

IgG'nin tayini için kapasitif bir biyosensör geliştirilmesi

Development of a capacitive biosensor for detection of IgG

Zihni Onur Uygun¹

Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Kars, Türkiye

ÖZ

Amaç: COVID-19 geçtiğimiz bir yıl içerisinde oldukça fazla kişiye bulaşmış ve tüm hayatımızı değiştirmiştir. COVID-19 pandemisi ile artan arge çalışmalarına ek olarak geliştirilen kapasitif IgG biyosensörü tarafımızca başarılı bir şekilde geliştirilmiştir.

Gereç ve Yöntem: Ölçümün kapasitif olması sadece protein-A'ya bağlanan IgG moleküllerinin ikincil bir işaretçi moleküle ihtiyaç duymaması ve hızlı ölçümü ile direkt olarak ölçülmesi ölçümün kolaylığını yansıtmaktadır. Altın elektrot üzerine sırasıyla sistamin, PAMAM ve protein-A immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Ölçüm süresini 400 saniyeye indirerek 7 dakika içerisinde ölçüm yapabilmek son derece iyidir. IgG normal değerlerinin, 5,6-18 mg/mL aralığında olması, olası COVID-19 geçirilmesi sonrası artan değerlerin de ölçülebilirliğini, 5-70 mg/mL aralığını ölçebildiği için sağlayabilmektedir. Düzlemsel olarak ölçüm yani lineer ölçümün doğruluğu ise 0,9908 olarak hesaplanmış bu değer de 1 sayısına çok yakın olduğundan, ölçümün linearitesi uygun olarak değerlendirilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1,5 mg/mL ve 4,54 mg/mL olarak bulunmuştur.

Sonuç: Satın alınan serum örneklerine eklenen IgG ölçümünde ise % 5'ten daha az bir sapma olması da seçiciliğin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu şekilde yeni nesil bir ölçüm sistemi geliştirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: COVID-19, biyosensör, kapasitans, IgG.

ABSTRACT

Aim: COVID-19 has infected quite a lot of people over the past year and has changed our entire lives. The capacitive IgG biosensor, developed in addition to the increasing R&D studies with the COVID-19 pandemic, has been successfully developed by us.

Materials and Methods: The capacitive measurement reflects the ease of measurement, only IgG molecules binding to protein-A do not need a secondary marker molecule and direct measurement with rapid measurement. Cystamine, PAMAM and protein-A immobilization was performed on the gold electrode, respectively.

Results: It is extremely good to be able to measure within 7 minutes by reducing the measurement time to 400 seconds. The normal values of IgG are in the range of 5.6-18 mg / mL, and the measurability of the increased values after possible COVID-19 infection can be measured in the range of 5-70 mg / mL. The accuracy of the linear measurement, that is, the linear measurement, was calculated as 0.9908, and this value was very close to the number 1, so the linearity of the measurement was evaluated as appropriate. LOD and LOQ values were found to be 1.5 mg / mL and 4.54 mg / mL, respectively.

Conclusion: A deviation of less than 5% in the IgG measurement added to the purchased serum samples indicates that the selectivity is high. In this way, a new generation measurement system has been developed.

Keywords: COVID-19, biosensor, capacitance, IgG.

Sorumlu yazar: Zihni Onur Uygun
Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim
Dalı, Kars Türkiye
E-posta: onur_uygun@hotmail.com
Başvuru tarihi: 01.06.2021 Kabul tarihi: 23.06.2021

GİRİŞ

Antikorlar, bağışıklığın doğuştan gelen ve adaptif dallarını birbirine bağlayan anahtar bileşenlerdir ve normalde konakçı korumasına aracılık etmek için yabancı bir antijene yanıt olarak üretilir. Antikor yanıtının tanımlayıcı bir özelliği poliklonalitesidir; antikorlar, somatik rekombinasyon ve mutasyon yoluyla Fab alanlarının neredeyse sınırsız çeşitlendirilmesi yoluyla görünüşte sınırsız bir antijen dizisini hedefleme kapasitesine sahiptir. Bununla birlikte, antikor tepkisinin poliklonalitesinin, aynı zamanda antikor-antijen kompleksi tarafından angaje olan efektör moleküller için de geçerli olduğu giderek daha açık hale gelmektedir. Bu nedenle, Fab-antijen etkileşimleri, antikor yanıtının özgülüğü için çok önemliken, Fc alanı için antijen tanıma tarafından tetiklenen çeşitli efektör özelliklere aracılık etmede çok önemli bir rolü vardır (1).

