



Yersinia enterocolitica'nın Tespiti için Altın-nanoparçacık ile Güçlendirilmiş Biyosensör Uygulamalarının Geliştirilmesi

SümeYra SAVAŞ *¹

¹ Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, TÜBİTAK, Bilişim ve Bilgi Güvenliği İleri Teknolojiler Araştırma Merkezi, Analitik Cihaz Geliştirme ve Sistemler Grubu, Ankara, Türkiye

*yazışılan yazar e-posta: sumeyra.savas@tubitak.gov.tr

(Alınış / Received: 01.04.2020, Kabul / Accepted: 23.04.2020, Yayınlanma / Published: 31.05.2020)

Özet: *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*), *Enterobacteriaceae* ailesinin bir üyesi olan *Yersinia* cinsi'ne ait, en yaygın görülen gıda kaynaklı zoonotik patojenlerden üçüncüsüdür. Havyan dışkısı ile kontamine olan kirli sular ile veya enfekte hayvan ile iletişimin bir sonucu olarak, insanlarda enfeksiyona sebep olabilir. Düşük sıcaklıklara dayanabilme özelliği sayesinde, buzdolabında bulunan yiyeceklerde de üremeye devam edebilmektedir. Bu sebep ile patojenin hızlı ve hassas tespiti sağlık açısından önemlidir. Bu çalışmada, elektrokimyasal sistem kullanılarak, *Y. enterocolitica*'nın tespiti için altın nanopartikül ile güçlendirilmiş bir immünoensörün geliştirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmada ticari olarak temin edilen *Y. enterocolitica* pozitif kontrol ve antikor kullanılmıştır. Standard sandwich assay kullanılarak sensör yüzeye uygulanan immünoassay ile en düşük tespit limiti 10^2 cfu/ml, altın nanoparçacıklar ile güçlendirilen antikor sensörü ile 37 cfu/ml *Y. enterocolitica* tampon çözelti içerisinde tespit edilebilmiştir. İmmünoassay'ın özgüllüğü, antikora özgül olmayan antijenlerin çapraz reaksiyon oranı ile tespit edilmiştir. Bu çalışma da, standard sandwich assay ve altın nanopartiküller ile güçlendirilmiş sandwich assay prensibi geliştirilmiş ve *Y. enterocolitica*'nın tespiti için kullanılmıştır. Bunun ile birlikte, antikor tabanlı bir enzimatik sensör de, altın nanoparçacıkların ölçüm duyarlılığına etkisi belirlenmiştir. Çalışmada ölçüm için elektrokimyasal sensör cihazı kullanılmış olup, *Y. enterocolitica*'nın tespitinde kullanılan immünoensör birçok elektrokimyasal biyosensör ile birleştirilebilir.

Anahtar Kelimeler: Patojen tespit, antikor, biyosensör, altın nanopartikül, *Yersinia enterocolitica*.

Development of Gold-nanoparticle Enhanced Biosensor Applications for *Yersinia enterocolitica* Detection

Abstract: *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) is the third most common foodborne zoonotic pathogen belonging to the genus *Yersinia* which is the member of the *Enterobacteriaceae* family. It can cause infection in humans as a result of water contaminated with caviar feces or as a result of communication with the infected animal. With its ability to withstand low temperatures, it can continue to reproduce in food in the refrigerator. Therefore, fast and sensitive detection of the pathogen is important for health. In this study, it was aimed to develop an immunosensor reinforced with a gold nanoparticle for the detection of *Y. enterocolitica* using an electrochemical system. Commercially available *Y. enterocolitica* positive control and antibody were used in the study. Limit of detection was detected 10^2 cfu/ml using standard sandwich assay and 37 cfu/ml using gold nanomaterial-amplified antibody sensor. The specificity of the immunoassay was determined by the cross reaction rate of non-antibody-specific antigens. With this study, normal and gold-nanoparticle amplified sandwich assays were

developed and used for the detection of commercial *Y. enterocolitica*. In addition, the effect of gold nanoparticles on measurement sensitivity was determined in the antibody based enzymatic sensor. In the study, electrochemical sensor is used and the immunosensor used in the detection of *Y. enterocolitica* can be combined with many electrochemical biosensors.

Key words: Pathogen detection, antibody, biosensor, gold nanoparticle, *Yersinia enterocolitica*.

