktivnih vrsta, odvija se difuzijom, migracijom i konvekcijom. U većine amperometrijskih senzora granična struja uvjetovana je brzinom difuzije analita. Poželjno je da odzivni signal nije ovisan o trajanju mjerenja. To se može ostvariti kontroliranim prijenosom elektroaktivne vrste do površine elektrode, konvekcijom (miješanje, rotiranje elektrode) ili uporabom radne elektrode malih dimenzija od nekoliko mikrona (mikroelektroda) u kojih granična struja poprima, nakon stanovitog vremena, ustaljenu vrijednost. [5].

#### **1.4.1. Kemijski modificirane elektrode**

Posebna svojstva radne elektrode, prikladne za specifičnu uporabu, mogu se ostvariti kemijskom modifikacijom površine radne elektrode. Na površinu elektrode nanosi se sloj (film) kojim se ostvaruje svojstvo elektrode različito od svojstva izvorne elektrode.

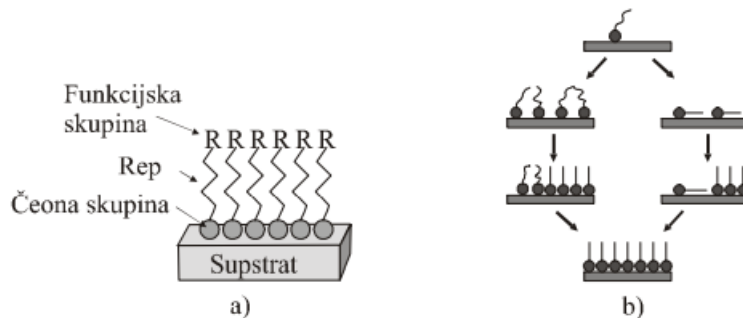
Kemijski modificirane elektrode mogu se konstruirati na različite načine mehanizmom adsorpcije (ireverzibilne), kemijskim vezanjem površinskog monosloja ili prekrivanjem površine filmom polimernog ili drugog materijala. Mnoge molekulske vrste spontano se adsorbiraju iz elektrolitne otopine na površinu elektrode, čime postižu niže energetske stanje od stanja u otopini. Tako se molekulske vrste koje sadrže sumpor jako vežu na površinu žive, zlata i drugih metala zbog jake interakcije sumpora s metalima.

Živina elektroda uronjena u otopinu koja sadrži vrlo malu koncentraciju cistena ili drugoga proteina, koji sadrži sumpor, prekrije se adsorbiranim monoslojem organske molekulske vrste. Ona se tada oksidacijom (redukcijom) može elektrokemijski detektirati.

Mnogi anioni (halogenidi, tiocijanati, cijanati) i organske molekulske vrste (posebno one koje sadrže aromatski prsten, dvostruke veze i dugu lančastu strukturu) adsorbiraju se na površini metala i ugljik. Adsorpcija kovinskih iona koji se inače ne adsorbiraju može se inducirati prethodno adsorpcijom aniona (npr.  $SCN^-$ ) preko kojeg se ciljani kovinski ion veže na površinu elektrode.

Superstruktura na površini elektrode može se konstruirati i kovalentnim vezanjem određene molekulske vrste na funkcijske skupine (najčešće oksidi, hidroksidi) koje postoje na površini elektrode ili ih se prethodno formira. Funkcijske skupine na površini metalnih elektroda i ugljika mogu se stvoriti kemijskom ili elektrokemijskom oksidacijom. Na takvu površinu elektrode, preko funkcijskih skupina, kovalentno se

vežu molekulske vrste koje se tada elektrokemijski mogu detektirati (različiti feroceni, viologen, bipiridini rutenija, osmija i željeza itd.). Posebnu ulogu imaju samoformirajući monoslojevi (engl. *Self-Assembled Monolayer*, SAM - Slika 3). [5]



*Slika 3. Struktura monosloja (a) i njegovo formiranje (b) [5].*

#### 1.4.2. Biosenzori

Temelje se na imobilizaciji biološki osjetljivoga sloja npr. enzima, antitijela, DNA, na površinu radne elektrode. Mehanizmom prepoznavanja aktivna tvar stupa u interakciju s ciljanim analitom i omogućuje nastajanje elektrokemijskog analitičkog odzivnoga signala. Srodne elektrode imaju na površini suspenziju bakterija ili biološkoga biljnog ili životinjskoga tkiva. U mnogim slučajevima enzim odnosno suspenzija drže se uz površinu elektrode s pomoću permeabilne polimerne membrane, npr. membrane za dijalizu. Imobilizacija aktivne tvari na površinu elektrode može se konstruirati uklapanjem u gel, adsorpcijom, kovalentnim (unakrsnim) vezanjem i stvaranjem ovojnice (kapsule).

Mnogi biosenzori jesu amperometrijski senzori zasnovani na selektivnim biokemijskim reakcijama kojima se ostvaruje visoka selektivnost senzora. Priroda je razvila spektar biomolekula i biostruktura koje karakterizira molekulski specifično prepoznavanje koje stoji iza mnogih životnih procesa. Svaka biološka vrsta ima tri cilja da bi preživjela: metabolizirati, reproducirati se i procesuirati informacije. Ovo posljednje znači prikupiti informaciju i prenijeti je. Imunosustavi prepoznaju tkiva kao kompatibilna i nekompatibilna.

Raspoznavanje mirisa i okusa i ostalih osjeta ovise o selektivnoj interakciji molekula s kemoreceptorima uz neuralno kodiranje informacije.[5].

Biosenzori imaju neke prednosti: pristupačni su, brzo reagiraju i koriste jednostavne analitički prihvatljive tehnike. Stoga predstavljaju široko područje otkrivanja i dijagnoze što je pogodno za analizu.

Biosenzori se obično definiraju kao analitički uređaji sastavljeni od sustava biološkog prepoznavanja i fizikalno-kemijskog pretvarača. Biosenzori imaju visoku selektivna svojstva zbog mogućnosti prilagođavanja specifične interakcije spojeva imobilizacijom elemenata za biološko prepoznavanje na površini senzora.

Tipično biosenzori sadrže tri komponente:

- bioreceptor ili biološka komponenta za identifikaciju,
- pretvarač signala
- pojačalo.

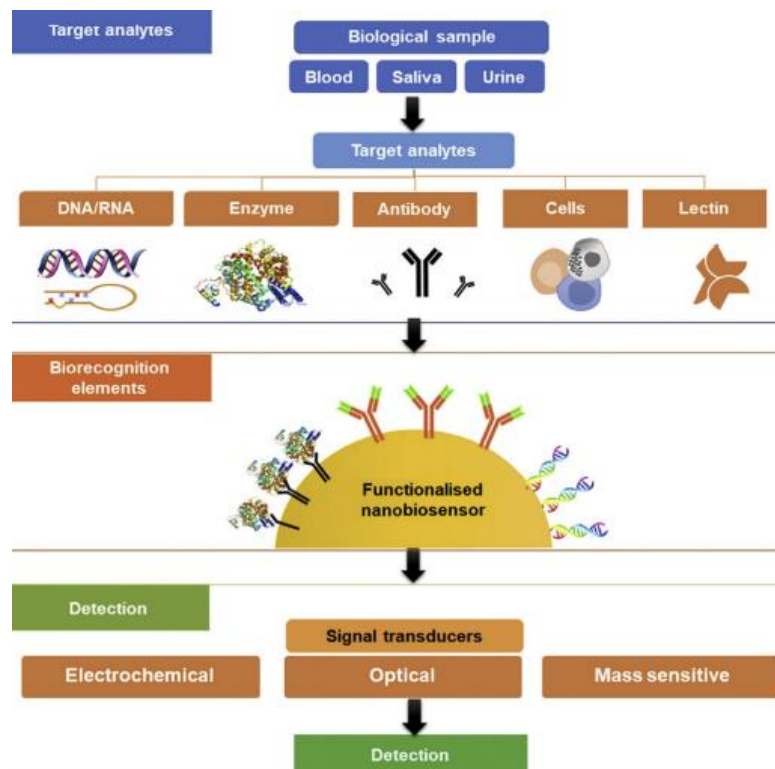
Biosenzor je analitički uređaj koji pretvara biološki odgovor u mjerljivi i obradivi signal. Imobiliziranje biološki osjetljivog materijala na površini biosenzora novi je pristup u tehnologiji biosenzora. Elementi bioreceptora općenito se smatraju biomarkerima, enzimima, mikroorganizmima, nukleinskim kiselinama, tkivima, virusima, bakterijama i antigenima.

Najčešće tradicionalne tehnike su elektrokemijske (ciklična voltometrija (CV), amperometrija, impedancijska spektroskopija, potenciometrija), te optičke i razne metode temeljene na tranzistorima. S obzirom na sve veću proizvodnju nanočestica i nanomaterijala otvaraju se nove mogućnosti za razvoj elektrokemije nanomaterijala i nanobiosenzora. O ovakvim novim pristupima u dizajnu biosenzora osigurava se izgradnja biosenzora i razvoj novih elektrokemijskih testova.

Uz to, napredni nanobiosenzor može se koristiti za postizanje visoke osjetljivosti i selektivnosti biološkog istraživanja u analitičke svrhe u raznim poljima istraživanja i tehnologije.

Daljnja istraživanja usmjerena su ka poboljšanju postojećih i razvijanju novih analitičkih tehnika za brzu, selektivnu kvalitativnu i kvantitativnu karakterizaciju i analizu primjenom nanomaterijala, koje imaju velik potencijal. Prednosti su olakšana reakcija prijenosa elektrona, velike dodirne površine i dobra električna vodljivost te dobra kemijska stabilnost i mogućnost minijaturizacije sustava.

Od ostalih prednosti biosenzora svakako vrijedi spomenuti kataliziranje elektrokemijske reakcije i pojačavanje signala sustava uslijed brze i olakšane reakcije prijenosa elektrona, te bioraspoznavanje. [3]. Prednost biosenzora između ostalog je i njihova prenosivost, što ih čini pogodnima *in situ* za mjerenje.



*Slika 4. Princip rada biosenzora [3]*

Biosenzori se mogu podijeliti prema korištenom bioreceptoru i po tipu pretvorbe signala (Slika 4). Prema bioreceptoru biosenzori se dijele na enzimске biosenzore i imunosenzore koji kao biološki aktivni element koriste antitijela.

Prema tipu pretvorbe signala biosenzori se dijele na elektrokemijske, optičke, masene, te još valja spomenuti piezoelektične i temperaturne biosenzore. Među biosenzorima, elektrokemijski biosenzori s volumetrijskim pretvaračem pokazali su velik potencijal u otkrivanju biomolekula.

Elektrokemijski biosenzori su naširoko korišteni za otkrivanje različitih analita zbog njihovog brzog odziva, sjajne osjetljivosti, jednostavnosti i isplativosti. Primjena biosenzora korištenjem tehnike pravokutnovalne voltometrije (*square wave*), cikličke voltometrije i elektrokemijske impedancije spektroskopije omogućuje brzo otkrivanje različitih vrsta analita.

Zbog pojave elektrokemijske reakcije na površini elektrode nakon interakcije s ciljnom molekulom, impedancijski biosenzori su naširoko korišteni za nadzor okoliša na štetno djelovanje nekih kemikalija i lijekova koji u okoliš dolaze različitim putevima, za interakciju između antitijela i antigena, te za otkrivanje novih DNA sojeva virusa ili patogena. Impendancijski biosenzori proučavaju dielektrične parametre biološkog

sustava u širokim frekvencijama, te pružaju informacije o površinskoj adsorpciji, izmjeni iona, difuziji i prijenosu naboja.

Druga elektrokemijska tehnika, kvantitativna analiza pomoću pravokutnovalne voltametrije, jedna je od tehnika s najperspektivnijim mehanizmima u izradi biosenzora, zbog njihove sposobnosti da daju osjetljiviji odgovor za brzo bioprepoznavanje u usporedbi s tehnikom diferencijalne pulsne voltametrije (DPV). U impulsnim metodama postupci se temelje na primjeni pulsnih promjena potencijala i trenutnog odziva te se mjere u prikladnom vremenu u odnosu na vrijeme impulsa. Sve pulsne tehnike temelje se na razlici u brzini promjene naboja i faradejske struje povezane na potencijalni korak ili puls. Signal pobude u impulsnoj voltametriji naponski je impulsni signal pravokutnog oblika. Mjerenje se provodi tako da se potencijal radne elektrode tijekom mjerenja održava na osnovnom potencijalu. Pri tom osnovnom potencijalu struja ćelije (redukcije ili oksidacije) neznatna je, zapravo praktično nula. U određenom trenutku na osnovni napon superponira se pravokutni naponski impuls kratkoga trajanja. Takvim pravokutnim impulsom izaziva se elektrodna reakcija redukcije odnosno oksidacije. Amplituda naponskog impulsa postupno raste. Tako na kraju dosegne napon što uzrokuje graničnu difuzijsku struju odnosno dostiže napon što odgovara platou polarografskog vala. Izvorno je u impulsnoj voltametriji rabljena kapajuća živina elektroda pa se nazivala impulsna polarografija. Naponski impuls u trajanju od 5 do 100 milisekunda, najčešće od 40 do 60 ms, primijenjen je na kraju trajanja živine kapi. Danas se rijeko rabi kapajuća živina elektroda. Zamijenile su je statička živina kap(ajuća) elektroda, viseća živina kap i živina film elektroda. Kod statičke živine kap elektrode elektronički se regulira tok žive, iz rezervoara u kapilaru relativno velikog unutrašnjeg promjera, s pomoću mikroventila (zasuna). Kratkotrajnim otvaranjem ventila u trajanju manjem od 100 ms formira se kap. Zatvaranjem zasuna živina kap ostaje na otvoru kapilare dok se mehanički, s pomoću elektronički upravljanoeg elektromehaničkoga čekića ne otkine s otvora kapilare. Radna površina elektrode konstantna je od trenutka formiranja do otkidanja kapi. Tako se uklanjaju nedostaci prisutni pri uporabi živine kapajuće elektrode koji se očituju u promjeni radne površine živine kapi tijekom rasta kapi i učinci konvekcije na struju elektrode. [3].

