

## Závěr

- biosensory v praxi
- perspektivy

### Klinická oblast

- in vitro stanovení prováděná v centralizovaných nemocničních laboratořích
- decentralizované uplatnění biosenzorů zahrnuje ordinaci lékaře, nemocniční pokoje, operační sály
- aplikace určené široké veřejnosti budou limitovány, výjimkou jsou osobní glukometry diabetiků a těhotenské testy
- velký potenciál pro tzv. „welfare“ oblast – stárnoucí populace se bude více zajímat o zdravotní stav – preventivní kontroly a měření
- in vivo aplikace jsou směřovány především na výzkum umělého endokrinního pankreatu



## Laboratorní klinické analyzátořy

přístroj	firma	glukosa + analyty
■ AUTOSTAT	Daiichi (Japonsko)	
■ EBIO Plus	Eppendorf / BST (Německo)	laktát, citrát, vit. C
■ Enzymat	Seres (Francie)	sacharóza, alkohol
■ ESAT	PGW Medingen (Německo)	laktát
■ EXSAN	(Litva)	laktát
■ GLUCO	Fuji Electric (Japonsko)	
■ i-Stat	I-Stat Corp. (USA)	močovina
■ Model 860	Ciba Corning (USA)	
■ NOVA 16	Nova Biomedical (USA)	močovina, kreatinin
■ Satellite G	MediSense (USA)	
■ YSI SELECT	Yellow Springs Instr. (USA)	laktát, etanol, cholin

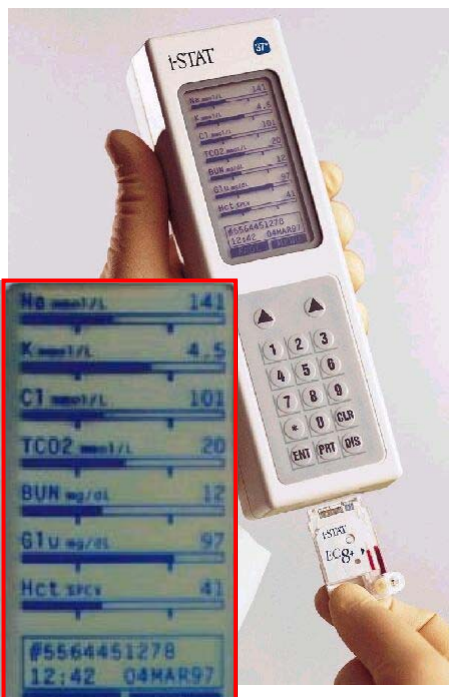
Většinou se jedná o malé stolní přístroje, často doplněné zásobníkem vzorků

## I-STAT

- předpoklad: analýza vzorků v místě jejich odběru (operační sál, lůžko pacienta) může podstatným způsobem zkrátit dobu do získání výsledků
- lze tedy urychleně provést kroky vedoucí ke zlepšení stavu pacienta
- decentralizované měření
- multikanálový elektrochemický biosensor, poskytující informace o klíčových látkách, analyzovaných při krizových situacích pacientů
- základní modul na jedno použití obsahuje měřicí sensory, zásobní roztok standardu a prostor pro nakápnutí vzorku krve

## i-STAT - měřicí modul

- **analyty:** sodík, draslík, chloridy, oxid uhličitý, pH, močovina, glukóza a hematokrit
- program pak dopočítává další parametry jako např. koncentrace hemoglobinu, přebytek bázi a podobně.



## i-STAT

- po nakápnutí vzorku krve se měřicí modul zasune do přístroje
- vyčká se zobrazení výsledků
- měřicí modul je na jedno použití

## i-STAT - aplikace

- hlavní kritérium vývoje:
- minimalizovat možnost chyb způsobených uživatelem (pouze naplní otvor pro vzorek krve a zasune modul do přístroje)
- zaručit vysokou kvalitu výsledků (ve výměnné kartridži je inkorporován kalibrační roztok). V rukou uživatelů - lékařů a sester - přístroj poskytuje výsledky srovnatelné kvality jako centrální laboratoř.
- přístroj původně směřován pouze do nemocnic, objevuje se i v ordinacích praktických lékařů a veterinářů, dokonce ve vojenství a objevil se na palubě při letech raketoplánů.