1. Giriş

Gram negatif, basil şeklinde bir bakteri olan *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*), yersiniosis adı verilen zoonotik bir hastalığa yol açar [1]. Gıda kaynaklı *Y. enterocolitica* enfeksiyonları insanlarda önemli bir halk sağlığı sorunu olup, Avrupa birliğinde en yaygın görülen üçüncü gıda kaynaklı zoonoz hastalık olarak bilinmektedir [2]. İnsanlarda *Y. enterocolitica* enfeksiyonlarının çoğuna çiğ veya az pişmiş kontamine domuz eti tüketimi, nadiren kontamine çiğ süt veya arıtılmamış su neden olabilmektedir [3]. Bu patojen insandan insana bulaşabildiği gibi, enfekte hayvan veya hayvan dışkılarından da bulaşabilir. *Y. enterocolitica* 0°C altındaki sıcaklıklar da bile büyüeyebilen bir mikroorganizma olup, 0-4°C sıcaklıkta depolanan gıda ürünlerinde *Y. enterocolitica*'nın büyüme gösterdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Tudor ve ark. (2008), 4 gün içerisinde soğuk koşullarda saklanan sığır eti üzerinde 2 log cfu/ml kadar artan hücre sayısı tespit etmişlerdir [4]. Amin ve Draughon (1987) ise aynı koşullarda pastörize sütte 1-3 log cfu/ml olan bakteri sayısının 7 gün içerisinde 5-7 log cfu/ml'ye yükseldiğini bildirmişlerdir [5]. Bu sebep ile bu bakterinin gıda ürünlerinde veya enfekte bireylerin vücut sıvılarında hızlı ve doğru olarak saptanması oldukça önemlidir [1, 6].

Y. enterocolitica'nın tespitinde kullanılan çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Geleneksel yöntemler hala en yaygın kullanılan yöntemler olup, mikroskopik tanı, biyokimyasal ve serolojik testleri içinde barındırır [7, 8, 9]. Ancak geleneksel yöntemler, zaman alıcı olması, karmaşıklığı ve diğer bulaşıcı hastalıklarla çapraz reaksiyon verebilme durumu sebebi ile, moleküler teknikler yaygınlaşmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) hızlı ve duyarlı bir teknik olmasına rağmen maliyeti, nisbeten daha karmaşık olması ve tecrübeli uzman gerekliliği gibi dezavantajları da bulunmaktadır [10, 11]. Biyosensör teknolojisi, kullanılan örneğin mikrolitre aralığı, kısa zaman alması ve hassasiyeti sebebi ile son yıllarda diğer tekniklere alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır [12]. Patojen bakterilerin tespitinde sensör teknolojilerinin uygulamaları yaygın olmasına rağmen, *Y. enterocolitica*'nın tespitinde biyosensörlerin kullanımı üzerine yapılan çalışma sayısı oldukça sınırlıdır [6, 13-16]. Literatürde var olan *Y. enterocolitica* tespiti üzerine yapılan uygulamalar da geleneksel sensörlerin en yaygın kullanılan altın nanoparçacıklar (AuNp) ile birleştirilmesi üzerine bir çalışma bulunmamaktadır. Oysa ki nanomalzemeler, sensörün tekrarlanabilirliğini, özgünlüğünü ve hassasiyetini artırır [6].

Altın nanopartiküller, kendilerine özgü kimyasal ve fiziksel nitelikleri sayesinde, en çok tercih edilen nanomateryallerden birisidir [17]. Enzimler, antikorlar, bazı polimerler ve DNA zincirleri altın nanopartiküllerin aktivitelerini etkilemeksizin yüzeylerine bağlanma sağlayabilmektedir. Çalışmada da kullanılmış olan sandwich tipi immünoassayler de enzim ile işaretli tespit edici antikor, nanopartikül ile bağlanarak yüzeye immobilize edilir.

Bu çalışmada, standart sandwich assay ve altın nanopartikül ile güçlendirilmiş sandwich assay prensibi geliştirilmiş ve ticari olarak temin edilen *Y. enterocolitica*'nın tespiti amaçlı kullanılmıştır. Bunun ile birlikte, antikor tabanlı enzimatik sensör de, altın nanoparçacıkların ölçüm duyarlılığına etkisi belirlenmiştir. Çalışmada microfluidik

tabanlı bir elektrokimyasal sensör kullanılmış olup, *Y. enterocolitica*'nın tespitinde kullanılan immünosensör birçok elektrokimyasal biyosensör ile birleştirilebilir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Materyaller ve re ajanler

Monoklonal anti-*Y. enterocolitica* antikoru BioRad (Almanya)'dan ticari olarak satın alındı. Peroksidaz işaretli tespit antikoru BacTrace® (USA)'dan satın alındı. Isı ile öldürülmüş *Y. enterocolitica*, *Escherichia coli* ve *Salmonella spp.* pozitif kontroller SeraCare Life Science (USA)'dan satın alındı. Fosfat tamponlu tuz tabletleri (PBS, 0.01 M fosfat tamponu, 0.137 M sodyum klorür ve 0.0027 M potasyumklorür, pH 7.4), merkaptoundekanoik asit (MUDA), merkaptoetanol, N-hidroksisüksinimit (NHS), etanolamin, analitik sınıf etanol, horseradish peroksidaz (HRP), 3,3, 5,5-tetrametilbenzidin (TMB) Sigma Aldrich (Poole, İngiltere)'den satın alınmıştır. 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) –karbodiimid (EDC) Thermo Scientific'den satın alındı. Altın nanopartiküller (40 nm) BBI International'dan (Cardiff, İngiltere) temin edildi. Milli-Q saf su cihazından ultra saf su (18 M cm⁻¹) elde edildi (Millipore Corp., Tokyo, Japonya). Elektrokimyasal ölçüm TÜBİTAK/Bilgem tarafından geliştirilen elektrokimyasal sensör cihazı ile yapıldı. Ölçümde PC Trace Emstat programı ve cihaza özgün sensör çip kullanıldı [6, 19] (Tübitak, Türkiye).