İmmunglobulin G (IgG), plazma proteininin yaklaşık % 10-20'sini oluşturan insan serumunda en bol bulunan proteinlerden biridir. İnsanda IgM, IgD, IgG, IgA ve IgE olmak üzere beş immunglobulin sınıfının ana sınıfıdır. % 82-96 protein ve % 4-18 karbonhidrattan oluşan bu glikoproteinler, ağır zincir yapısı bakımından farklılık gösterir ve farklı efektör fonksiyonlara sahiptir. IgG, sırasıyla IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4 olarak dört alt sınıfa ayrılabilir. IgG'nin alt sınıfları, insan IgG miyelom proteinlerine karşı spesifik tavşan antiserumları kullanılarak yapılan kapsamlı çalışmaların ardından 1960'larda keşfedilmiştir. Amino asit seviyesinde % 90'dan fazla özdeş olmalarına rağmen, her alt sınıf, antijen bağlanması, bağışıklık kompleksi oluşumu, tamamlayıcı aktivasyonu, efektör hücrelerin tetiklenmesi, yarı ömür ve plasental taşıma açısından benzersiz bir profile sahiptir (2).

IgG, B hücreleri ve plazma hücreleri tarafından salgılanan birincil antikor türüdür ve adaptif immün yanıtlarda rol oynayan baskın izotiptir. IgG antikorlarının aktivitesi, antijene bağlanan Fab alanı ve in vivo için gerekli olan hücresel efektör fonksiyonlarına aracılık etmek için farklı reseptör türleri (Fcy reseptörleri; FcyR'ler) aracılığıyla sinyal veren Fc alanı tarafından belirlenir. Birçok enfeksiyon ve maligniteye karşı koruma. Doğrudan koruyucu bağışıklık fonksiyonlarına aracılık etmeye ek olarak, IgG bağışıklık kompleksleri, uyarlanabilir bağışıklık tepkilerini modüle etmek, T-hücresi aktivasyonunu ve yüksek afiniteli B hücrelerinin seçimini arttırmak için FcyR'ler aracılığıyla sinyal verir. FcyR'lerin çoğu, monomerik IgG için düşük afinite sergilediğinden, IgG molekülleri tarafından

sinyale, avidite bazlı Fc-FcyR etkileşimlerini ve dolayısıyla FcyR kümelenmesini ve sinyalleşmesini sağlayan multivalent IgG-antijen immün kompleksleri aracılık eder(3). Belirli bir Fc alanı tarafından angaje edilen spesifik FcyR, IgG alt sınıfı ve Fc'nin CH2 alanı içinde Asn297'de bulunan bir N- bağlı glikan bileşimi tarafından belirlenen Fc yapısı tarafından belirlenir. Fc alanı tarafından alınan açık veya kapalı bir konformasyonun bağlanması temelinde, FcyR'ler sırasıyla Tip I veya II olarak ayırt edilebilir. Bu iki reseptör ailesi, farklı efektör ve modüle edici yolları aktarır ve bu nedenle, IgG sinyalleşmesini sağlayan ise Fc alanının yapısıdır (4).

Aralık 2019'da, Çin'in Wuhan kentinde yeni bir korona virüs temelli hastalık salgını bildirildikten sonra, 11 Şubat 2020'de Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bu korona virüsü "şiddetli akut solunum sendromu korona virüs 2" (SARS-CoV-2) ve neden olduğu hastalığı "korona virüs hastalığı 2019" (COVID-19) olarak adlandırdı. 25 Mayıs 2020 itibariyle SARS-CoV-2 212'den fazla ülkeyi etkiledi ve dünya çapında yaklaşık 5.529.195 vaka doğrulandı, bunların 347.192'si ise öldü. CoV'ler, Coronaviridae ailesine (Coronavirinae alt ailesi aittir.), üyeleri çok çeşitli konukçuları enfekte ederek, soğuk algınlığından şiddetli ve nihayetinde SARS, MERS ve şu anda COVID-19 gibi ölümcül hastalıklara kadar değişen semptomlar ve hastalıklar üreten. SARS-CoV-2, insanları enfekte eden CoV ailesinin yedi üyesinden biri olarak kabul edilir (5) ve SARS'a neden olan aynı CoV soyuna aittir; ancak bu yeni virüs genetik olarak farklıdır. 2020 yılına kadar, insan CoV 229E (HCoV-229E), HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV ve MERS-CoV dâhil olmak üzere altı CoV'nin insanları enfekte ettiği biliniyordu. SARS-CoV ve MERS-CoV, yüksek ölüm oranına sahip salgınlara yol açsa da, diğerleri hafif üst solunum yolu hastalıkları ile ilişkili olmaya devam etmektedir (6). Koronavirüsler, geniş ve rastgele bir dizi doğal konakçıya sahip olan pozitif duyarlı RNA virüsleridir ve birden fazla sistemi etkiler (7). COVID-19 hastalarının spesifik antikor profilleri analiz edildiğinde IgM seviyesinin bir aydan fazla sürdüğü bulunması ile SARS-CoV-2 ile enfekte hastalarda virüs replikasyonunun uzun bir süre aldığını göstermiştir. IgG seviyelerinin ise sadece hastalığın geçişinden sonraki aşamalarında arttığı bulunmuştur.