## Někdy jsou biosensory příliš dobré...



- glukosový / laktátový sensor
  - přední měřící a zadní kontaktní pohled
- trvanlivost příliš dlouhá – potřeba omezit „životnost“
  - přidání obvodu počítajícího provedené analýzy,
  - po dosažení stanoveného počtu ukončení použitelnosti
  - integrovaný inkrementální čítač (1-wire counter)

## Ochrana životního prostředí

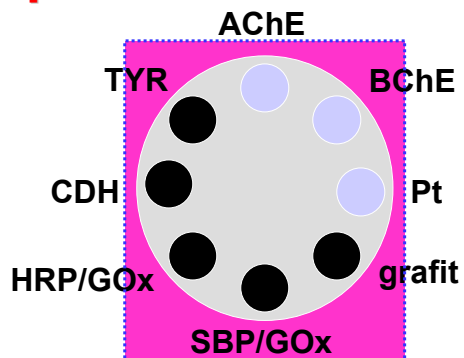
- sledování znečištění zdrojů pitné vody a vodních toků - monitorovací systémy
- přenosné systémy pro rychlou detekci škodlivin - analýza vzorku přímo v místě odběru
- rychlé stanovení biochemické spotřeby kyslíku (BOD)

## Biosensory pro životní prostředí

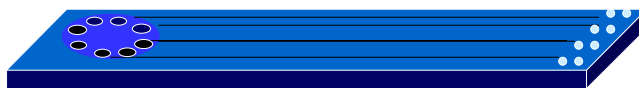
- monitorovací systémy založené na celých buňkách - schopné reagovat na přítomnost širokého spektra toxických látek
  - off-line systémy při laboratorní detekci jednotlivých škodlivin
  - vyvíjí se automatizované imunochemické systémy, schopné stanovit paralelně několik analytů
  - objevují se první imunosensory pro stanovení pesticidů
  - dlouhou tradici má rychlé biosensorové stanovení biologické spotřeby kyslíku (BOD), které zkracuje dobu analýzy na několik minut
  - BOD sensor založený na mikrobiální vrstvě byl vyráběn již od roku 1983 v Japonsku firmou Nisshin Electric
  - jistým problémem zůstává korelace BOD údaje z biosensoru s oficiálním parametrem BOD<sub>5</sub>, což komplikuje nedostatečná úprava legislativy
- |              |                     |           |
|--------------|---------------------|-----------|
| ■ ARAS       | Dr. Lange (Německo) | BOD       |
| ■ BOD-Module | Medingen (Německo)  | BOD       |
| ■ SmartSense | Ohmicron (USA)      | pesticidy |

## Multikanálový biosensor pro charakterizaci odpadních vod

- acetylcholinesterasa (AChE)
- butyrylcholinestea (BChE)
- tyrosinasa (Tyr)
- peroxidasy (HRP, SBP)
- celobiosa dehydrogenasa (CDH)
- glukosa oxidasa (GOX)