2.2. Sensör yüzeyin temizlenmesi ve hazırlanması

Sensör çip üzerine, tek tabaka kendiliğinden biriken moleküller (self-assembled monolayer, SAM) oluşturulmadan önce, elektrot yüzeyleri azot plazma ile temizlendi [19]. Sensör çipler 2mM MUDA (%100) da 1 gece bekletildi. Elektrot dizileri kurutulmadan önce %70 ethanol ve su ile yıkandı, kurutuldu, vakumlu paketlenme yapıldı ve kullanılabileceği kadar +4°C'de saklandı.

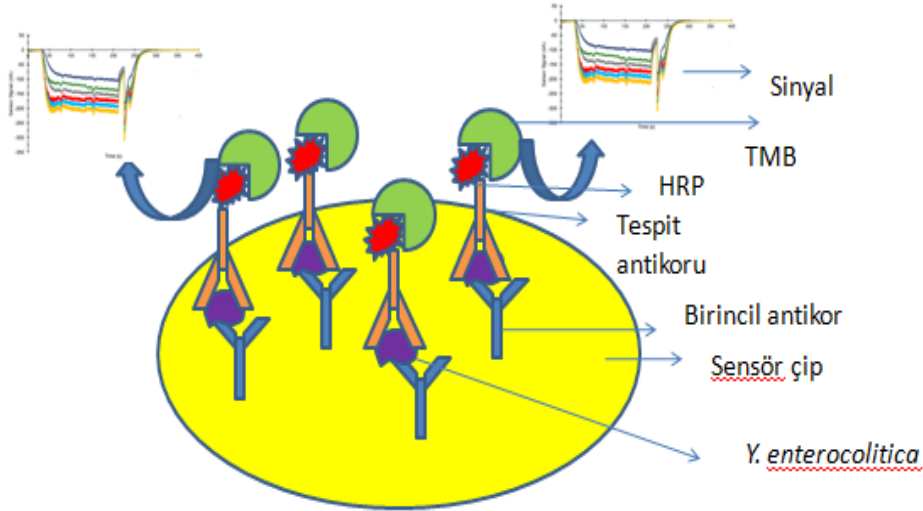
2.3. SAM kaplı sensör çipin Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) yöntemi ile karakterizasyonu

Hiçbir işlem görmemiş, yalın halde bulunan sensör yüzey, SAM kaplı sensör yüzey ve antikor ile kaplanmış sensör yüzeylerin her biri atomik kuvvet mikroskobu kullanılarak görüntüledi (Nanosurf, İsviçre). Ticari olarak satın alınan AFM problemleri (NCLR) AFM ölçümünde kullanıldı.

2.4. Sensör yüzeye antikorun kaplanması ve standart sandwich assay

Altın kaplı sensör çip üzerine kaplanan birincil antikor, *Y. enterocolitica* bakterilerini yakalayan bir yüzey tutucu olarak kullanılır. Enzim işaretli ikincil antikor ise, sensör sinyalin yükselmesi için kullanılan bir tespit antikordur. Anti-*Y. enterocolitica* antikorunun altın kaplı yüzeye bağlanabilmesi için öncelikle sensör yüzey PBS (pH:7.4) ile temizlendi ve her aşamanın arkasından, bir sonraki aşamaya geçmeden sensör yüzey PBS tampon ile yıkandı. Yüzeye, antikorun kovalent bağlanabilmesi için EDC (0.4M) ve NHS (0.1 M) 1:1 oranında karıştırılarak çip üzerinde bulunan çalışma elektrotlarının yüzeyi kaplandı. 2 dakikalık bekleme süresinden sonra, yüzey PBS tampon ile yıkandı. NaAc (pH: 4.5) tampon içerisinde seyreltilen 50 µg/ml birincil antikor sensör yüzey üzerinde 5 dakika süre ile inkübe edildi. Yüzey, PBS tampon ile kalıntılardan arındırıldıktan sonra, 100 µg/ml BSA solüsyonu ile, antikorun bağlanmadığı bölgeler