Radna elektroda (WE) predstavlja osnovni dio elektrokemijske ćelije i komponentu u elektrokemijskim ispitivanjima. Najčešće korišteni materijali za izradu radne elektrode su različiti metali (Pt, Au, Hg itd.) i ugljikove elektrode (grafit, staklasti ugljik, ugljikova pasta i ugljikove nanocjevčice). Primjena ugljikovih elektroda

omogućava rad u vrlo negativnom području potencijala, odnosno u širokom području potencijala kako u katodnom tako i u anodnom smjeru. Najčešći oblik ugljičnih elektroda je elektroda od staklastog ugljika (GC – *glassy carbon*). U širokoj upotrebi su i elektrode od ugljične paste, koje pružaju velike mogućnosti modifikacije površine.

Elektroda na bazi kristalnog dijamanta dopirana borom (BDDE - *Boron-Doped Diamond Electrode*) može se koristiti kao platforma biosenzora. Modificirani materijal vrlo je perspektivan materijal za izradu biosenzora treće generacije zbog svoje kemijske inertnosti, primjene u širokom području potencijala, male pozadinske struje, biokompatibilnosti i visoke stabilnosti. H5N1, virus ptičje gripe, određuje se različitim metodama kao što su imunokromatografija, reverzna transkripcija PCR (RT-PCR), ELISA, serološkim metodama, mikrobalsom kvarcnog kristala, rezonancijom površinske plazmone i fluorescencijom. [9].

Metodi elektrokemijske detekcije posvećena je velika pažnja, radi malih troškova, prenosivost (mobilnost uređaja i senzora). Postupci se najčešće provode bez prethodne dugotrajne pripreme i pročišćavanja uzorka i mogućnosti rada s malim volumenom uzorka. Neki od primjera uspješno razvijenih elektrokemijskih biosenzora je imunosenzor za antigen hepatitisa B (HBeAg), senzor na bazi kokatalitičke reakcije peroksidaze izolirane iz hrena (HRP) uz primjenu nanoporoznog zlata koje se može koristiti kao modifikator. Razvijeni imunosenzor daje dobru linearnu vezu između vršne struje i koncentracije HBeAg. [10].

Elektrokemijski DNA biosenzor predstavlja također jedan od uspješno razvijenih i učinkovitih alata zbog svojstava poput brzog odgovora, visoke specifičnosti, osjetljivosti i razumljivosti za korisnike. Ovaj elektrokemijski analitički senzor razvijen je na specijalnom papiru (ePAD) i sjajan je doprinos senzoru, jer je papir jeftina podloga. [11].

Od ostalih primjera razvijenih biosenzora za različite namjene možemo spomenuti i genomski DNA biosenzor za otkrivanje hepatitisa B u krvnoj plazmi bolesnika bez korištenja PCR metode [12], ili izuzetno osjetljiv elektrokemijski biosenzor pomoću grafenskih kvantnih točaka za otkrivanje HBV-DNA s vrlo visokom osjetljivošću, granicom detekcije je od 1 nM i linearnim područjem određivanja od 10 do 500 nM. [13].

Elektrokemijskom impedancijskom spektroskopijom (EIS) otkriven je jedan od glavnih koncepata u bioosjetljivosti primjenom senzorske platforme izrađene od jednog sustava materijala (Label-Free biosenzori), a to su mogućnosti identifikacije nukleotida

(DNA/RNA), enzima, aptamera i antitijela. EIS metoda mjerenja je nedestruktivna i relativno jednostavna, te ne koristi nikakva ekološki neprihvatljiva otapala niti agresivne kemikalije. Jedan primjer ovog impedimetrijskog senzora je i HPV DNA biosenzor temeljen na polikarbonatnoj elektrodi modificiranoj filmom nanočestica zlata (AuNTs-PE) s linearnim područjem određivanja od 0,01 do 1 mM. [14].

Još jedan primjer smjera razvoja biosenzora su upotreba nanoceluloze za imobilizaciju antitijela, enzima ili plemenitih metala, što bi moglo znatno unaprijediti izvedbu elektrokemijskih imunosenzora. Pregledom literature utvrđeno je kako postoji vrlo mali broj radova o primjeni nanoceluloze u elektrokemijskim imunološkim testovima. Jedan takav primjer je imunosenzor za tip leukemije razvijen kao sendvič tip senzora nanoceluloze i zlata. [15].

## 2. BIOSENZORI ZA DETEKCIJU VIRUSA - PRIMJENA ELEKTROKEMIJSKIH METODA U BRZOJ DIJAGNOSTICI

Biosenzori danas predstavljaju brzo i pouzdano rješenje za praćenje polutanata u okolišu, ali i u prisutnosti raznih patogena i toksina u organizmu uzrokovanog različitim virusima, toksičnim spojevima i metalima. Minijaturizacija senzora omogućila je *in situ* mjerenja, čime se isključuju dugotrajna i ponekad skupa mjerenja u laboratorijima. U radu je prikazan kratak pregled nekih biosenzora, te njihova primjena u detekciji virusa s primjenom u medicinske svrhe.

**Tablica 1.** Prikaz prednosti i nedostataka elektrokemijskih metoda u dijagnostici

Prednosti	Nedostatci
Brzo i jednostavno mjerenje	Sposobnost da reducira molekule koje interferiraju
Visoka osjetljivost	
Potrebna mala količina uzorka	
Jednostavna priprema uzorka - najčešće nije potrebna izolacija niti predobrada uzorka	Nije selektivno za pojedine vrste spojeva unutar skupina osim ako elektroda nije modificirana
Ne zahtijevaju upotrebu dodatnih reagensa	
Omogućavaju analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu	
Ekonomski aspekti	

Usprkos navedenim nedostacima elektrokemijskih metoda (Tablica 1), prednosti ovih tehnika potiču na sve češću primjenu.

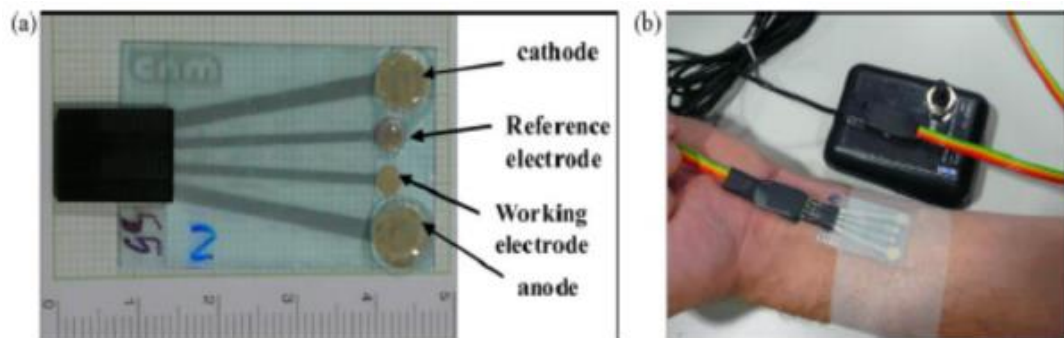
Biosenzori koji su dosad bili dostupni su višekomponentni sustavi koji vrše optimizaciju i provjeru valjanosti, a razvijeni sustavi su vrlo izazovni. Biomedicinski inženjeri preporučuju dijagnostiku biosenzorom koji bi trebao biti najmanja komponentna jedinica za učinkovitu detekciju.

Među različitim vrstama senzora, elektrokemijski senzori pojavljuju se kao dijagnostički alat. Elektrokemijski nosivi senzori znatno su više u uporabi od optičkih.

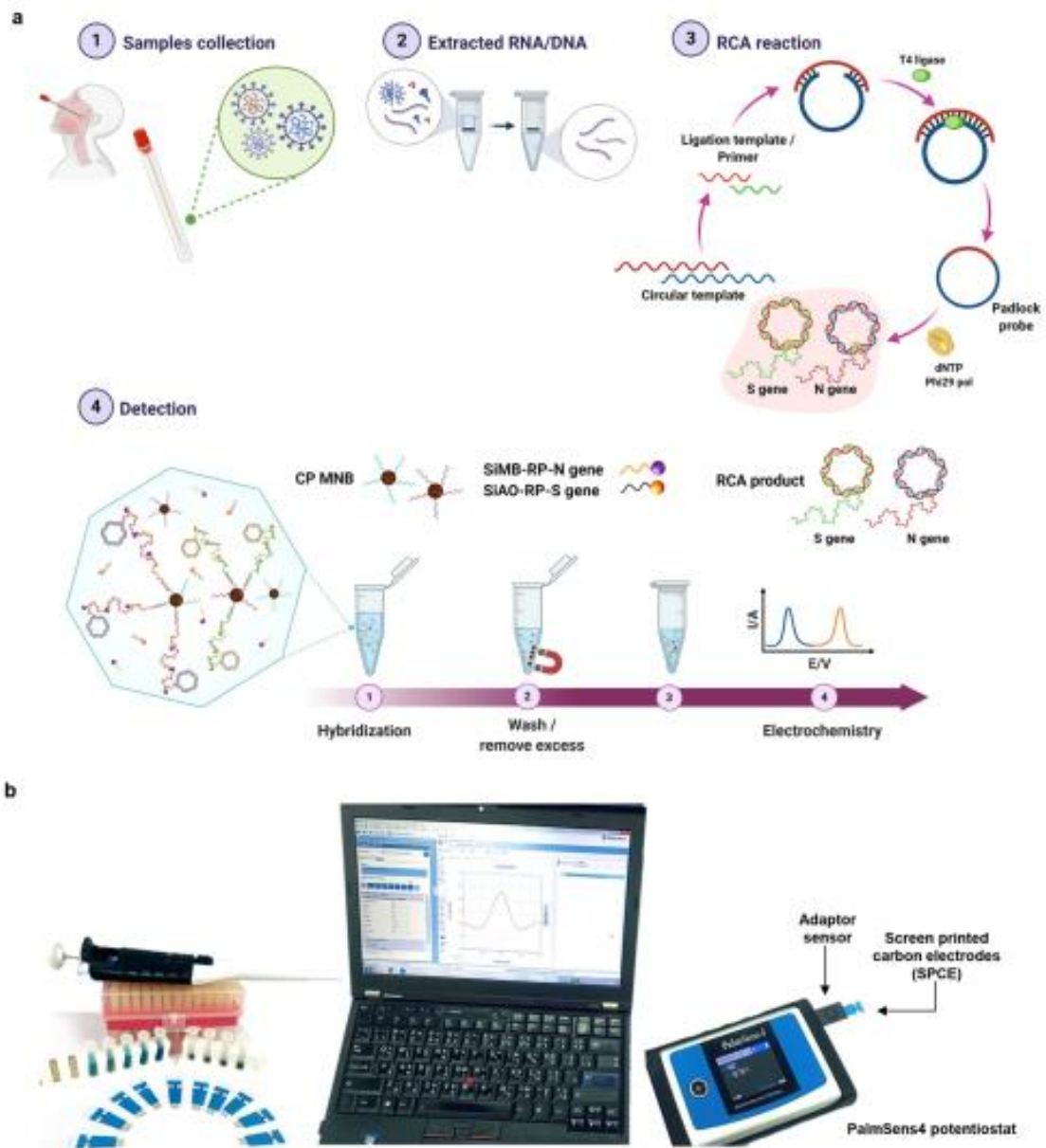


Prednosti elektrokemijskih senzora u odnosu na optičke su to što im ambijentalno svjetlo ne smeta u radu i imaju dobru dugoročnu stabilnost. Osim toga, nosivi elektrokemijski senzori su prikladni za razne primjene zahvaljujući visokoj performansi, minijaturizaciji i niskoj cijeni. Takvi senzori sastoje se od ion selektivne elektrode, a mjeri se razlika potencijala u odnosu na referentnu elektrodu.

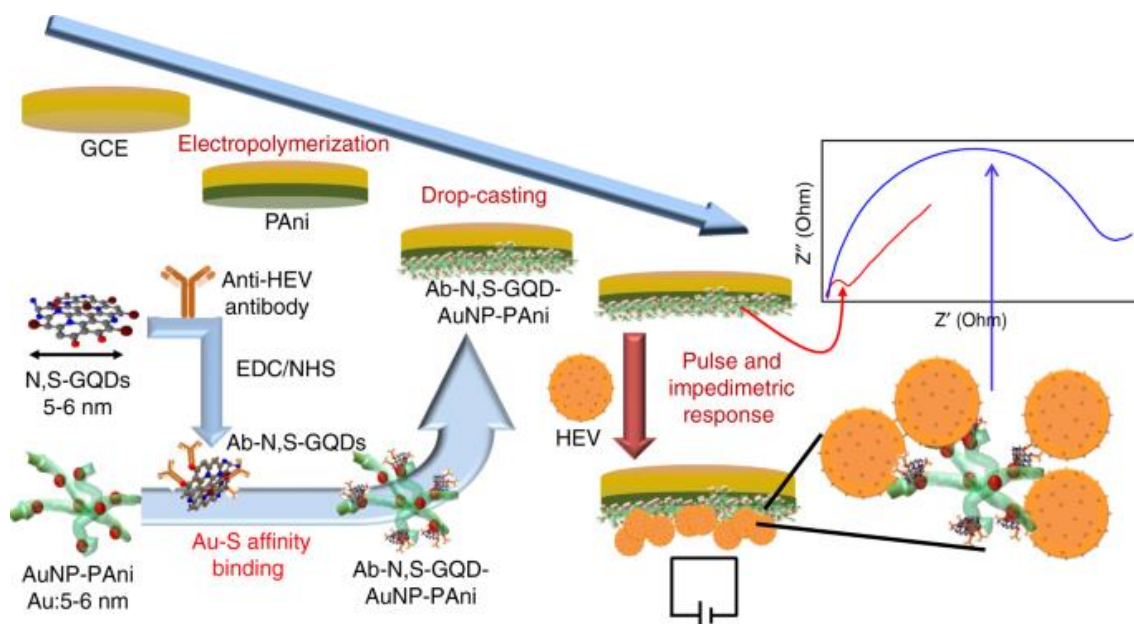
Na slikama 20., 21., i 22 mogu se vidjeti primjeri nekih komercijalnih senzora, kao na primjer potenciometrijskog senzora za mjerenje natrija u znoju (slika 20), voltometrijskog senzora za mjerenje SARS-CoV-2 s prikazanim cijelim ciklusom od uzimanja obrisu do primjera elektrokemijske digitalizirane detekcije (slika 21) i Shematski dijagram impedimetrijskog nanokompozitnog senzora za određivanje virusa hepatitisa (slika 22).