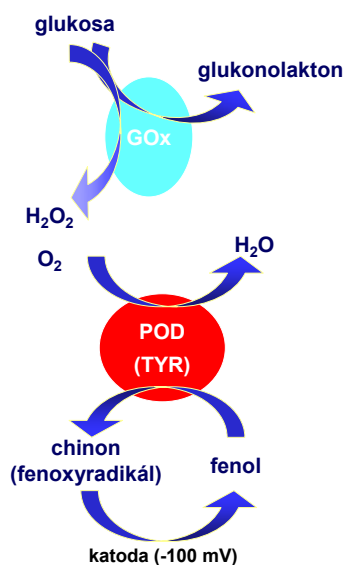
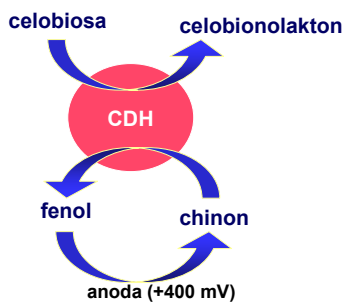
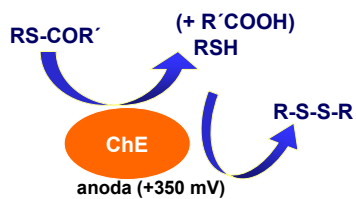
⇒ zesíťování glutaraldehydem



Pt / grafitové pracovní elektrody (7101)

5x1.2 cm

## Enzymové reakce



## Průmyslové vzorky

Odezvy přepočteny na koncentraci heptenofosu a katecholu

enzymy	Koncentrace (mg/l)									
	pesticid. průmysl		farmaceutický průmysl			papírenský průmysl				
	S01	S02	S03	S04	S05	S06	S07	S08	S09	S10
<b>AChE</b>	0	0.12	0.06	0.01	0.28	0.01	0	0.03	0.08	2.3
<b>BChE</b>	0	0	0.41	0.01	0.03	0.21	0	0	0.03	>10
<b>TYR</b>	0	0	1.1	1.1	0.7	0	0	0	0	0
<b>HRP</b>	0	0	2.9	6.1	2.9	0	0	0	5.3	7.7

## Odpadní vody

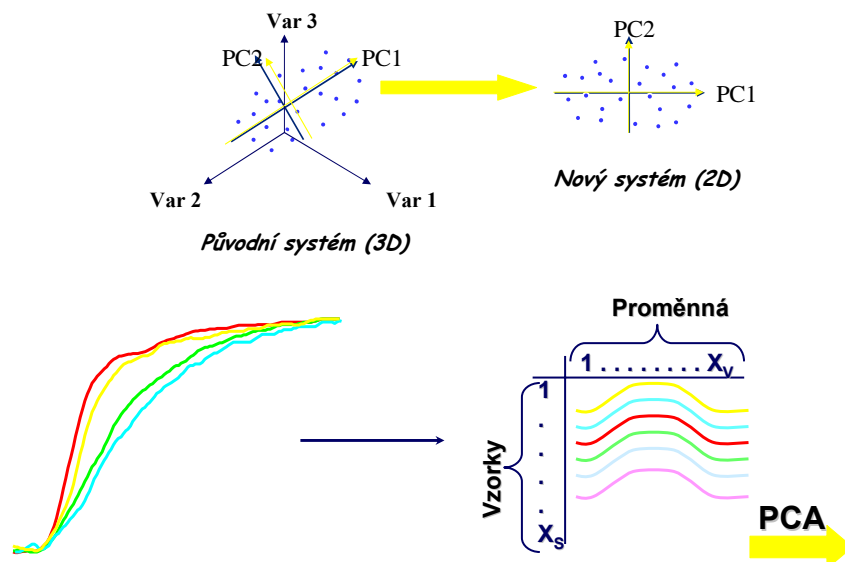
- vzorky obsahují pesticidy a fenoly
- relativní procentuální odezva je
  - stanovena jako odezva vzorku dělena
  - odezvou pro standard
- výsledky, které je obtížné zhodnotit
  - a porozumět jim