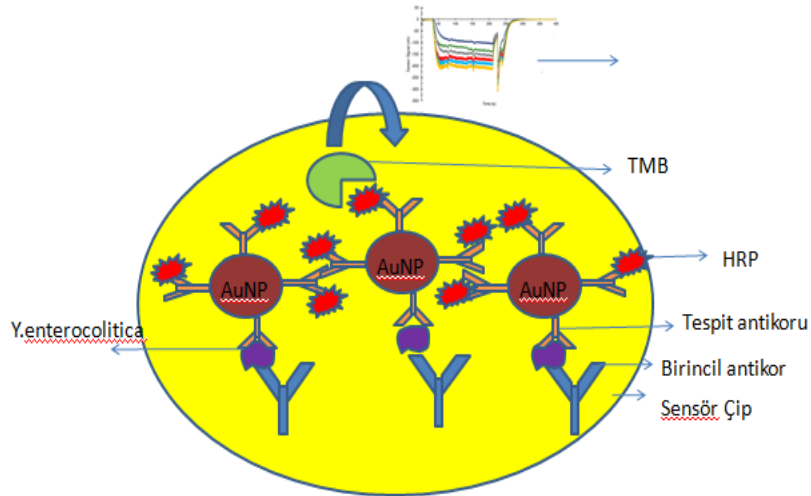
kapatıldı ve son olarak 1 M etanolamin ile işlem sonlandırıldı (pH:8.5). Antikor bağlanan sensör yüzey üzerine ticari olarak satın alınan 6.23×10^8 cfu/ml konsantrasyon da *Y. enterocolitica* bakterisi her set de konsantrasyonu azaltılarak sensör yüzeye gönderildi. Seyreltme direk PBS tampon içerisinde gerçekleştirildi. Bakteriler birincil antikora tutunduktan sonra, enzim ile işaretli tespit antikoru sensör yüzeye gönderildi. HRP enzimine özel TMB substratı ile yüzey kaplanır kaplanmaz sensör çip elektrokimyasal sensör cihazına yerleştirildi. Amperometrik ölçüm -1.0 V'da 300 saniye süre ile gerçek zamanlı olarak alındı. Ölçümden sonra sensör yüzey HCL (0.1 M) ile 1 dakika süre ile yenilendi ve bakterinin farklı konsantrasyonlarının tespiti için hazır hale getirildi. Şekil 1'de sensör yüzey üzerinde standard sandwich assay metodu şematize edilmiştir.



Şekil 1. Standard assay kullanılarak *Y. enterocolitica*'nın tespiti için geliştirilen antikor temelli sensör prensibi

2.5. Altın nanopartikül ile güçlendirilmiş sandwich assay

Birincil antikorun yüzeye bağlanma işlemi standart sandwich assay ile aynı şekilde yapıldı. Sensör yüzeye, patojen gönderildikten sonra tespit antikorusunun tutturulduğu altın nanoparçacıklar ile çalışma elektrotlarının yüzeyi kaplandı ve -1.0 V'da 300 saniye süre ile gerçek zamanlı olarak ölçüm alındı. Şekil 2'de altın nanoparçacıklar ile güçlendirilmiş sandwich assay modeli şematize edilmiştir.



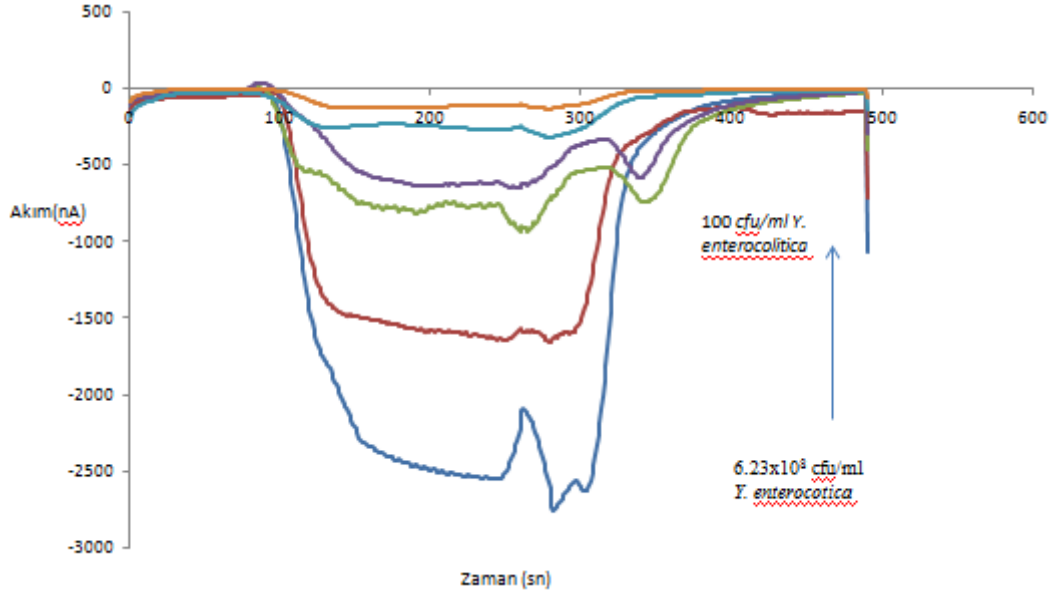
Şekil 2. *Y. enterocolitica*'nın tespiti için altın nanoparçacıklar ile güçlendirilmiş immunosensör prensibi

Altın parçacıklar ile tespit antikorunu birbirine bağlamak için, 40 nm çapında 1000 µl AuNP (Altın nanopartikül) üzerine 5 µl (0,2 M) NaOH eklendi ve karıştırıldı. 1.5 µl tespit antikor ve 2 µl HRP (1 µg/ml) AuNP üzerine eklendi ve 45 dakika 600 rpm’de karanlık ortamda karıştırıldıktan sonra 30 dakika 1000 rpm’ de, +4 derecede santrifüjlendi. Santrifüj sonunda süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı ve pellet 40 µl BSA ve 60 µl PBS (10 mM) çözeltisi ile çözüldü. AuNP çözeltisinin 525 nm dalga boyunda spektrofotometre de ölçümü yapıldı ve OD değeri dikkate alınarak hesaplanan seyreltme faktörüne göre seyreltildi [20].