*Slika 20. Primjer potenciometrijskog senzora [16].*



*Slika 21. Primjer voltometrijskog senzora – A - platforma za otkrivanje SARS-CoV-2 iz kliničkih uzoraka korištenjem elektrokemijskog biosenzora s RCAGENI N i S. B - Postavljanje detekcije za elektrokemijsku analizu pomoću uređaja za potenciostat spojenog na prijenosno računalo. [17].*



*Slika 22. Primjer impedimetrijskog senzora, shematski dijagram Ab-N,S-GQDs@AuNP-PANI nanokompozitnog senzora za određivanje virusa hepatitisa [18].*

## 2.1 Primjeri modifikacije elektroda

### 2.1.1 Primjer određivanja virusa hepatitisa B

Koristeći elektrokemijske i optičke tehnike za otkrivanje genoma DNA virusa hepatitisa B (HBV), modifikacija površine je izvedena od jednolančane DNA (HEPB1S), specifične za HBV, kalemljene na zlatnu elektrodu modificiranu reduciranim grafenskim oksidom ili nanočesticama zlata. Analiza primjenom diferencijalne pulsne voltametrije ukazuje da je dodatak genoma virusa HBV prouzročio porast vršne vrijednosti struje za oko 1,4 puta u usporedbi s osnovnom strujom bez dodatka analita. Uočena je linearna ovisnost struje s logaritamskom koncentracijom HBV-genomskog DNA i granicom određivanja elektrokemijskim biosenzorom do 7,65 pg/ $\mu$ L analita. Mjerenja elektrokemijske impedancije spektroskopije pokazala su oko dva puta povećanje otpora prijenosu naboja nakon dodavanja HBV genomske DNA. Ispitivanja koja su koristila koloidnu suspenziju nanočestica zlata pokazali su pomak vršne valne duljine, linearno proporcionalne koncentraciji HBV-genomske DNA, s granicom određivanja od 0,15 ng/ $\mu$ L. Upotreba nanočestica zlata za ispitivanje kliničkih uzoraka uspješno je ispitana u krvnoj plazmi. [19].

### 2.1.2 Primjer određivanja virusa gripe

Za detekciju virusa gripe sintetiziran je imunosenzor kao nanohibrid koji se sastojao od nanočestica platine, poroznih čestica ZnO, te hemina (porfirin koji sadrži željezo s klorom, Pt-pZnO-hemin na bazi alkalne fosfataze). Ukratko, porozne čestice ZnO (pZnO) pripremljene su koristeći topljivi škrob kao sredstvo za zgušnjavanje, nakon čega je slijedila površinska funkcionalizacija nanočestica platine hidrotermalnom metodom (Pt-pZnO). Zatim se hemin s karboksilnom funkcionalnom skupinom spontano adsorbirao na Pt-pZnO esterskim vezanjem između karboksilne funkcijske skupine hemina i ZnO. U usporedbi s nanočesticama platine i heminom, dobiveni Pt-pZnO-hemin nanohibrid pokazao je bolju elektrokatalitičku aktivnost prema 1-naftolu (1-NP). Zato je razvijen, odnosno unaprijeđen elektrokemijski imunosenzor zasnovan na *in situ* generiranju redoks senzora alkalnom fosfatazom (ALP) i Pt-pZnO-heminom kao pojačivačem signala. Ovdje je elektrokemijski aktivan 1-NP nastao enzimskom hidrolizom neaktivnog 1-naftilfosfata pomoću ALP-a, zatim je Pt-pZnO-hemin korišten kao katalizator za katalitičko oksidiranje 1-NP, što je rezultiralo rastom elektrokemijskog odziva. U usporedbi s drugim nanomaterijalima, uključujući Au-pZnO, Pt-pZnO i Au-pZnO-hemin, izvrsna elektrokatalitička svojstva Pt-pZnO-hemina čine ga obećavajućim nanohibridnim materijalom za imunosenzor na bazi ALP-a za detekciju virusa gripe. [20].

### 2.1.3 Primjer određivanja virusa HIV-a

Za elektrokemijsku detekciju HIV-1 koristi se elektroda na bazi CS/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanobiokompozita. Najatraktivnija značajka ovog sustava je izvedba biosenzora s nanočesticama Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> koje bi mogle znatno poboljšati brzinu prijenosa elektrona, a time i doprinijeti povećanju osjetljivosti. Kada se kao vanjski posrednik koristi metilensko plavo (MB), te pravokutnovalna voltometrija (SWV) i elektrokemijska impedancija spektroskopija (EIS) kao tehnike, predložena elektroda ima nisku granicu određivanja (do samo 50 pM), prihvatljivu stabilnost i dobru ponovljivost, što je važno za kliničku dijagnozu virusa. Uz pravilnu prilagodbu osjetilnog dijela senzor se jednostavno može prilagoditi za otkrivanje drugih vrsta bakterijskih patogena. [21].

### 2.1.4 Primjer određivanja Zika virusa

Zika virus (ZIKV) se pojavio kao globalna prijetnja nakon njegovog širenja, jer uzrokuje mikroencefaliju i druga oštećenja mozga u novorođenčadi rođene od zaraženih

majki. Epidemiološko praćenje infekcije otežano je nedostatkom pouzdanih seroloških testova koji bi mogli razlikovati ZIKV i druge infekcije flavivirusom, posebno virusom denge (DENV). Budući da oba virusa prenose iste vrste komaraca, njihovo se širenje u velikoj mjeri preklapa i nužna je pouzdana serološka razlika između ova dva tipa virusa. Način za razlikovanje je razvoj novog biosenzora koji se temelji na rekombinantnim oblicima ZIKV nestrukturnog proteina 1 (NS1) i domeni III proteina ovojnice (EDIII). Korištenjem elektrokemijske impedancijske spektroskopije (EIS) i pravokutnovalne voltometrije (SWV) dokazano je da je, uz izuzetno osjetljivo otkrivanje ZIKV-specifičnih antitijela u serumu i slini, biosenzor odmah razlikovao ZIKV i DENV-specifična antitijela. Stoga ovaj novi biosenzor omogućuje procjenu ZIKV antitijela u krvi i slini, a na rezultate ne utječe prisutnost antitijela specifičnih za DENV virus. [22].

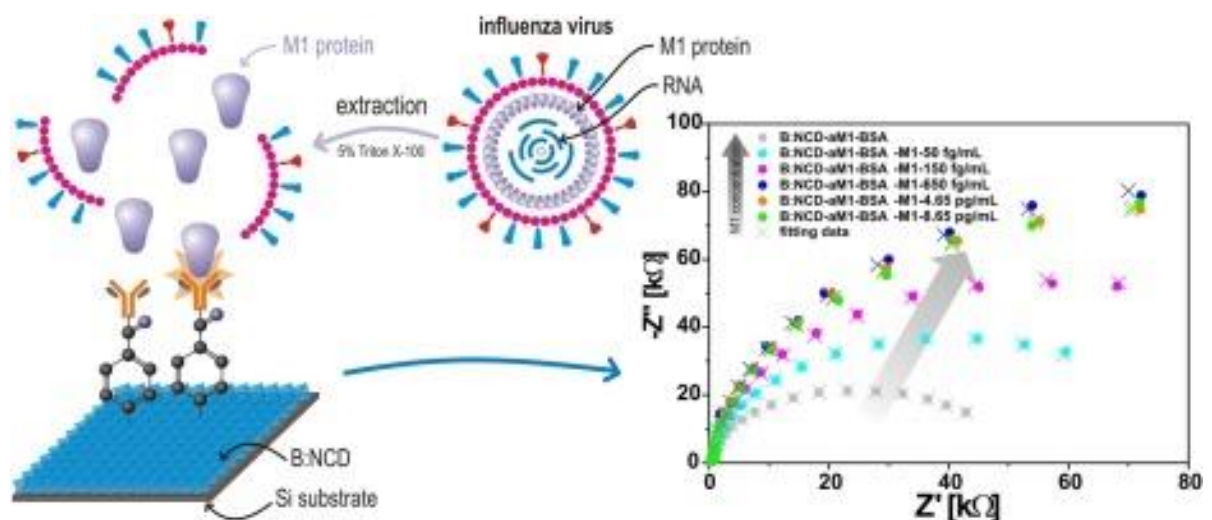
#### 2.1.5 Primjer određivanja virusa tristeze kod citrusa

Tristeza je jedna od destruktivnih bolesti citrusa koju uzrokuje virus citrusne tristeze (CTV). Povijesno gledano, CTV je povezan s ozbiljnim slučajevima brzog propadanja citrusa. Stoga je praćenje CTV-a važan aspekt za izbjegavanje takvih ponovnih epidemija, koje bi mogle ugroziti proizvodnju citrusa širom svijeta. U tom kontekstu, prvi put je osmišljen impedimetrijski biosenzor za detekciju nukleinske kiseline CTV. Osjetna platforma temeljena na screen-printed ugljičnoj elektrodi (SPCE) modificirana je elektrodeponiranim nanočesticama zlata (AuNP), što je omogućilo učinkovitu imobilizaciju tioliranih ssDNA osjetljivih molekula, kao i povećanje električne vodljivosti elektrode. Rast čestica AuNP optimiziran je i okarakteriziran pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM), cikličke voltometrije (CV) i elektrokemijske impedancijske spektroskopije (EIS). Istraživano je ponašanje tioliranog sloja ssDNA i njegove hibridizacije s ciljanim DNA na AuNP površinama EIS mjerenjima u redoks sustavu fero/feri ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ). Glavne karakteristike dizajna senzora, poput veličine AuNP-a, koncentracije DNA na površini senzora i vremena imobilizacije, zajedno s vremenom hibridizacije DNA optimizirani su kako bi se postigle najbolje performanse biosenzora za mjerenje u realnim uzorcima. Vrijednosti impedancije DNA hibridizacije rastle su s koncentracijom DNA vezane s citrusnom tristezom, pokazujući logaritamski odnos struje naspram koncentracije virusa u rasponu od 0,1–10  $\mu\text{M}$ . Rezultati također ukazuju da je biosenzor uspio selektivno detektirati CTV nukleinske kiseline u prisutnosti drugih nespecifičnih DNA. Štoviše, pokazali su dobre performanse sustava u stvarnoj matrici uzorka biljaka. Uz to,

ponovljivost senzora poboljšana je nakon hibridizacije na MCH/poli (AT) tioliranoj DNA podlozi, što je potvrđeno testovima ponovljivosti i stabilnosti tijekom dana. [23].

### 2.1.6 Primjer određivanja biomolekularnog virusa gripe

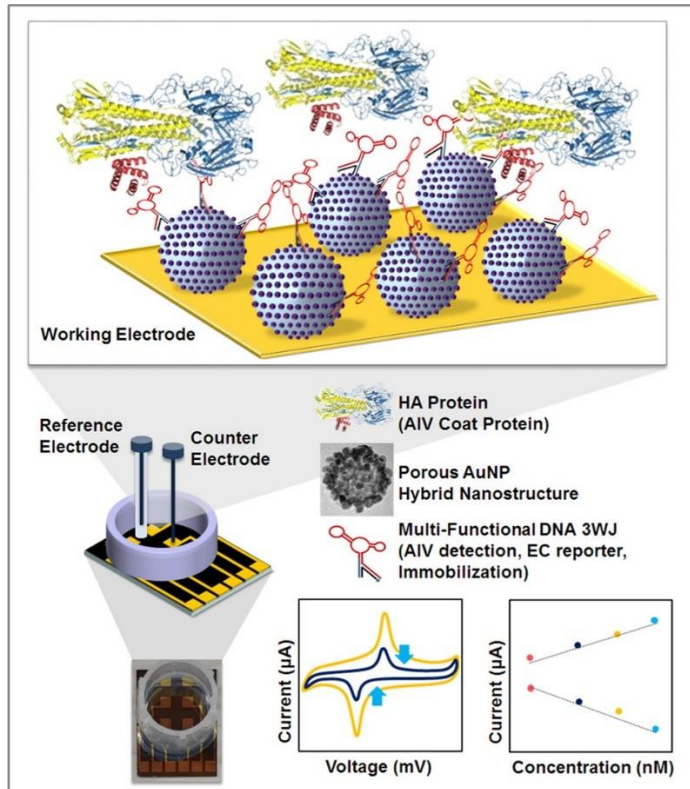
Jedan od primjera razvijenih impedimetrijskih senzora za otkrivanje biomolekularnog virusa gripe koristi elektrokemijsku impedancijsku spektroskopiju, a senzor je izrađen tako da je na silicijev nosač pričvršćen na nanokristalna dijamantna elektroda dopirana borom (BDDE) s kovalentno vezanim antitijelima. Nove metode brzog otkrivanja patogena s poboljšanom isplativošću i djelotvornošću trenutno su u fokusu znanstvenika iz cijelog svijeta. Na temelju iskustava iz brzog širenja pandemije virusa gripe 2009. godine jasno je da je razvoj sustava za ranu dijagnozu ove infekcije ključan. Ključna faza liječenja je otkrivanje virusne infekcije tijekom početne faze razvoja kada je u ždrijelu zaražene osobe prisutno otprilike samo nekoliko desetaka do stotina virusnih čestica. Ovaj novi biosenzor za izravno otkrivanje virusnih čestica u ultraniskim koncentracijama pokazao se iznimno učinkovitim. Poliklonska anti-M1 antitijela (aM1) za protein M1, univerzalnog biomarkera virusa gripe, pričvršćena su na površinu dijamantne elektrode. Hvatanje proteina M1 rezultira promjenom EIS spektra (Slika 5). Postignuta granica određivanja (LOD) u puferu u slini je  $5 \times 10^{-14}$  g/mL, odnosno nekoliko čestica virusa po uzorku. Uz to, ovaj se test uskoro može razviti u prvi komercijalni test koji koristi dijamantne elektrode za otkrivanje infekcije gripom. [24].