## MULTIVARIAČNÍ ANALÝZA

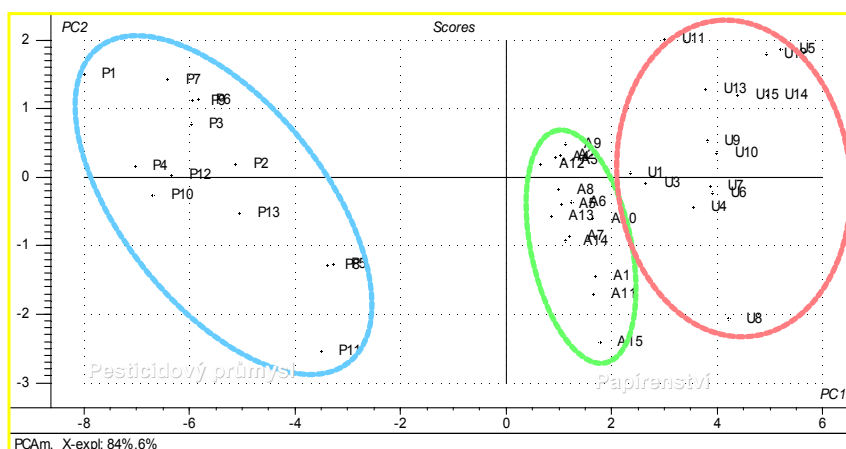
Vzorek	Relativní odezva (%)					
	CDH	HRP	SBP	TYR	AChE	BChE
A1	<1	2.2	86	<1	<1	<1
A2	<1	<1	<1	<1	<1	<1
A3	<1	<1	<1	<1	<1	<1
A4	<1	<1	<1	<1	<1	<1
A5	<1	<1	15	<1	<1	<1
A6	<1	6.9	19	<1	<1	<1
A7	<1	<1	34	<1	<1	<1
A8	<1	<1	<1	<1	<1	<1
A9	<1	<1	<1	<1	16	63
A10	15	9.6	17	<1	1.5	<1
A11	<1	4.3	9.4	<1	5.4	<1
A12	<1	<1	<1	<1	<1	<1
A13	<1	<1	12	<1	9.6	<1
A14	<1	<1	40	<1	6.3	<1
A15	<1	<1	13	<1	48	<1
U1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
U2	<1	40	57	6.7	<1	<1
U3	<1	44	24	<1	<1	<1
U4	<1	31	42	<1	<1	<1
U5	<1	<1	<1	250	<1	<1
U6	<1	47	36	<1	<1	<1
U7	<1	46	33	<1	<1	<1
U8	<1	377	<1	<1	<1	<1
U9	<1	25	<1	<1	<1	<1
U10	<1	32	86	<1	<1	<1
U11	<1	<1	<1	<1	<1	<1
U12	<1	<1	<1	198	<1	<1
U13	<1	<1	<1	<1	<1	<1
U14	<1	21	<1	37	<1	<1
U15	<1	10	<1	9.9	<1	<1
P1	<1	<1	<1	<1	29	100
P2	<1	<1	<1	<1	19	<1
P3	<1	<1	<1	<1	46	5.2
P4	<1	<1	<1	<1	100	<1
P5	<1	<1	<1	<1	<1	<1
P6	<1	<1	<1	<1	39	20
P7	<1	<1	<1	<1	29	9.5
P8	<1	<1	<1	<1	<1	<1
P9	<1	<1	<1	<1	38	100
P10	<1	<1	<1	<1	15	<1
P11	<1	<1	<1	<1	18	<1
P12	<1	<1	<1	<1	20	<1
P13	<1	<1	<1	<1	33	<1