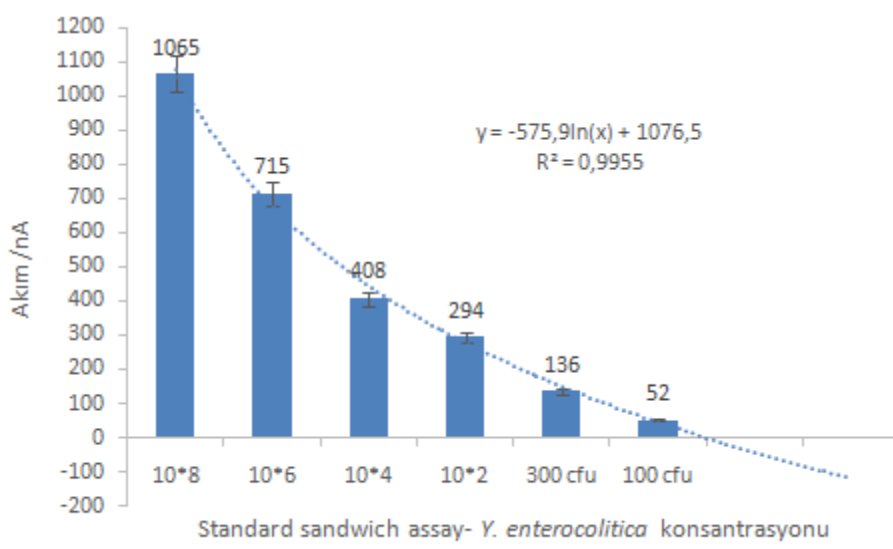
3. Bulgular

3.1. *Y. enterocolitica*'nın tespitinde standart sandwich assay analizleri

PBS tampon içerisinde ölçülebilen *Y. enterocolitica* aralığının 6.23×10^8 ile 10^2 cfu/ml olduğu saptandı. 10^2 nin altındaki konsantrasyonlar da tekrarlanabilirlik gözlenmediği ve amperometrik değerin 50 nA altına düşmesi sebebi ile en düşük tespit limitinin 10^2 cfu/ml olduğu saptandı. Şekil 3(A)'da *Y. enterocolitica* konsantrasyona bağlı gerçek zamanlı amperometrik ölçüm sensogramı, Şekil 3(B)'de ise, konsantrasyonlara bağlı logaritmik regresyon analizi verilmiştir.



Şekil 3(A). *Y. enterocolitica*'nın standart sandwich assay ile gerçek zamanlı amperometrik ölçüm sensogramı

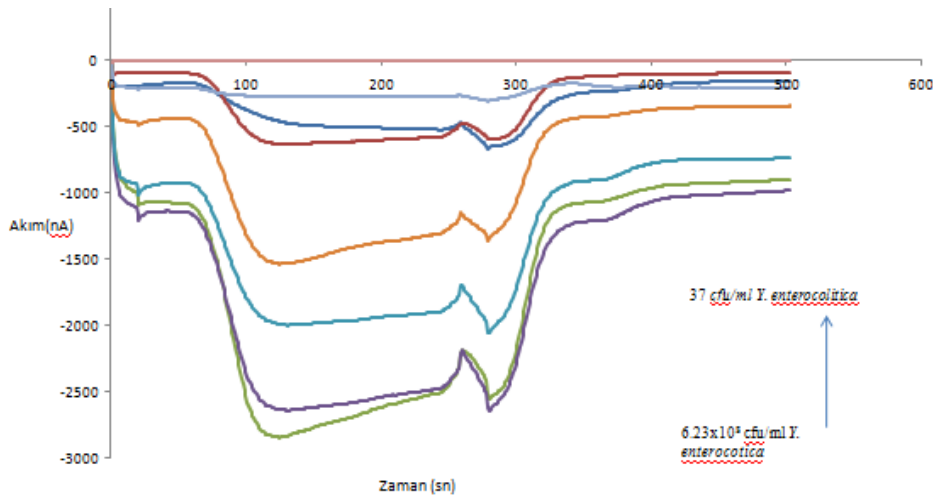


Şekil 3(B). Konsantrasyon değişimine bağlı olarak elde edilen tüm sonuçların logaritmik regresyon analizi