Slika 5. Detekcija virusa gripe [24].

### 2.1.7 Primjer određivanja virusa ptičje gripe

Virus ptičje gripe (AIV) jedan je od najštetnijih virusa za živa bića zbog brze zaraze, različitih mutacija i opasnih simptoma. Izrađena je senzorska platforma od jednog sustava materijala (Label-Free biosenzori) AIV H5N1 koji se sastoji od multifunkcionalne DNA strukture na poroznim nanočesticama Au (pAuNP) proizvedenim koristeći elektrokemijsku (EC) tehniku. Kao multifunkcionalno osjetilo elektroda je modificirana s tro-funkcionalnom spojnicom DNA (3WJ). Svaki fragment DNA 3WJ ugrađen je na osjetilni dio senzora (aptamer za otkrivanje proteina hemaglutinina (HA)) u kojem se generira EC signal (DNA-enzim (HRP)) i imobilizacijski dio (tiol skupina). Svaki je fragment sastavljen kako bi se formirala DNA 3WJ za detekciju virusa. Kako bi se povećala osjetljivost elektrokemijskog signala, sintetizirane su porozne čestice zlata pAuNP. Pripremljena je tako DNA 3WJ na Au elektrodi modificiranoj pAuNPs metodom sloj-po-sloj (LbL). HA protein može se otkriti već od 1 pM u otopini HEPES, odnosno u razrijeđenom pilećem serumu (Slika 6). Ovo je istraživanje pokazalo jednostavnu izradu i jednostavne elemente za detekciju AIV-a. Ovaj tip biosenzora može biti dobar kandidat za razvoj komercijalnih senzora za otkrivanje virusa. [25].



Slika 6. Detekcija virusa ptičje gripe [25].

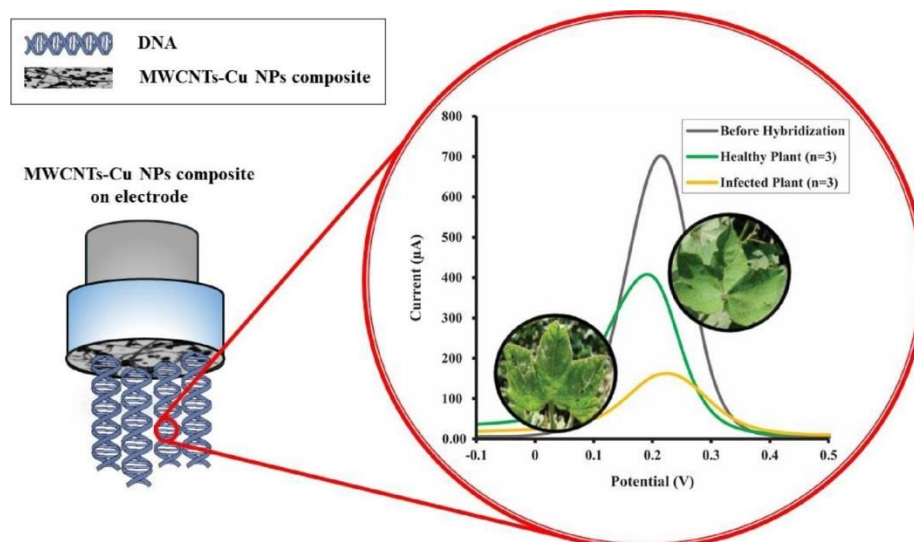
### 2.1.8 Primjer određivanja Humanog enterovirusa

Humani enterovirus 71 (EV71), glavni je patogen koji kod djece uzrokuje bolesti ruku, stopala i usta (HFMD – *Hand, foot, and mouth disease*), te ga je važno dijagnosticirati i kontrolirati. Kolorimetrijski i elektrokemijski imunosenzor za detekciju EV71 razvijen je na temelju dvoslojnih magnetskih nanozrnaca. Dvoslojna magnetska nanozrnca (DL-MB) proizvedena su istodobnom imobilizacijom EV71 monoklonskih antitijela (mAb) i peroksidaze hrena (HRP) na magnetskim nanozrncima. Hvatanjem viriona EV71 u uzorku od 20  $\mu\text{L}$  na mAb modificiranom AuNP presvučenom ITO elektrodom i naknadnim vezivanjem s DL-MB, uz dodatak TMB i  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mogu se izravno očitati kolorimetrijski signali koji odgovaraju EV71 s koncentracijom od 1,0 ng/mL, omogućujući otkrivanje virusa *point of care* metodom, odnosno jednostavnim zapažanjem. Nadalje, redukcijom oksidiranog TMB na elektrodi, elektrokemijski odziv s granicom detekcije od 0,01 ng/mL je potvrđen. U kliničkim uzorcima, kolorimetrijski i elektrokemijski imunosenzor pokazuje iste rezultate kao s primjenom reverznog PCR. Koliko je poznato, 2018. godine je prezentirano ovo prvo izvješće o mogućnosti određivanja EV71 elektrokemijskom metodom. Prednosti ove metode uključuju visoku osjetljivost, sposobnost kolorimetrijske detekcije i lako rukovanje, te osiguravaju obećavajuću budućnost u dijagnostici virusa izravnim metodom. [26].

### 2.1.9 Primjer određivanja agrovirusa

Za učinkovito otkrivanje agrovirusa koriste se kompoziti nanočestica bakra s ugljikovim nanocjevčicama. Trodimenzionalni nanokompozitni biosenzor elektrokemijskim metodama korišten je za otkrivanje virusa u biljkama. Ugljikove nanocjevčice koriste se kao vodljivi okvir za „usidrenje“ aglomerata nanočestica bakra za otkrivanje agrovirusa. Ovaj je materijal primijenjen za procjenu infekcije izazvane geminivirusima, koji su glavna prijetnja biljkama pamuka u azijskim i afričkim zemljama. Analiza je rađena diferencijalnom pulsnom voltometrijskom (DPV) koristeći metilensko plavo kao redoks indikator. U prisutnosti ciljane DNA, odziv senzora smanjio se sa  $7 \times 10^{-4}$  na  $1 \times 10^{-4}$   $\mu\text{A}$  (slika 7). Postignuta je selektivnost biosenzora od 97,14 % a utvrđena granica određivanja je 0,01 ng/ $\mu\text{L}$ . Razvijeni biosenzor stabilan je najmanje četiri tjedna, gubeći samo 4,3% početne vrijednosti signala. Ovaj je senzor uspio otkriti prisutnost virusa u soku ekstrahiranom iz lišća pamuka, pružajući tako velike mogućnosti u primjeni za otkrivanje niza drugih virusa koji zaraze usjeve. [27].

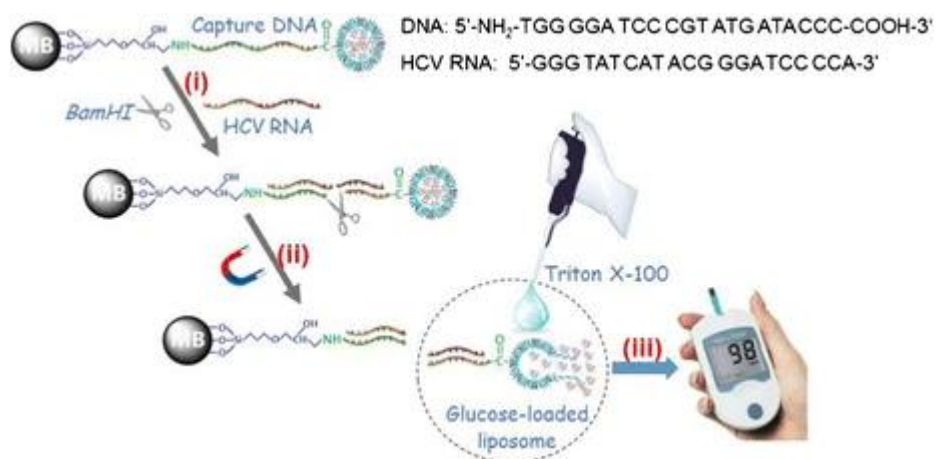




*Slika 7. Detekcija agrovirusa [27].*

#### 2.1.10 Primjer određivanja virusa hepatitisa C

Magnetska zrnca modificirana glukozom koriste se za poboljšavanje odziva glukometra u brzom identifikaciji RNA virusa hepatitisa C (HCV RNA). Razvijena je metodologija detekcije za jednostavno, brzo i selektivno otkrivanje HCV RNK, pomoću digitalnog prijenosnog osobnog glukometra (PGM). Osjetilni dio modificiran je nanoliposomima i glukozom, a sintetiziran je metodom isparavanja HCV RNA je kovalentno vezan na magnetske nanočestice biosenzora preko amino skupine oligonukleotida, a zatim za liposom modificiran glukozom. Ako je u krvi ili serumu prisutan HCV RNA, on se selektivno veže na oligonukleotid, stvara DNA, cijepa do struktura koje su prepoznatljive na osjetilnom dijelu, koje su zatim detektirane kao odziv, odnosno brojčana vrijednost na digitalnom PGM-u (slika 8). U optimalnim uvjetima, PGM signal linearno raste s porastom HCV RNA za koncentracije u rasponu od 10 pM do 1,0 µM. Granica određivanja (LOD) sustava bila je 1,9 pM. U analizi ciljane HCV RNA postignuta je dobra ponovljivost i selektivnost. Uzorci humanog seruma koji sadrže HCV RNA analizirani su razvijenom senzorskom platformom koja daje zadovoljavajuće rezultate na temelju usporedbe s odgovarajućim rezultatima standardizirane metode Cobas Amplicor za HCV analizu. [28].



*Slika 8. Otkrivanje HCV [28].*

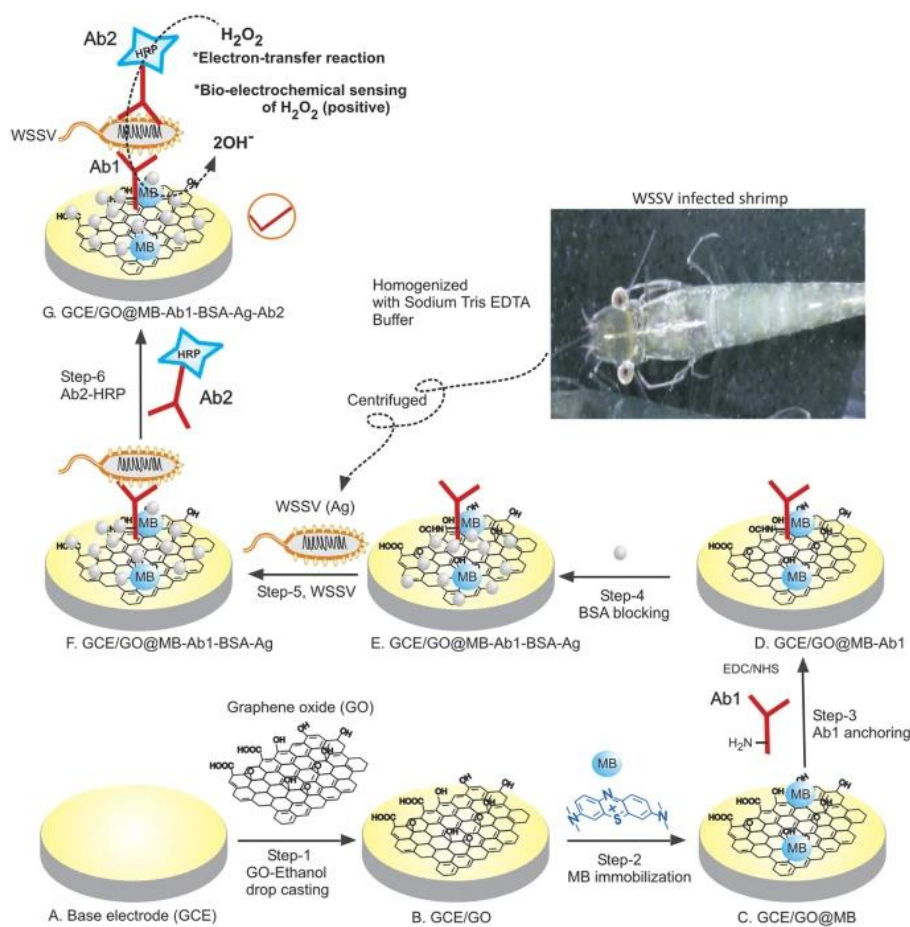
### 2.1.11 Primjer određivanja virusa HPV

Elektrode na bazi reduciranog grafenskog oksida/MoS<sub>2</sub> modificirane odgovarajućim aptamerom koriste se za otkrivanje humanog papiloma virusa (HPV). Uz nanomaterijal grafen, molibdenov disulfid, MoS<sub>2</sub> je sol velike površine koja može poboljšati biosenzibilnost elektrode. U konačnici elektroda od staklastog ugljika sukcesivno je modificirana poroznim reduciranim grafenskim oksidom i prGO MoS<sub>2</sub> za osjetljivo i selektivno otkrivanje L1-glavnog kapsidnog proteina HPV virusa. Razvijeni su elektrokemijski senzori za HPV nakon kovalentne funkcionalizacije elektrode s aptamerom Sc5-c3, RNA-aptamerom. Korištenjem diferencijalne pulsne voltametrije (DPV) i uz optimirane parametre, linearni odnos između vršne gustoće struje redoks para kao što je Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-</sup> i koncentracije HPV-16 L1 proteina u rasponu od 0,2 – 2 ng/mL (3,5 pM–35,3 pM) je postignut uz granicu određivanja od 0,1 – 1 ng/mL (1,75 pM). Razvijena metodologija pokazala je visoku selektivnost u odnosu na ometajuće vrste (interferencije) kao što su drugi tipovi HPV virusa (HPV-16 E6), otvarajući nove mogućnosti razvijanja koncepta razvoja biosenzora za primjenu u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi virusa [29].