## PCA (Principal Component Analysis) - Analýza hlavních komponent



## BIOSENSOR + PCA

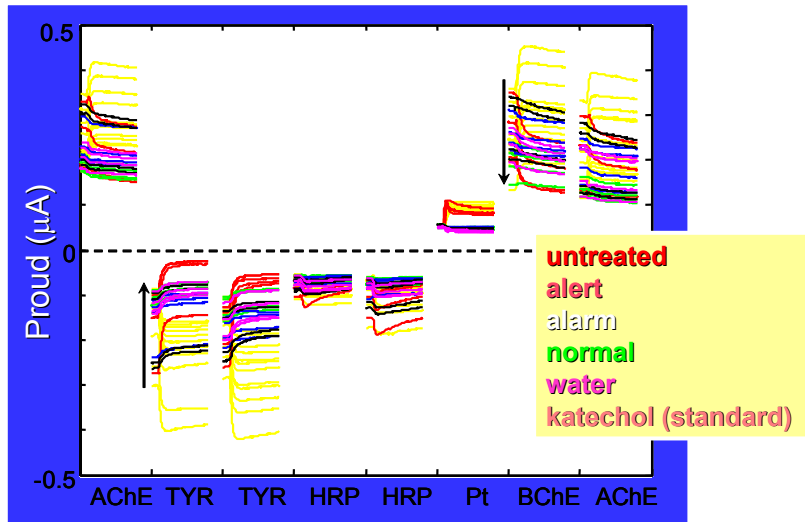
- Každý vzorek odpovídá 6830 proměnným detekovaným 6-enzymovým senzorem (každá elektrodová odezva je tvořena z 810 proměnným)
- PC1 – separace dle původu, PC2 – separace dle toxicity





## Vzorky rozdílné toxicity

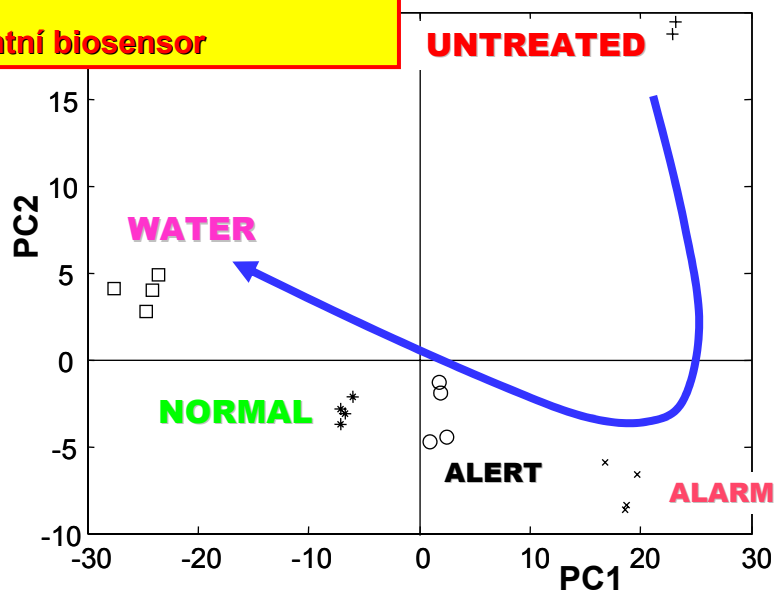
- odezvy 8-elektrodevého sensoru pro 32 vzorků (standard),  
100 proměnných (400 s)



kombinace sensorů s chemometrií (PCA)  
zjednodušuje interpretaci komplexních dat  
na uživatelsky přístupnější názornou formu

inteligentní biosensor

Zjednodušená  
klasifikace



## **Potravinářství, biotechnologické procesy**

- biosensorové systémy analyzující kontinuálně odebírané vzorky (on line) - návaznost na řídicí systémy
- stanovení sacharidů, některých vitamínů a detekce bakteriální kontaminace - kontrola čerstvosti potravin, kontrola obsahu cizorodých látek (rezidua antibiotik)
- kontrola kvality produktů - na základě hodnocení vůně („elektronický nos“) a chuti („elektronický jazyk“)

## **Vojenská oblast**

- detekce chemických otravných látek (sarin, soman, ...) - biosensory s cholinesterasou
- detekce biologických bojových prostředků - nutnost vysoké specifity stanovení (anthrax, botulin, ...) - imunosensory, přenosné systémy PCR, průtočná cytometrie
- obrana proti bioteroristickým útokům