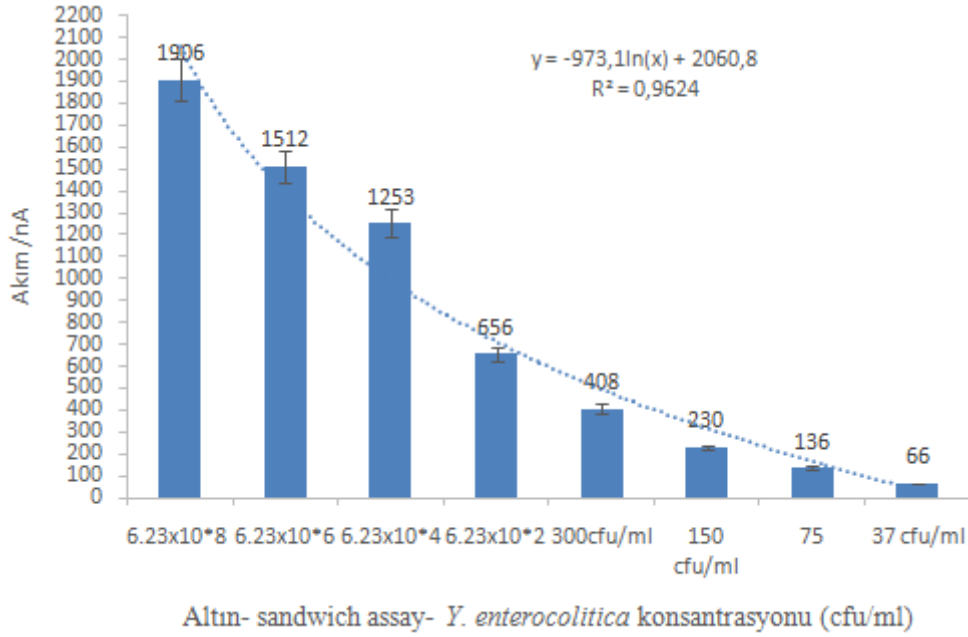
3.2. *Y. enterocolitica*'nın tespitinde altın nanopartikül ile güçlendirilmiş sandwich assay analizleri

PBS tampon içerisinde ölçülebilen *Y. enterocolitica* aralığının 6.23×10^8 ile 37 cfu/ml olduğu saptandı. 37⁰C'nin altındaki konsantrasyonlar da tekrarlanabilirlik gözlenmediği ve amperometrik değerlerin 50 nA altına düşmesi sebebi ile en düşük tespit limiti 37 cfu/ml olarak saptandı. Şekil 4(A)'da *Y. enterocolitica* konsantrasyonuna bağlı gerçek zamanlı amperometrik ölçüm sensogramı, Şekil 4(B)'de ise, konsantrasyonlarına bağlı logaritmik regresyon analizi verilmiştir.

Her iki deney sonucu kıyaslandığında, altın nanopartiküllerin kullanımının sensör sinyalini önemli ölçüde artırdığı (ortalama 2 kat) görüldü. Altın nanoparçacıklar ile güçlendirilen sandwich assay sonucu sensör yüzeyin yakalayabildiği en düşük konsantrasyonun 37 cfu/ml olduğu görüldü. Bu çalışmanın sonucunda nanopartikül destekli bir sandwich assayin standart sandwich assay'a oranla tespit limitini 3 kat düşürdüğü belirlendi. Her iki deneyden elde edilen 0.9 ve üzeri regresyon analizi sonucu, deneylerin tekrarlanabilirlik konusunda güvenilir olduğunu göstermektedir.



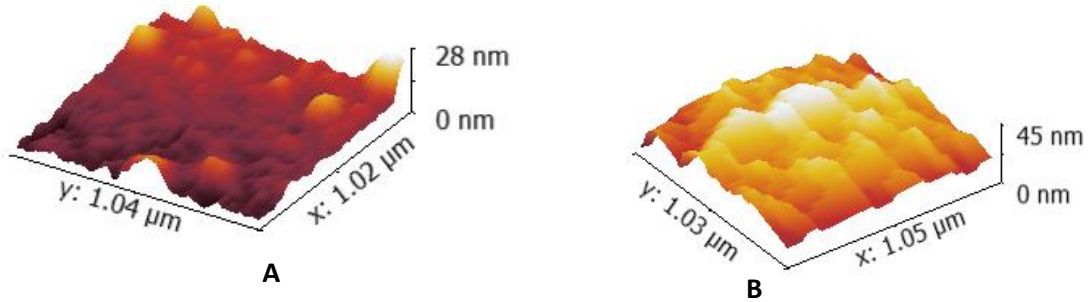
Şekil 4(A). *Y. enterocolitica*'nın altın-sandwich assay ile gerçek zamanlı amperometrik ölçüm sensogramı



Şekil4(B). Konsantrasyon değişimine bağlı olarak elde edilen tüm sonuçların logaritmik regresyon analizi