### 2.1.12 Primjer određivanja virusa sindroma bijele mrlje

Virus sindroma bijele mrlje (WSSV) glavni je razarajući virus u industriji akvakulture. Osjetljiva i selektivna dijagnostička metoda za WSSV važna je zbog potrebe za ranim otkrivanjem i zaštitom farmi akvakulture. Jednostavni elektrokemijski imunosenzor na bazi elektroda od staklastog ugljika modificiranih grafenskim oksidom na koji je mobilizirana metilen plava boja (MB) (GCE/GO/MB) koristi se za selektivnu

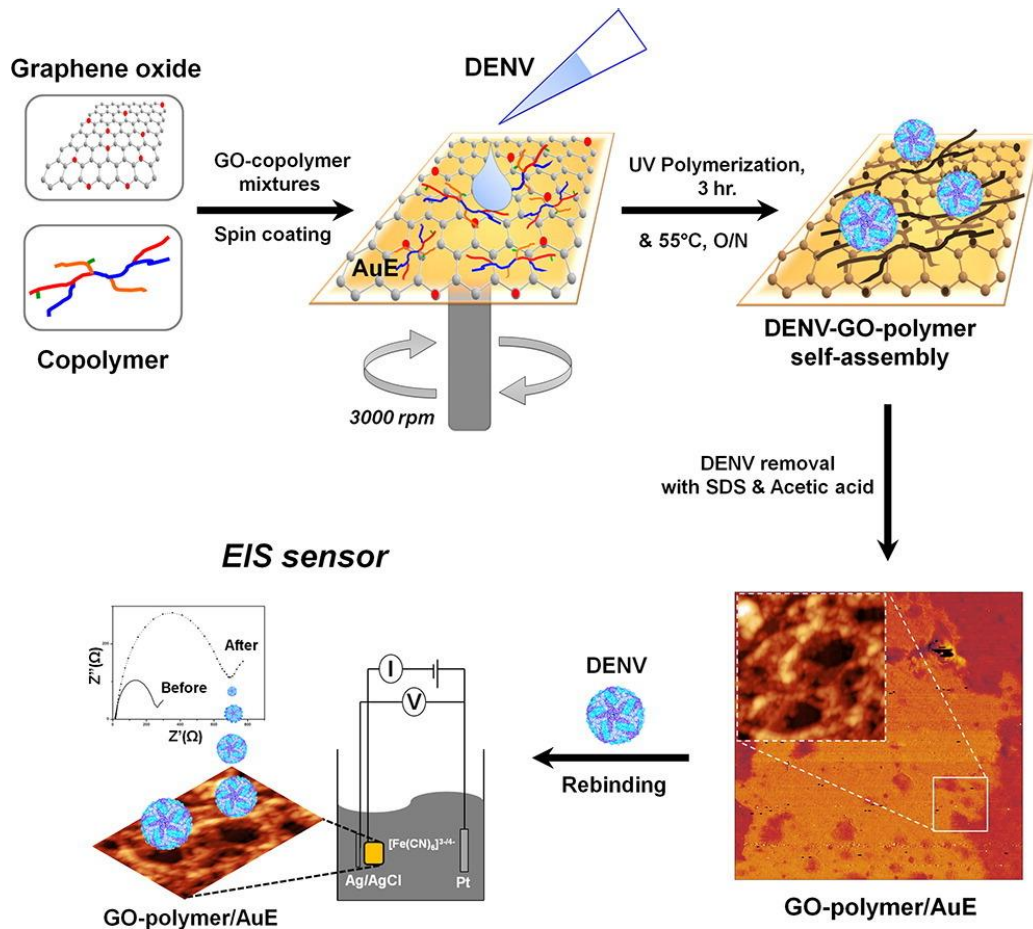
i, brzu ( $35 \pm 5$  minuta) analizu uzorka WSSV, bez potrebe za pretkorakom izolacije odnosno pripreme uzorka. Imunosenzor je pripremljen sekvencijalnom modifikacijom primarnog protutijela, blokatora (goveđi serumski albumin), antigena (kao vp28 protein), sekundarnog protutijela povezanog s peroksidazom hrena (Ab2-HRP) na GCE/GO/MB (Slika 9). Modificirana elektroda pokazala je dobro definirani redoks-pik pri ravnotežnom potencijalu od 0,4 V u odnosu na Ag/AgCl, uslijed reakcije redukcije  $H_2O_2$  bez lažno pozitivnih rezultata. Pri mjerenju nije uočeno ometanja signala uslijed otopljenog kisika u otopini fosfatnog pufera pH=7. Pri optimalnim uvjetima, linearni odziv senzora je u rasponu od  $1,36 \times 10^{-3}$  do  $1,36 \times 10^7$  kopija / $\mu$ L vp28. Dobiveni rezultat pokazuje osjetljivost do četiri reda veličine veću od vrijednosti dobivenih lančanom reakcijom polimeraze (PCR) i WSSV tehnikama na bazi *Western blota*. Izravno elektrokemijsko određivanje WSSV-a pomoću ovakvog imunosenzora uspješno je demonstrirano u uzorcima sirovog tkiva. [30].



Slika 9. Detekcija virusa bijele mrlje [30].

### 2.1.13 Primjer određivanja virusa sindroma denge

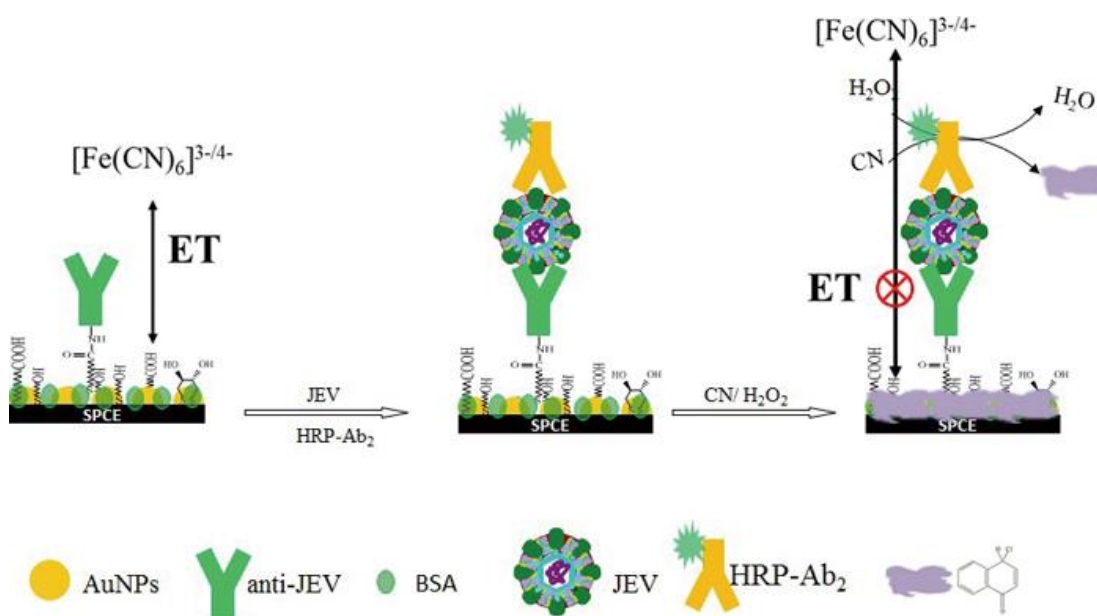
Denga groznica je bolest koja svake godine ubije mnogo ljudi u zemljama koje su u razvoju. Tijekom rane infekcije pacijent pokazuje visoku temperaturu bez drugih simptoma. Bez odgovarajućeg liječenja, mogu se dogoditi ozbiljna oštećenja unutarnjih organa, što ponekad dovodi i do smrti. Brza tehnika ranog otkrivanja virusa denge (DENV) mogla bi smanjiti broj smrtnih slučajeva. Nova metoda u detektiranju virusa denge i *screening* protutijela je temeljena na uporabi elektrokemijskog biosenzora na bazi grafena i odgovarajućeg polimera. Ova studija predstavlja novu tehniku za otkrivanje, klasifikaciju i probir antitijela na DENV koja se temelji na elektrokemijskoj impedancijskoj spektroskopiji (EIS) (Slika 10). Otkriveno je da je na otpor prijenosa naboja zlatne elektrode presvučene polimerom ojačanim grafenovim oksidom utjecala vrsta virusa i količina istaložena na površini. Za objašnjenje ovog opažanja korištena je sposobnost molekularnog prepoznavanja uspostavljena tijekom pripreme kompozita GO-polimera. Linearna ovisnost otpora prijenosa naboja naspram koncentracije virusa kretala se od  $1 \times 10^3$  do  $2 \times 10^3$  PFU/mL DENV s granicom određivanja 0,12 PFU/ml. [31].



Slika 10. Detekcija virusa denge [31].

### 2.1.14 Primjer određivanja virusa japanskog encefalitisa

Osjetljivi i jednokratni impedimetrijski imunološki test na bazi enzima biokataliziranih precipitacijom na elektrodi od ugljikove paste (SPCE) modificiranoj nanočesticama zlata (AuNP), koristi se za otkrivanje virusa japanskog encefalitisa (JEV). Biosenzor je konstruiran kovalentnim vezivanjem miješanog samoformirajućeg monosloja na česticama zlata sa specifičnim antitijelima. Da bi se detektirao JEV i pojačao signal odziva, antitijelo selektivno prema hrenovoj peroksidazi (HRP) povezano je s biosenzorom reakcijom imunološkog „sendviča“, prikazanog na slici 11. HRP je korišten za kataliziranje oksidacije 4-kloro-1-naftola da bi se dobio netopivi talog, koji predstavlja barijeru prijenosu elektrona na elektrodi. Za praćenje precipitacije na elektrodi korištena je elektrokemijska impedancijska spektroskopija (EIS). Otpor prijenosa elektrona ( $R_{et}$ ) biosenzora izravno je povezan s koncentracijom JEV u otopini. U optimalnim uvjetima, metoda je generirala linearni raspon odgovora  $5 \times 10^5$  PFU/mL, a granica određivanja bila je 167 PFU /mL. Biosenzor je pokazao dobru selektivnost u prisutnosti drugih virusa. [32].



*Slika 11. Detekcija virusa japanskog encefalitisa [32].*

### 2.1.15 Primjer određivanja rotavirusa

Rotavirusi (RV) su vodeći uzrok teškog dječjeg gastroenteritisa u cijelom svijetu. Predložen je osjetljiv i jednostavan impedimetrijski senzor bez specifične modifikacije za određivanje rotavirusa pomoću elektrokemijske impedancijska spektroskopija (EIS). Imunosenzor se izrađuje od samoformirajućih monoslojeva (SAM) cisteamina na zlatnim sononanočesticama (AuSNP) kojima je modificirana elektroda od staklastog ugljika. Otpor prijenosa elektrona na sučelju elektrode je parametar za detekciju rotavirusa. Korištenjem predloženog imunosenzora pronađen je dobar linearni odnos između promjene ukupnog otpora i logaritamske vrijednosti koncentracije rotavirusa u širokom rasponu, s niskom granicom određivanja (LOD) 2,3 PFU/mL a ukupno vrijeme analize je 55 minuta. Istraženi su i optimizirani radni parametri imunosenzora, poput pH, koncentracije antitijela i vremena imunološke reakcije. Nisu pronađene smetnje od drugih virusa poput virusa hepatitisa A (HAV) i enterovirusa. Uz to, impedimetrijski imunosenzor pokazao je dobru osjetljivost, selektivnost i stabilnost. [33].

### 2.1.16 Primjer određivanja virusa leukemije kod ptica

Elektrokemijski imunosenzori tipa „sendviča“ koriste se za detekciju podgrupe J virusa leukoze ptica (ALV-J) na temelju nove elektrode dodatno modificirane srebrom. Zahvaljujući zadivljujućim značajkama ugljikovih nanocjevčica-željeznih oksida, magnetskih kompozita (CIMC), katalitičkim svojstvima nanočestica zlata (AuNP) i adsorpcijskim i redukcijskim svojstava huminskih kiselina (HA), protutijela odabranog virusa su uzgojena na serumu goveđeg albumina (BSA) te je dobiven višestruko modificiran imunosenzor CIMC-Au-HAs/Ab2-BSA. Nadalje,  $\beta$ -ciklodekstrinski funkcionalni grafenski listovi (CD-GS) korišteni su kao matrice za imobilizaciju antitijela zbog velike površine i vrhunske električne vodljivosti. Primarni postupci su sljedeći: prvo su se CD-GS koristili kao imunosenzorna platforma za imobilizaciju protutijela. Nakon toga, nakon sklopa tipa sendviča, CIMC-Au-HAs/Ab2-BSA proizveden je na površini imunosenzora kako bi se adsorbirao i katalitički reducirao  $Ag^+$  do Ag. Tada je Ag detektiran diferencijalnom pulsnom voltametrijom (DPV) u otopini KCl. Imunosenzor je pokazao dobre analitičke performanse za detekciju ALV-J u rasponu od  $10^{2.05}$  do  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL s granicom detekcije od 110 TCID<sub>50</sub>/mL. Ovaj imunosenzor pokazao je obećavajući potencijal u kliničkoj primjeni. [34].