## Detekce použití chemických zbraní

- chemické zbraně reprezentují bojové otravné látky ze skupiny nervově paralytických sloučenin jako sarin a soman
- inhibují cholinesterasu, což se také využívá v detekčních systémech na bázi biosensorů
- již mnoho let existuje detektor NAIAD od firmy Thorn EMI, využívající průběžnou elektrochemickou detekci aktivity imobilisované cholinesterasy
- miniaturizovaný biosensor tohoto typu pro osobní použití se vyvíjí také u nás
- zájem o tuto oblast výrazně stoupl po skončení války v Perském zálivu (1991), mimoto byl sarin použit teroristy při útoku na tokijské metro (1995)

**BioNA**

Biochemical  
Nerve Agent Detector



## BioNA

Biochemical  
Nerve Agent Detector

### Specifications

detectable agents:	type "G" and "V"
limit of detection in air:	1 ng/L
detection speed:	30 sec (15 sec at 10 ng/L)
detector:	electrochemical sensor with immobilized acetylcholinesterase
weight:	500 g
dimensions:	120 x 80 x 35 mm
power supply:	2 x 1.5 V batteries
working temperature:	5 - 40°C
warning signalization:	visual and acoustic

### Information

Military Technical Institute of Protection

P.O. Box 547

60200 Brno (Czech Rep.)

Tel.: +420-5-41183001

E-mail: vtuo\_chem@telecom.cz

## Detekce biologických zbraní

- biologické zbraně – zbraně hromadného ničení „chudých“ zemí
- jsou předmětem zájmu v souvislosti se situací v Iráku, kde bývalý režim vlastnil zásoby různých bakteriologických zbraní a toxinů
- mimo vojenskou oblast existuje značná obava z teroristického zneužití, protože jejich příprava je ve srovnání s jinými zbraněmi hromadného ničení velmi snadná – obavy z anthraxu

## BBP: toxiny

- Abrin - rostlina *Abrus precatorius*
- Aflatoxiny - plísně *Aspergillus flavus* a *parasiticus*
- Batrachotoxin - kolumbijská žába *Phyllobates aurotaenia*
- Botulotoxin A - bakterie *Clostridium botulinum*
- *Clostridium perfringens* toxin
- *Corynebacterium diphtheriae* toxin
- Microcystiny (Cyanginosiny) - modrozelená sinice *Microcystis aeruginosa*
- Palytoxin - zoanthidní korál genus *Palythoa*
- Ricin - rostlina castor bean *Ricinus communis*
- Saxitoxin - dinoflagelata *Gonydulax (Ganyaulax) catenalla* a *tamarensis*
- Shigatoxiny (Vero cytotoxiny) - bakterie *Escherichia coli* EHEC
- S. dysenteria toxin - bakterie *Shigella dysenteriae*
- Staph. Enterotoxin - bakterie *Staphylococcus aureus*

## BBP: víry

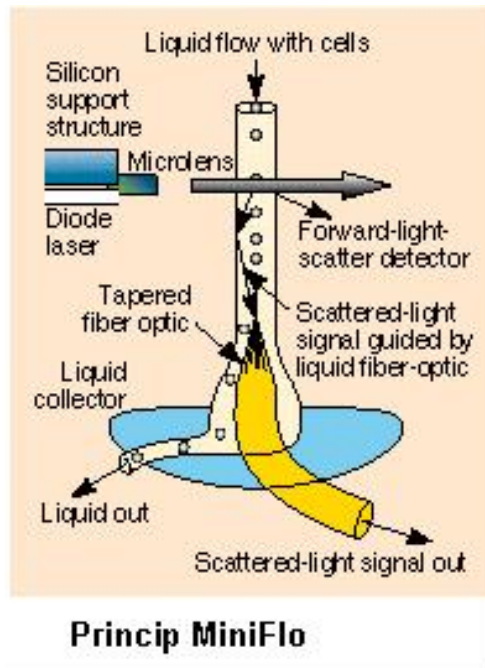
- Argentinská hemorhagická horečka (AHF)
- Bolivijská hemorhagická horečka (Machupo)
- Dengue, Ebola, Hanta, Chikengunya, Japonská encefalitida, Junin
- Krymsko-konžská hemorhagická horečka (CCHF), Kyasanurská lesní horečka, Lassa horečka
- Lymfocytární choriomeningitida, Marburg, klíšťová encefalitida
- Variola (smallpox, spalničky), Venezuelská encefalitida, žlutá horečka,