3.3. SAM kaplı sensör çipin Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) yöntemi ile karakterizasyon sonuçları

İşlem görmemiş sensör yüzeyin AFM ölçümü daha önceki çalışmalarda yapılmış olup, 1-1 µm genişlikte 11-12 nm yüzey yüksekliği saptanmıştı [6, 19]. *Y. enterocolitica*'ya özgül birincil antikör yüzeye bağlandıktan sonra ve bakteri yüzeyde ki tutucu antikora bağlandıktan sonra sensör yüzeyler AFM ile karakterize edildi. 3B yüzey topoloji görüntüleri, tarama alanı, antikör bağlandıktan sonra 28 nm, üzerine patojen bağlandıktan sonra ise 45 nm yükseklik ile sonuçlandı. Şekil 5(A) ve (B) de sırası ile antikör bağlı yüzey topografyası ve antikör-antijen bağlanması sonrası yüzey topografyası verilmiştir. Her kademe sonrasında ki yüzey yüksekliğindeki artış, bakteri çipinin, tespit için başarılı bir şekilde hazırlandığını doğrulamıştır.



Şekil 5. Anti- *Y. enterocolitica* bağlı sensör yüzey topografyası (A), antikör-antijen bağlanması sonrası sensör yüzey topografyası (B)

3.4. *Y. enterocolitica* için çapraz reaksiyon çalışması

Deneyler de kullanılan *Y. enterocolitica*'ya özel birincil ve tespit antikörünün, antikör ile etkileşim özgünlüğü olmayan bakterilere verdiği yanıt, sensör yüzeyde test edilmiştir. Çapraz reaksiyon deneyi için ticari olarak satın alınan 10^7 cfu/ml konsantrasyon da

Salmonella spp. ve *E. coli* bakterileri kullanılmıştır. *Y. enterocolitica*'ya özgül antikor kaplı sensör yüzeyde her iki patojen ayrı ayrı bekletilmiş ve amperometrik ölçüm sonuçlarının 50 nA- 100 nA arasında olduğu ve buna bağlı olarak da standard sandwich assay için çapraz rekasiyonun %2,1 oranında olduğu tespit edilmiştir. Çapraz reaksiyon için seçilen mikroorganizmalar *Y. enterocolitica* ile aynı enterik patojenler sınıfında yer alıyor olup, antikorun özgüllüğü çapraz reaksiyon deneyleri ile doğrulanmıştır.

4. Sonuç ve Yorum

Günümüze kadar *Y. enterocolitica*'nın tespitinde PCR, ELISA ve geleneksel tespit yöntemleri (mikroskopik, biyokimyasal ve serolojik) sıklıkla kullanılmaktadır. Son yıllarda, SPR sensör ile *Y. enterocolitica*'nın tespiti üzerine yapılan çalışmalar da mevcuttur (13,14). Tüm çalışmalar değerlendirildiğinde, bunların tespit limitlerinin 10^2 - 10^6 cfu/ml arasında olduğu saptanmıştır. Oh ve ark. (2005) SPR sensör kullanmışlar ve *Y. enterocolitica* için en düşük tespit limitini 10^2 cfu/ml bulmuşlardır. Bu değer, çalışmada kullandığımız standard sandwich assay sonucunda elde ettiğimiz en düşük tespit limiti ile benzerdir. Ancak 37 cfu/ml en düşük tespit limiti ile altın-nanopartikülün kullanımının *Y. enterocolitica*'nın tespitinde ki önemi, bu çalışma ile gösterilmiştir. Son yıllarda, sensör yüzeyde altın parçacıklar ile güçlendirilmiş antikor veya DNA temelli sensör çalışmaları mevcut olup, bu çalışma en sık görülen üçüncü patojen olan *Y. enterocolitica*'nın tespitinde altın nanoparçacıkların kullanıldığı ilk çalışmadır.

Sensörler hızlı, güvenilir yöntemler olup, patojenlerin tespitinde kullanımının faydalı olabileceği düşünülmektedir. Bunun ile birlikte, biyolojik deneylerde nanoparçacık kullanımının deneyin etki ve güvenilirliğine önemli ölçüde katkı sağladığı sonucuna varılmıştır.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyanı

Sümeysra SAVAS: Araştırma, Orijinal Taslak Yazımı, Araştırma, Görselleştirme

Destek ve Teşekkür Beyanı

Çalışma da kullanılan sensör çip ve elektrokimyasal sensör cihazı TÜBİTAK/Bilgem Biyoelektronik ve Biyosensör Grubu tarafından geliştirilmiş olup, grupta bulunan tüm araştırmacılara teşekkür ederim.

Çatışma Beyanı

Bu çalışmanın yazarı olarak herhangi biriyle bir çatışma beyanım bulunmadığını bildiririm.

Etik Kurul Onayı ve/veya Aydınlatılmış Onam Bilgileri

Bu çalışmanın yazarı olarak herhangi bir etik kurul onayı ve aydınlatılmış onam bilgileri beyanım bulunmadığını bildiririm.