#### 2.1.17 Primjer određivanja virusa boginja šljive

Impedimetrijski imunosenzor koristi se za otkrivanje virusa boginja šljive u biljnim ekstraktima. Senzor se temelji na zlatnim elektrodama modificiranim sa: 1,6-heksanditiolom, nanočesticama zlata, anti-PPV IgG poliklonskim antitijelima i BSA. Upotrijebljen je za određivanje virusa u ekstraktima lišća šljive (*Prunus domestica*) i duhana (*Nicotiana benthamiana*). Predloženi impedimetrijski imunosenzor pokazao je vrlo dobru granicu detekcije od 10 pg/mL i širok dinamički raspon od 10 pg PPV/ml do 200 pg/ml primjenom elektrokemijske impedancijske spektroskopije. Prisutnost ekstrakata iz biljnih materijala nema utjecaja na odgovor imunosenzora. Imunosenzor je mogao razlikovati uzorke zdravih biljaka i uzorke koji sadrže 0,01% ekstrakta iz zaražene biljne materije. Dodatno su istraženi i uvjeti za regeneraciju, odnosno ovako razvijen imunosenzor nije isključivo za jednokratnu upotrebu. [35].

## 1.2 Biosenzor za SARS-COVID-19

*Koronavirusi* su nekoliko puta pogodili čovječanstvo i prouzročili gubitke života i veliki udar ekonomiji pojedincima i vladama.

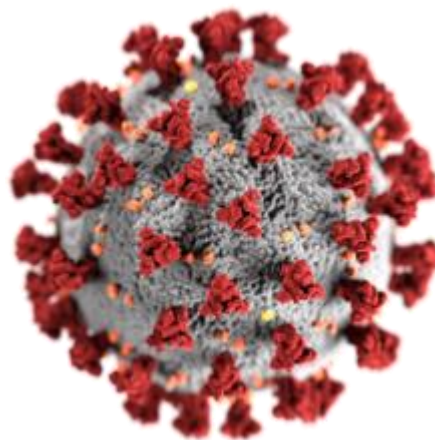
Naziv "koronavirus" dolazi od latinske riječi *corona*, čije je značenje "kruna" ili "aureola", a odnosi se na karakteristični izgled virusnih čestica (viriona): imaju obod koji podsjeća na krunu ili koronu Sunca (Slika 12).

Koronavirusi (latinski: *Orthocoronavirinae*, *Coronavirinae*) su skupina virusa koji uzrokuju bolesti kod sisavaca i ptica. Virusi kod ljudi uzrokuju respiratorne infekcije, poput prehlade, koje su obično blage.

Poznato je više ljudskih koronavirusa:

- Ljudski koronavirus 229E (HCoV-229E)
- Ljudski koronavirus OC43 (HCoV-OC43)
- SARS-CoV
- Ljudski koronavirus NL63 (HCoV-NL63, koronavirus New Haven)
- Ljudski koronavirus HKU1
- MERS-CoV
- SARS-CoV-2

Rjeđi oblici, poput SARS-a, MERS-a i bolesti COVID-19, mogu biti smrtonosni. Koronavirusi su virusi iz potporodice *Orthocoronavirinae*, porodice *Coronaviridae* i reda *Nidovirales*. Obavijeni su jednolančanim, pozitivno usmjerenim RNA genomom i spiralno simetričnim nukleokapsidom. Veličina genoma je između 26 i 32 kilobaze – najveća za neki RNA virus. [36].



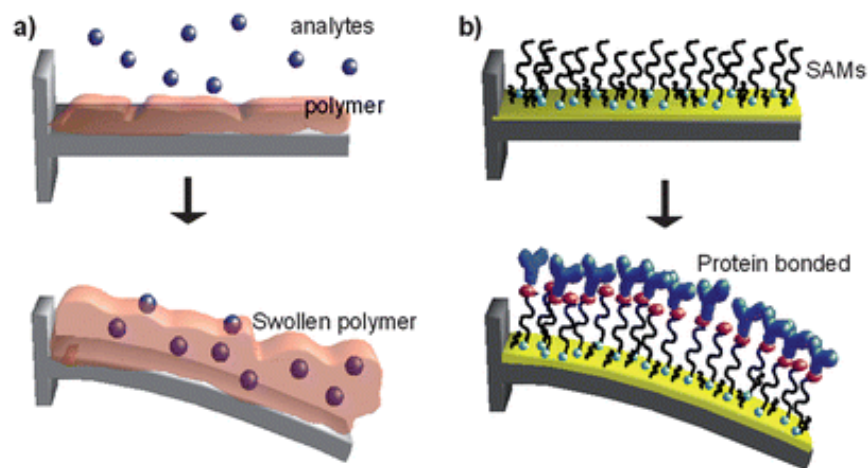
*Slika 12. 2019-nCoV virion [36].*



Za kontroliranje i suzbijanje epidemije koronavirusima, potraga za dizajniranjem i razvojem pametnih brzih senzora bila je neophodna. Ti su se senzori pojavili kao jedno od potencijalnih rješenja za pružanje isplative i brze dijagnostike SARS i MERS infekcija, koji su također uzrokovani koronavirusima prije desetak godina. S vremenom se sistematski nastojalo napraviti takve senzore učinkovitijima uvođenjem minijaturizacije i nanotehnologije. Uvođenje nanotehnologije omogućuje vrlo osjetljivo SARS i MERS određivanje. Uz to, minijaturizacija čini ove senzore pogodne za primjenu na terenu za dijagnostiku. [37].

Do danas su dobro razvijene i prihvaćene metode određivanja SARS-a i MERS-a uz pomoć nanotehnologije i elektrokemijskih tehnika, pa se ozbiljno pristupa načinima za razvijanje učinkovite i djelotvorne elektrokemijske i optičke primjene nanobiosenzora SOS-CoV-2. Jedno takvo istraživanje s aspekta primjene elektrokemijskih metoda uključuje razvoj senzora elektrokemijskim i kemijskim metodama, određivanje koncentracije virusa primjenom metoda pogodnih za niske koncentracije (DPV, SWV).

Jedan od primjera senzora za otkrivanje SARS-CoV-1 je zasnovan na tehnologiji mikrokatilenskih nizova (slika 13).



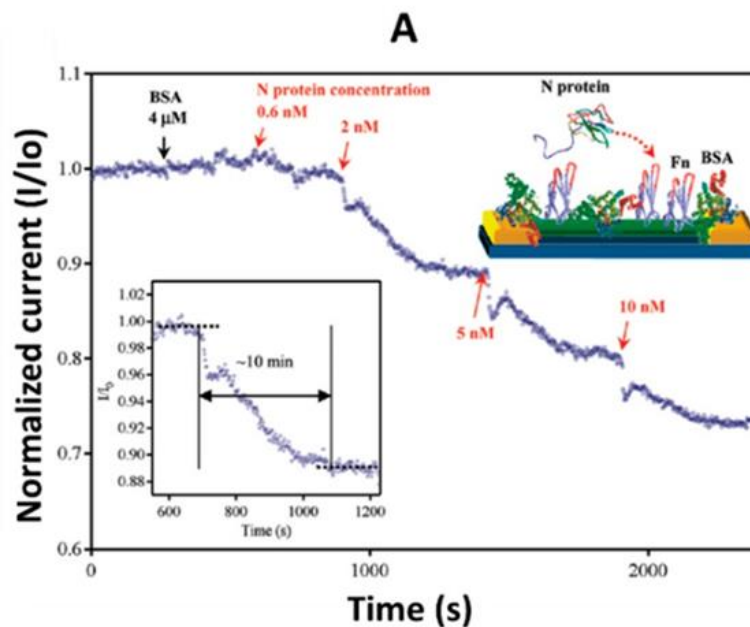
**Slika 13.** Princip rada mikrokatilenskih nizova [38].

Ovaj sustav je detektirao mačji koronavirus (FIP) virus tipa I pomoću vrlo specifičnog antivirusnog mačjeg koronavirusa (FIP) tipa I antiseruma. Da bi se potvrdila selektivnost na ciljani virus, nekoliko uzoraka koji ne sadrže virus također su korišteni kao negativni kontrolni uzorci. Kao rezultat, nisu dobiveni nikakvi mikrokatileni. Senzor je pokazao granicu određivanja od 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , uz vrijeme

određivanja manje od jednog sata. Ovaj senzor pokazao je potencijal da se koristi kao analitički alat za otkrivanje SARS-a, ali treba više studija povezanih s translacijskim pristupom za kliničku primjenu. [39].

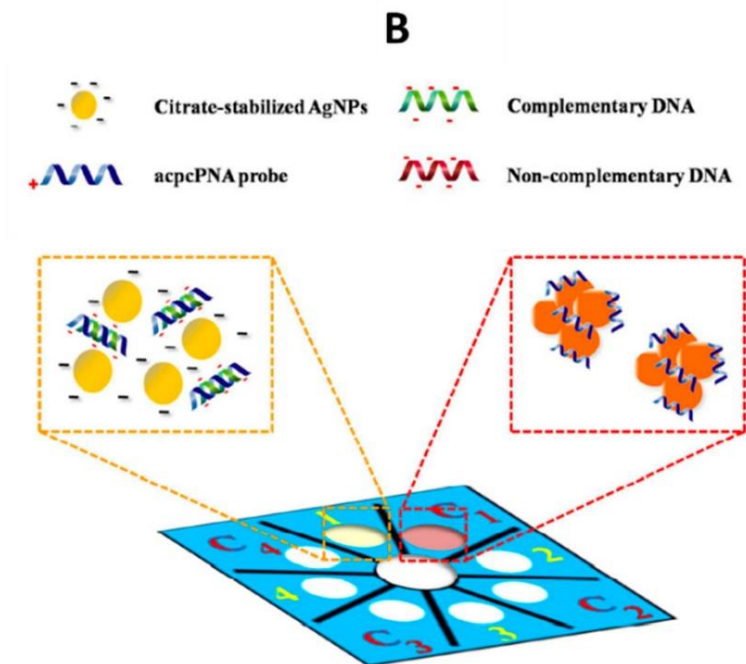
Da bi se poboljšale senzorske performanse, uloga nanoznanosti i nanotehnologije postala je jedna od najboljih rješenja za upravljanje COVID-19 selektivnim otkrivanjem proteina virusa. Imajući ove aspekte na umu, pri izradi biosenzora ispitivane su razne elektroaktivne pametne nanostrukture.

Jedan od primjera elektrokemijskog biosenzora je senzor na bazi proteina N-virusa SARS-a koji koristi protein koji oponaša antitijela. U ovom istraživanju,  $\text{In}_2\text{O}_3$  nano-žica je korištena kao platforma za imobilizaciju antitijela prilikom dizajn nano-biosenzora. [40].



*Slika 14. Detekcija SARS-a korištenjem nano-žica  $\text{In}_2\text{O}_3$  [40].*

$\text{In}_2\text{O}_3$  platforma za biosenzor dodatno je modificirana fibronektinom za selektivno otkrivanje nukleokapsidnog proteina SARS-a u koncentracijskom području u nM. Testiranje ovako razvijenog senzora moguće je koristeći stvarne uzorke i biološki složene sustave koji uključuju antitijela, antigene proteina, lipide i oligonukleotide. Daljnji razvoj ovog tipa biosenzora uključuje razvijanje fluorescentnih i kolorimetrijskih testova za brzu dijagnostiku otkrivanja DNA i RNA. [40].

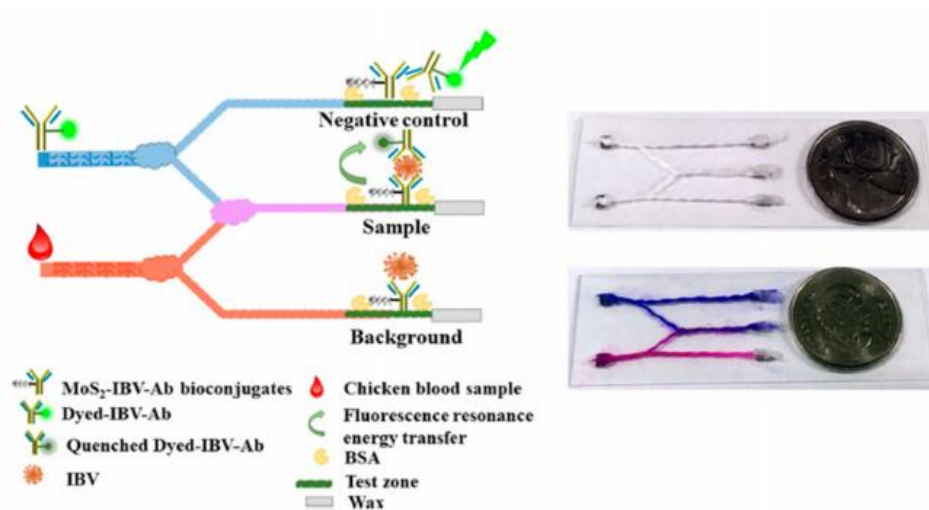


*Slika 15. Postupak izrade multipleksnih senzorskih čipova na papiru pomoću agregacije AgNP inducirane acpcPNA-om u prisutnosti komplementarnog i nekomplementarnog DNA [40].*

Jedan od primjera razvijenog kolorimetrijskog testa na papiru za otkrivanje DNA povezane s MERSCoV, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) i humanim papiloma virusom (HPV) prikazan je na Slici 15. Pozitivno nabijeni pirolidinil peptid nukleinske kiseline (acpcPNA) zbog vezivanja s C-krajem licina kao krajnjeg osjetilnog člana i nanočesticama srebra (NPAg) postavljen je na kromatografski papir. U prisutnosti ili odsutnosti ciljane DNA dolazi do promjene u boji nanočestica Ag. Takva kolorimetrijska DNA na bazi papira je pokazala dobru selektivnost senzora i nisku granicu detekcije, 1,53, 1,27 i 1,03 nM redom za MERS-CoV, MTB, odnosno HPV. Ovaj razvijen sustav smatra se kao jedna od potencijalnih zamjena dostupne vrhunske tehnologije zbog niskih troškova i detekcije kompleksne matrice, ali vjerojatno je da će ovaj senzor biti učinkovitiji ako se optimizira otkrivanje i ostalih virusa iste kategorije kao ebole, zike i drugih koronavirusa. [40].