## BBP: bakterie a plísně

- **bakterie:**  
Bacillus anthracis (anthrax), Brucella melitensis (brucelosa), Clostridium botulinum (botulismus), Corynebacterium diphtheriae, Francisella (Pasteurella) tularensis (tularemie), Chlamydia psittaci (psitakosa), Mycobacterium tuberculosis (tuberkulóza), Pseudomonas mallei / pseudomallei, Rickettsie, Coxiella burnetii (Q-horečka), Salmonella typhi / paratyphi (tyfus), Vibrio cholerae (cholera), Yersinia (Pasteurella) pestis (mor),
- **plísně:**  
Coccidioides immitis (kokcidiosa), Histoplasma capsulatum, Nocardia asteroides

## Bio Detector

- Biological Detector (BD) je automatický systém pro detekci BOL vyvinutý společně ETG a americkou armádou, principem je LAPS biosensor
- současně lze detekovat až 8 různých agentů (bakterie, viry, toxiny), je lehce možné rozšířit o nová stanovení. Odezva do 15 minut, 95% pravděpodobnost detekce, 0.1% falešných poplachů, akustická i optická indikace.
- v jednom pouzdře obsahuje jednotky vstupu vzorku, průtočného systému, detektoru LAPS, zásobníku reagensů
- vzorek je kapalný objemu 1 ml, s ním se provádí současně 8 imunochemických testů - BOL-specifické protilátky jsou značeny fluoresceinem, na který se ve druhém stupni váže anti-fluoresceinová protilátka značená ureázou, detekce je potenciometrická - změna pH, "adresace" jednotlivých míst na nosném pásku se provádí osvětlením

**BD**

## MiniFlo

- průtočná cytometrie k analýze buněk a jejich vlastností, testování přítomnosti virů, separaci vybraných buněk
- na proud buněk v tekoucím médiu se svítí jedním nebo více laserovými paprsky a pozoruje se rozptýlené světlo, odpovídající změnám vlastností buněk
- MiniFlo nepoužívá klasických mikroskopických čoček nebo externích optických vláken jako detektorů, ale vlastní tekoucí médium funguje jako světlovod pro paprsek, zachytává světlo a přenáší je do optického detektoru
- eliminují se problémy klasické cytometrie a navíc se zachytí 10x více světla než pomocí čočky

## Perspektivy

- miniaturizace, nanotechnologie, integrace
- multiparametrové, paralelizace
- umělé biorekogniční elementy
  - na bázi kombinatorický technik – aptamery (SELEX), genetické knihovny
  - proteinové inženýrství - rekombinantní proteiny s vylepšenými vlastnostmi, chimérní biomolekuly
  - makromolekulární chemie – otisky analytu v polymerní struktuře - MIP (molecularly imprinted polymers)

## Biosensory v Česku

- MU Brno
  - enzymy a protilátky, piezosensory / SPR / elektrochemie
  - životní prostředí / klinika / vojenské aplikace
- Biofyzikální ústav Brno
  - nukleové kyseliny / elektrochemie
- VÚ radiotechniky Praha
  - SPR, imunosensory
- VÚ Třeboň
  - fotosystém, elektrochemie
- UJEP Ústí nad Labem
  - fotosystém, elektrochemie, optické techniky
- BVT Technologies Brno
  - sítotisk, enzymy, výroba sensorů
- Služba výzkumu Postřelmov
  - imobilizace enzymů, výroba biomembrán



## **Biosensory**

- malé a levné
- rychlé, citlivé a specifické
- uživatelsky přívětivé