Kaynakça

- [1] B. M. Rosner, D. Werber, M. Höhle, K. Stark, "Clinical aspects and self-reported symptoms of sequelae *Yersinia enterocolitica* infections in a population-based study, Germany 2009–2010", *BMC Infect. Dis.*, 13, 1471–2334, 2013
- [2] EFSA and ECDC, "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017", *EFSA J.*, 16, e05500, 2018.
- [3] E. J. Bottone, "*Yersinia enterocolitica*: Overview and epidemiologic correlates", *Microbes Infect.*, 1, 323–333, 1999.
- [4] L. Tudor, I. Togoe, A. Pop, E. Mitranescu, "The *Yersinia enterocolitica* species tolerance to temperature", *Rom. Biotechnol. Lett.*, 13, 17–22, 2008.
- [5] M. K. Amin, and F. A. Draughon, Growth-characteristics of *Yersinia enterocolitica* in pasteurized skim milk, *J. Food Protect.*, 50, 849–852, 1987.

- [6] S. Savas, Z. Altintas, "Graphene Quantum Dots as Nanozymes for Electrochemical Sensing of *Y. enterocolitica* in milk and Human Serum", *Materials.*, 12, 2189, 2019.
- [7] R. S. Tebbs, L. Y. Wong, P. Brzoska, O. V. Petrauskene, "Molecular technologies for *Salmonella* detection, In *Salmonella* Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies", *IntechOpen*, London, UK, 2012, pp. 481–504.
- [8] I. Hochel and J. Skvor, "Characterization of rabbit antibodies for immunochemical detection of *Yersinia enterocolitica*", *Folia Microbiol.*, 52, 511–518, 2007.
- [9] M. Luciani, M. Schirone, O. Portanti, P. Visciano, G. Armillotta, R. Tofalo, G. Suzzi, L. Sonsini, T. Di Febo, "Development of a rapid method for the detection of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 from food", *Food Microbiol.*, 73, 85–92, 2018.
- [10] A. Hay, E. Macdonald, R. Evans, M. Davidson, "Use of VITEK for surveillance of antibiotic resistance in *Escherichia coli* in the Scottish Highlands: results over 15 years", *J. Infection.*, 55, e87–e88, 2007.
- [11] D. Derong, W. Liu, H. Li, Y. Wang, X. Li, D. Zou, Z. Yang, S. Huang, D. Zhou, L. Huang, J. Yuan, "Survey and rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* in clinical samples targeting the *rcaA* gene in Beijing, China", *Front. Microbiol.*, 6, 519, 2015.
- [12] E. Sheikhzadeh, M. Chamsaz, A. P. F. Turner, E. W. H. Jager, V. Beni, "Label-free impedimetric biosensor for *Salmonella typhimurium* detection based on poly pyrrole-co-3-carboxyl-pyrrole copolymer supported aptamer", *Biosens. Bioelectron.*, 80, 194–200, 2016.
- [13] B.K. Oh, W. Lee, B. S. Chun, Y. M. Bae, W. H. Lee, J.W. Choi, "Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of *Yersinia enterocolitica*", *Coll Surf A.*, 257–258, 369–374, 2005.
- [14] Y. M. Bae, B. K. Oh, W. Lee, W. H. Lee, J. H. Choi, "Immunosensor for detection of *Yersinia enterocolitica* Based on imaging ellipsometry", *Anal. Chem.*, 76, 1799–1803, 2004.
- [15] H. Wei, Y. Zhao, Y. Bi, H. Liu, Z. Guo, Y. Song, J. Zhai, H. Huang, R. Yang, "Direct detection of *Yersinia pestis* from the infected animal specimens by a fiber optic biosensor", *Sens. Actuators B. Chem.*, 123, 204–210, 2006.
- [16] W. Sun, P. Qin, H. Gao, G. Li, K. Jiao, "Electrochemical DNA biosensor based on chitosan/nano-V2O5/MWCNTs composite film modified carbon ionic liquid electrode and its application to the LAMP product of *Yersinia enterocolitica* gene sequence", *Biosens. Bioelectron.*, 25, 1264–1270, 2010.
- [17] F. Lu, T.L. Doane, J.-J. Zhu, C. Burda, "Gold nanoparticles for diagnostic sensing and therapy", *Inorganica Chimica Acta.*, 393, 142–153, 2012.
- [18] Z. Altintas, Y. Uludag, Y. Gurbuz, I. Tothill, "Development of surface chemistry for surface plasmon resonance based sensors for the detection of proteins and DNA molecules", *Anal. Chim. Acta.*, 712, 138–144, 2012.
- [19] S. Savas, Ersoy, A, Y. Gulmez, S. Kılıc, B. Levent, Z. Altintas, "Nanoparticle Enhanced Antibody and DNA Biosensors for Sensitive Detection of *Salmonella*", *Materials.*, 11, 1541, 2018.
- [20] S. Savas, "Rapid and Sensitive Detection of *E. coli* by Gold Nanoparticle-Labeled Biosensor", *J. Biotechnol. Strategic. Health Res.*, 2, 101–107, 2018.