Drugi primjer razvoja fluorescentnog biosenzora je 2D nanomolibden disulfid za otkrivanje virusa zaraznog bronhitisa (IBV). IBV je ptičji koronavirus koji utječe na sposobnost nošenja jaja ptica koje se uzgajaju zbog mesa uzrokujući znatan ekonomski gubitak u industriji peradi. Fluorescentna nanostruktura ovog imunosenzora proizvedena je primjenom selektivnog antitijela za otkrivanje IBV. Ovaj fleksibilni optički senzor proizveden je na jeftinoj mikrofluidnoj bazi od pamučnih mnogostrukih

niti, izveden je na osnovi fluorescentne rezonancije prijenosa energije (FRET) između nanosustava i fluorescentne boje tijekom stvaranja Ab-antigena imuno-kompleksnom formacijom (slika 16). Optimizirani su radni uvjeti IBV osjetljivosti, a senzor je pokazao osjetljivost od  $4,6 \times 10^{-2} EID_{50}/mL$ , s granicom određivanja od  $10^2$  do  $10^6 EID_{50}/mL$ .



**Slika 12.** Shematski prikaz imunosenzora koji selektivno detektira IBV [40].

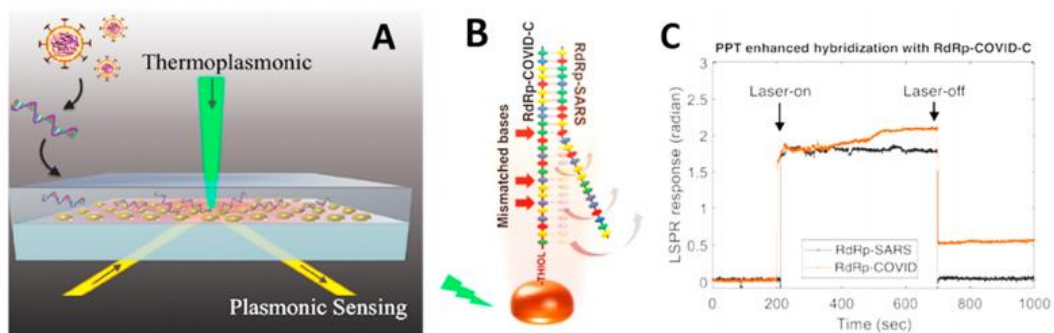
Nadalje, ovaj je senzor bio testiran na stvarnom uzorku pilećeg seruma koji dokazuje djelotvornost primjene u uzgoja peradi. Međutim, ovaj senzor nije dizajniran za otkrivanje koronavirusa s obzirom na aplikacije za bolesti i dijagnostiku kod ljudi. [40].

Dokazano je da je virus SARS-CoV-2 mutirao i ima brojne sojeve u kategorijama s obzirom na zemlju, regiju, rasu, dob, itd. Dakle, istraživanje aspekata nanobiotehnologije za istraživanje minijaturiziranih dijagnostičkih sustava selektivne detekcije SARS-CoV-2 je ključna komponenta za upravljanje COVID-19-om.

U ovom smjeru, dizajniran je test bočnog protoka koristeći specifični gen CRISPR-Cas12, za otkrivanje proteina virusa SARS-CoV-2 selektivno u periodu od 40 minuta. Ovaj minijturni biološki test detekcije poznate koncentracije proteina SARS-CoV-2 (1-5 fM) pomoću brisa ekstrakata respiratorne RNA proveden je na 36 osoba zaraženih virusom COVID-19 i 42 drugih osoba zaraženih drugim virusom. Test temeljen na CRISPR-u pokazao je osjetljivost na niskoj razini (10 jedinica virusa/ $\mu L$ ) i brže otkrivanje SARS-CoV-2 od odobrenog RT-PCR test u stvarnom vremenu s 95% selektivnosti (100% negativnošću kod pacijenata koji nisu zaraženi virusom COVID-19. Dizajn zasnovan na CRISPR-u genu cas-12 pruža selektivnost, prenosiv je i

jednostavan. Međutim, postoje značajne poteškoće u pakiranju biosenzora i opremi za određivanje, pa se intenzivno radi na automatiziranom uzorkovanju i ispitivanju. za dijagnostiku i kliničku primjenu.

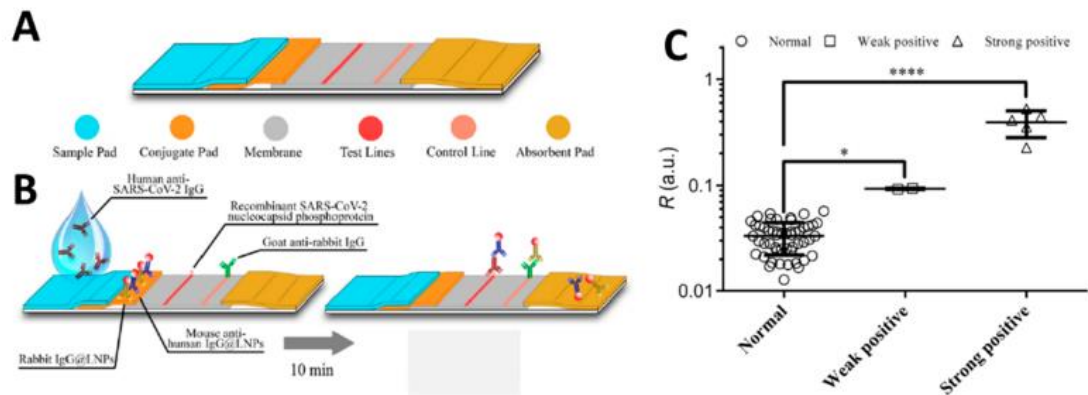
U tom smjeru, razvijen je dvostruko funkcionalni plazmsonski senzor gena SARS-CoV-2, koji funkcionira na temelju kombiniranih značajki sustava plazmsonskog fototermalnog (PPT) efekta i lokalizirane površine transdukcije na osnovi plazmsonske rezonancije (LSPR). Takav kombinirani senzorski pristup bio je koristan za postizanje selektivnosti koja je poželjna za dijagnostiku virusa COVID-19 pri kliničkoj primjeni. U ovom istraživanju 2D nanostruktura zlata, koja se koristi kao plazmsonska platforma, funkcionalizirana s komplementarnim DNA za otkrivanje određenog slijeda SARS-CoV-2, zasnovana je na konceptu hibridizacije gena. Ovaj senzor ima nisku granicu određivanja, 0,22 pM i vrlo je selektivan prema SARS-CoV2 čak i u multigenskoj smjesi (Slika 17). Takvi su sustavi novi i prije toga trebaju studije koje ih validiraju, predlažući njihovu primjenu kao potencijalni alat COVID-19 dijagnostike. [40].



**Slika 13.** (A) Biosenzor na osnovi plazme i fototermike za odabrane virusne sekvence za otkrivanje SARS-CoV-2 (B) 2D nano Au koji služi kao imobilizirajuća platforma za formuliranje tiol-cDNA liganda (C) Praćenje AuNI odgovora u stvarnom vremenu na dodavanje 0,1 nmol cDNA uz jasno razlikovanje dvije povezane i slične sekvence [40].

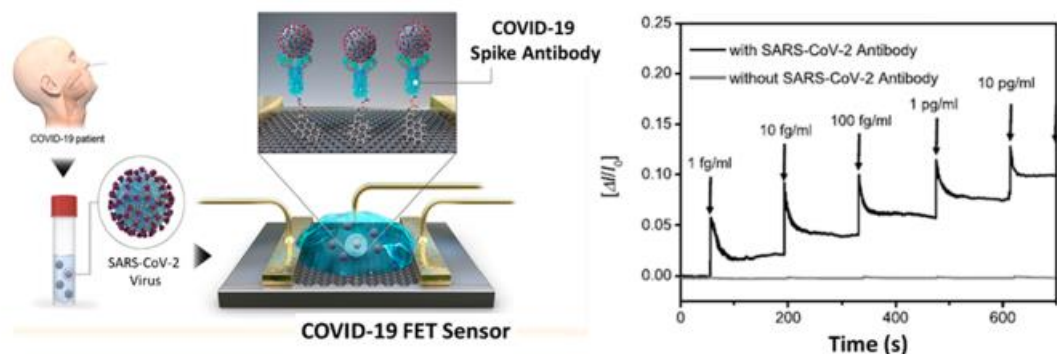
Imunološki test s bočnim protokom (LFIA) izrađen je pomoću polistirenskog nanosustava dopiranog lantanoidom, je brz, traje 10 minuta. Osjetljivi biološki test razvijan je za otkrivanje anti-SARS-CoV-2 IgG protutijela za dijagnozu COVID-19 u ljudskom serumu. Nitrocelulozna membrana bila je korištena za hvatanje IgG A kroz rekombinantni nukleokapsid fosfoprotein SARS-CoV-2. Da bi se klinički primijenio, provedeno je i testiranje na 12 uzoraka pacijenata zaraženih virusom COVID-19 i 51 nezaraženim uzorkom. Rezultati dobiveni ovim uređajem potvrđeni su pomoću

RTPCR-a, a ishodi obje tehnike dobro su se podudarali. Ova dijagnostička metodologija detektiranja virusa COVID-19 zadovoljava kliničke izazove te je selektivna, isplativa i lakoprenosiva za terenska mjerenja. [40].



**Slika 14.** (A, B) Prikazi biološkog LTR (Long Terminal Rept) ispitivanja na osnovi protoka za selektivno otkrivanje SARS-CoV-2 (C) Prikaz uspješnog razlikovanja uzoraka (51 nezaraženih i 7 zaraženih) prilikom korištenja bioloških testova [40].

Razvoj, konstrukcija i način primjene grafena za izradu biosenzora na bazi tranzistora upravljanim električnim poljem (Field-effect transistor - FET-a) za brzo otkrivanje SARS-CoV-2 proteina u nazofarinksu dan je na slici 19.



**Slika 19.** Shematski prikaz grafenskog FET-SARS-CoV-2 biosenzora [40].

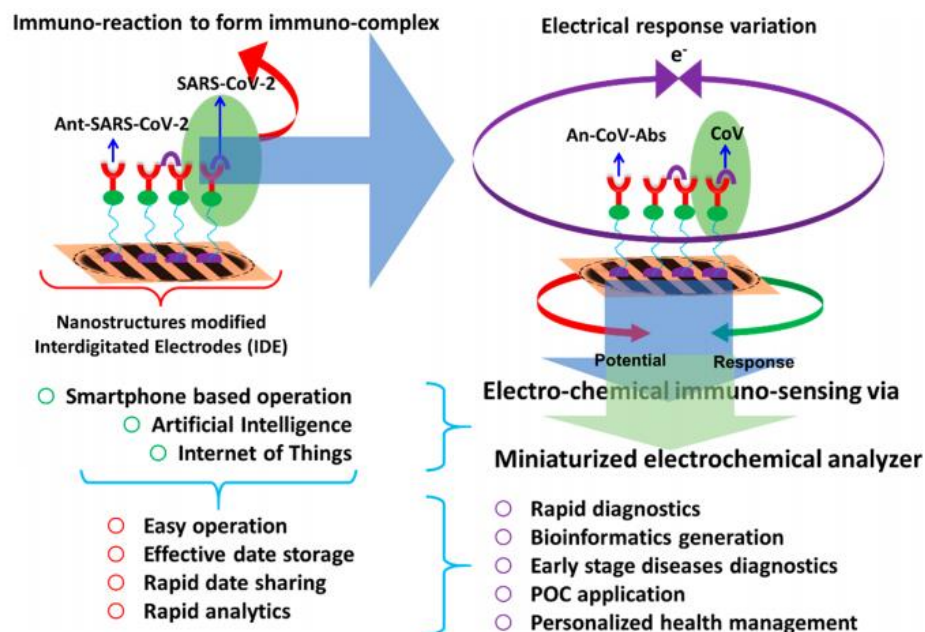
U ovom istraživanju, tanka grafenska ploča korištena je kao polazni materijal za dizajn FET-a i specifično antitijelo proteina SARS-CoV-2 za postizanje selektivnosti u dijagnostici COVID-19. Takav električni SARS-CoV-2 senzor na bazi FET-a pokazao je granicu određivanja od 1 fg/mL u fiziološkoj otopini s dodatkom fosfatnog pufera (100 fg/mL) i iona posrednika u transportu. Štoviše, ovaj je senzor pokazao granicu određivanja od  $1,6 \times 10^1$  PFU/ml upotrebom poznate koncentracije proteina virusa i

$2,42 \times 10^2$  jedinica/mL u kliničkim uzorcima. Kao jedna od glavnih prednosti, COVID-19 dijagnostika pomoću ovakvog biosenzora je da ne zahtijeva nikakvu prethodnu obradu i izoliranje virusa ili matrice. Međutim, preporučena je provjera valjanosti, odnosno standardizacija ovog senzora prije primjene u bolničkim ustanovama. Ovakav minijaturizirani biosenzor je pokazao značajan doprinos na polju razvoja pametne dijagnostike virusa COVID-19 putem osjetljivog i selektivnog otkrivanja SARS-CoV-2. [40].

Iz svega navedenog vidimo da zbog napretka u znanosti o pametnim materijalima i mikrofluidnim sustavima, elektrokemijski biosenzori mogu otkriti ciljani analit na razinama pikomola za upravljanje zaraznim bolestima uzrokovanim epidemijom. Imajući ove aspekte na umu, te na temelju razvoja elektrokemijskog senzora za zika virus stručnjaci su namjeravali razviti biosenzore koji mogu otkriti SARS-CoV-2 na pikomolarnoj razinu čak i kod primjene POC (*point of care*) metode.

Razvijanjem elektrokemijskog SARS-CoV-2 biosenzora, preporučeno je usvojiti i optimizirati pristup. Stalni naponi na razvoju biomarkera za optimizaciju patogeneze i prepoznavanja proteina SARS-CoV-2 također su zahtijevali razvoj metoda za izoliranje antitijela u cilju postizanje selektivnosti. Takva razvijena antitijela mogu biti korisna za razvoj elektrokemijskog imunosenzora za selektivno otkrivanje SARS-CoV2 u stvarnim uzorcima. Također se preporučuje istraživanje čipa za jednokratnu detekciju, što je isplativo i ne zahtijeva sofisticiranu opremu za skladištenje. Da bi takav senzor bio učinkovitiji, podloga modificirana nanočesticama ili višeslojne elektrode se također preporučuju za pojačavanje signala za postizanje niske granice određivanja i širokog raspona osjetljivosti.

Takav SARS-CoV-2 senzorski čip može se integrirati s minijaturiziranim potencijalostatom povezanim sa pametnim telefonom za izvođenje dijagnostike COVID-19 na licu mjesta. Umrežavanje u globalnom smislu putem pametnog telefona bit će jako korisno za obavljanje dijagnostike na mjestu pojave i širenja zaraze, putem POC aplikacija. [40].



*Slika 20. Shematski prikaz elektrokemijskog imunosenziranja SARS-CoV-2 u fiziološkom rasponu. Povezivanje osjetljive pametne SARS-CoV-2 senzorske platforme sa mikroelektronskim i AI-podržanim IoT-om za brzu i selektivnu COVID-19 dijagnostiku potrebnu za upravljanje pandemijom, imajući u fokusu personaliziranu i inteligentnu zdravstvenu zaštitu [40].*

Ovaj pristup je također vrlo koristan za brzu analizu podataka, sigurno pohranjivanje podataka i daljinsko dijeljenje podataka s zdravstvenim stručnjacima. Internet će ubrzati dijagnostiku i pomoći u optimiziranju terapije na više razina liječenja

Uvođenjem IoT-a (*Internet of Things*) će se upravljati proizvodnjom i osiguravanjem bioinformatike koja je potrebna za AI (*Artificial intelligence*) analizu optimiziranih odnosa između razine proteina SARS-CoV-2 s pojedinačnom patogenezom. Ovi ishodi će zasigurno biti korisni za istraživanje najbolje terapije prema genomskom profilu pacijenta. [40].



### 3. ZAKLJUČAK

Primjeri dani u ovom preglednom radu opisuju nedavni razvoj u proizvodnji i primjeni elektrokemijskih biosenzora za otkrivanje virusa.

Iz prikazanog možemo zaključiti kako su elektrokemijske metode za rano otkrivanje virusnih vrsta i drugih patoloških stanja važne zbog niza prednosti u odnosu na konvencionalne metode kao što su:

- + jednostavna izrada,
- + minijaturizacija opreme,
- + prenosivost, raspoloživost,
- + brza provedba analize,
- + rad s malom količinom uzorka,
- + selektivnosti, osjetljivosti,
- + široki dinamički raspon mjerenja,
- + analize u stvarnom vremenu,
- + nema potrebe za otrovnim bojama, agresivnim i otrovnim otapalima
- + potrebna instrumentacija nije skupa kao kod konvencionalnih metoda

U današnje vrijeme različiti nanomaterijali poput nanočestica zlata, ugljičnih nanomaterijala, magnetskih nanočestica ili magnetskih zrnaca, kvantnih točaka i hibridnih nanostrukture koriste se za proizvodnju biosenzora kako bi se poboljšala njihova osjetljivost i stabilnost. Također, mikromreže integrirane s mikrofluidnim sustavima obično omogućuju jeftinu izradu i istodobno otkrivanje virusa.

Iako elektrokemijski biosenzori pokazuju obećavajuće značajke, neke od opisanih biosenzora treba provjeriti s stvarnim uzorcima. Integriranje nanotehnologije posebno bi omogućilo da minijaturni uređaji budu dostupni na mjestu potrebe.

Nedavno su pitanja povezana sa zdravljem i sigurnošću zbog patogenih infekcija izazvala zabrinutost vezano sa njihovom identifikacijom i prevencijom. U takvim slučajevima otkrivanje patogena ima ključnu ulogu, te su istraživači bili aktivni u svojim naporima za razvoj i usavršavanje brze metode identifikacije i kvantifikacije, jer tradicionalnim metodama treba 7-8 dana za konačne rezultate.

U praksi, procjenu dijagnoze pacijenta vrši ovlaštena osoba, koja se obično u velikoj mjeri oslanja na simptome pacijenta i prevalenciju određene uobičajene bolesti/ infekcije unutar zajednice. Ova dijagnoza sama po sebi u mnogim slučajevima uzrokuje

nepotrebnu upotrebu antibiotika. Štoviše, date doze antibiotika ili antivirusnih lijekova nisu u korelaciji sa stvarnim intenzitetom infekcije, jer infekcija nije potvrđena niti kvantificirana (npr. koncentracija bakterija u krvi ili mokraći).

Stoga postoji praktična potreba za jednostavnim, isplativim uređajem za detekciju koji može u stvarnom vremenu selektivno otkriti postojanje virusa, a poželjna je i kvantifikacija koncentracije vrste. Dani primjeri pokazuju korak prema ovom cilju i da se korištenjem komercijalno dostupnih elektrokemijskih alata može brzo postići otkrivanje pojedinih virusa.

Kombinacija biologije s kemijom, tehnologijom i znanostima o materijalima mogla bi se koristiti i za razvoj senzora za jednokratnu upotrebu za brzo otkrivanje SARS-COV-19 virusa koji je izazvao pandemiju širom svijeta.

#### 4. LITERATURA

1. M. Pavlica, *Mrežni udžbenik iz genetike*, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, **2012**, 13. <http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl13.html>
2. S. Ljubin Sternak, *Suvremena dijagnostika virusnih infekcija dišnog sustava*. Nastavni Zavod za javno zdravstvo „Dr Andrija Štampar”, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, **2016**, 6.  
[https://stampar.hr/sites/default/files/Projekti/ljubin\\_sternak\\_-\\_suvremena\\_dg.pdf](https://stampar.hr/sites/default/files/Projekti/ljubin_sternak_-_suvremena_dg.pdf)
3. S. I. Kaya, L. Karadurmus, G. Ozcelikay, N. K. Bakirhan, S. A. Ozkan, *Nanosensors for Smart Cities*, **2020**, 303-326. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819870-4.00017-7>
4. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, **2020**. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=65300>
5. I. Piljac, *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*, **2010**, 400, 424.
6. B. Grahovac, *Molekularne metode u patologiji*, Medicinski Fakultet Sveučilišta u Rijeci, **2009**, 18.  
[https://www.medri.uniri.hr/files/NASTAVA/PATOLOGIJA/NASTAVNO\\_GRADIVO/Molekularne\\_metode\\_u\\_patologiji.pdf](https://www.medri.uniri.hr/files/NASTAVA/PATOLOGIJA/NASTAVNO_GRADIVO/Molekularne_metode_u_patologiji.pdf)
7. [https://hr.wikipedia.org/wiki/Lan%C4%8Dana\\_reakcija\\_polimeraze\\_\(7.4.2021\)](https://hr.wikipedia.org/wiki/Lan%C4%8Dana_reakcija_polimeraze_(7.4.2021))
8. J. L. Brunelle, R. Green. *Academic Press*, **2014**, 541, 151.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4>
9. K. Siuzdak, P. Niedziałkowski, M. Sobaszek, T. Łega, M. Sawczak, E. Czaczyk, et al. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2019**, 280, 263.  
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.10.005>.
10. Z. Gao, Y. Li, X. Zhang, J. Feng, L. Kong, P. Wang, et al. *Biosens. Bioelectron*, **2018**, 102, 189. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.032>.
11. C. Singhal, A. Dubey, A. Mathur, C. S. Pundir, J. Narang. *Process Biochemistry* **2018**, 74, 35. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.08.020>.
12. D. A. Oliveira, J. V. Silva, J. M. R. Flauzino, A.C.H. Castro, A.C.R. Moc, o, M.M.C.N. Soares, et al. *Analytical Biochemistry* **2018**, 549, 157.  
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.03.023>
13. Q. Xiang, J. Huang, H. Huang, W. Mao, Z. Ye. *RSC Advances*, **2018**, 4.  
<https://doi.org/10.1039/c7ra11945c>.
14. M. Shariati, M. Ghorbani, P. Sasanpour, A. Karimizefreh. *Analytica Chimica Acta*, **2018**, 1048, 31. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.09.062>.

15. C. Liu, J. Dong, G. I. N. Waterhouse, Z. Cheng, S. Ai, *Biosens. Bioelectron.* 101, 110, 115. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29055192/>
16. A. J. Bandodkar, J. Wang, *Trends Biotechnol.* **2014**, 363.
17. <https://www.nature.com/articles/s41467-021-21121-7.pdf>
18. A. D. Chowdhury, K. Takemura, T. C. Li. et al. *Nat. Commun.* **2019**, 10, 3737. <https://www.nature.com/articles/s41467-019-11644-5#citeas>
19. Y. Zhang, Y. Gao, X. Zhang, H. Wang, T. Xia, C. Bian. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2019**, 294. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.12.157>
20. Z. Yang, Y. Zhuo, R. Yuan, Y. Chai. *Biosensors and Bioelectronics*, **2015**, 78, 321. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.10.073>
21. D. Tran, B. H. Nguyen, N. Van Hieu, H. V. Tran, H. Le Nguyen, P. X. Nguyen. *Materials Science and Engineering: C* **2011**, 31,2, 477. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2010.11.007>
22. G. Cabral-Miranda, A.R. Cardoso, L.C.S. Ferreira, M.G.F. Sales, M.F. Bachmann. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, 113, 101. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.04.058>
23. M. Khater, A. de la Escosura-Mun˜iz, D. Quesada-Gonzalez, A. Merkoç, *Anal. Chem. Acta*, **2018**, 1046, 123-131. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.09.031>
24. T. Lee, S. Y. Park, H. Jang, G. H. Kim, C. Park, M. Mohammadniaei, et al. *Materials Science and Engineering: C* **2019**, 99, 511. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.001>
25. Y. H. Hou, J. J. Wang, Y. Z. Jiang, C. Lv, L. Xia, S. L. Hong, et al. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, 99, 182. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.07.035>
26. M. A. Tahir, S. Z. Bajwa, S. Mansoor, R. W. Briddon, W. S. Khan, B. E. Scheffler, et al. *J. Hazard. Mater.* **2018**, 346, 27. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.12.007>
27. H. Tu, K. Lin, Y. Lun, L. Yu. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, 3661. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1055-1>
28. F. Chekin, K. Bagga, P. Subramanian, R. Jijie, S. K. Singh, S. Kurungot, et al. *Sens. Actuators B: Chem.* **2018**, 262, 992. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.02.065>
29. A. Natarajan, K. S. S. Devi, S. Raja, A. Senthil Kumar. *Sci. Rep.*, **2017**, 7, 46169. <https://doi.org/10.1038/srep46169>
30. K. Navakul, C. Warakulwit, Pa-thai Yenchitsomanus, A. Panya, P. A. Lieberzeit, C. Sangma. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2017**, 549. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.08.009>

31. X. G. Eng, F. Z. Hang, Q. G. Ao, Y. L. Ei. *Anal. Sci*, **2017**, 1105.  
<https://doi.org/10.2116/analsci.32.1105>
32. A. Attar, J. Mandli, M. M. Ennaji, A. Amine. *Electroanalysis*, **2016**, 1839.  
<https://doi.org/10.1002/elan.201600179>
33. X. Wang, L. Wang, W. Yang, S. Ai. *Sens. Actuators B: Chem.*, **2014**, 194, 276.  
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.12.068>
34. U. Jarocka, M. Wasowicz, H. Radecka, T. Malinowski, L. Michalczyk, J. Radecki,  
*Electroanalysis*, **2011**, 2197. <https://doi.org/10.1002/elan.201100152>
35. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Koronavirus>
36. A. Kaushik, A. Vasudev, S. K. Arya, S. K. Pasha, S. Bhansali. *Biosens. Bioelectron*,  
**2014**, 53, 499. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.09.060>
37. Alvarez, M., Lechuga L. M. *Analyst*, **2010**, 135, 827.  
<https://doi.org/10.1039/B908503N>
38. S. Velanki, H.-F. Ji, *Meas. Sci. Technol*, **2006**, 17, 2964.  
<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-0233/17/11/015>
39. A. K. Kaushik, J. S. Dhau, H. Gohel, Y. Ku. Mishra, B. Kateb, N-Y. Kim, D. Y.  
Goswami. *Applied Bio Materials*, **2020**, 3, 7306.  
<https://dx.doi.org/10.1021/acsabm.0c01004>