Sonuç olarak IgG hastalığın geçirilmesinden sonra aşılama dediğimiz bağışıklığın kazanılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bu bağışıklığın ne derece kazanıldığı alınan virüs

yükü ile orantılıdır. Örneğin yüksek virüs yükü yüksek IgG seviyelerini göstermektedir, fakat immunoassay testlerin duyarlılığı bu yükü göstermemektedir. Bu nedenle daha hassas ve düşük maliyetli bir ölçüm sistemine gerek vardır.

Genel olarak biyosensörler, sensör üzerinde hareketsiz hale getirilmiş belirli biyomoleküllerle ("prob" veya "yakalama molekülü") seçici olarak etkileşime giren analitleri tespit etmek için kullanılan araçlardır(8). Bu sistemler hızlı ve duyarlı kişisel kullanıma uygun testler geliştirmek için potansiyel taşıyan analizörlerdir. Biyosensörlerde en önemli nokta ise, biyotanıma ajanı ve ölçüm metodunun duyarlılığıdır. Kullandığımız biyosensörde ise IgG tanınması için protein-A (PA) molekülü kullanılmıştır. Staphylococcus aureus'un ana hücre duvarı bileşeni olan PA, yaklaşık 80 yıl önce keşfedilen ilk immünoglobulin bağlayıcı proteinlerden biridir. Bununla birlikte, hem saflaştırma yöntemlerinde hem de tedavide antikorların uygulanmasında büyük bir gelişme sağlanmıştır. Akademik / endüstri gruplarındaki bilim adamları tarafından hedeflenmemiş (boyut dışlama, iyon değişimi ve hidrofobik etkileşimler) ve hedefli (afinite) yöntemlere dayanan birçok yayın bulunmaktadır. IgG ve PA arasındaki etkileşim ise kapasitif olarak belirlenmiştir.

Afinite biyosensörleri iki ana gruba ayrılabilir: hedef molekül ile sensör üzerindeki afinite yüzeyi arasındaki doğrudan bağlanmayı ölçenler ve etiketli reaktifler kullanılarak bağlanma analizlerine uyarlanan biyosensörler (9). Etiketli afinite reaktifleri ile çalışan biyosensörler, floresan işaretçilerin, aktif enzimlerin, manyetik boncukların, radyoaktif türlerin veya kuantum noktalarının genellikle hedef molekülleri etiketlemek için etiketleme ajanları olarak kullanıldığı geleneksel immünoassay teknolojisinin varyasyonlarıdır. Kapasitif biyosensörler, empedans biyosensörlerinin (10) alt kategorisine aittir. Kapasitif biyosensörler, bir analit, yalıtıcı dielektrik katman (9) üzerinde hareketsiz hale getirilmiş reseptör ile etkileşime girdiğinde, elektrolit-elektrot ara yüzündeki dielektrik özelliklerindeki ve/veya dielektrik katmanın kalınlığındaki değişikliği ölçer. Çalışma elektrotu (bir elektrolitik kondansatör / birinci plaka) ile elektrolit (ikinci plaka) arasındaki elektrik kapasitansı Denklem (1) de verilmektedir:

$$C = (\epsilon_0 \epsilon_r A) / d$$
$$\epsilon_r$$
, plakalar arasındaki ortamın dielektrik sabiti, ϵ_0 , boş alanın geçirgenliğidir (8.85×10^{-12} F / m), A, plakaların yüzey alanıdır (m^2) ve d, yalıtım tabakası (m).

Yukarıdaki denkleme göre plakalar arası mesafe arttığında toplam kapasite azalmaktadır. Diğer bir deyişle, bu tip kapasitif biyosensörlerin tahlil prensibinde, bir hedef molekül reseptöre bağlandığında, karşı iyonların kapasitif elektrot etrafındaki yer değiştirmesi, kapasitansta bir azalmaya neden olur. Reseptöre bağlanan hedef moleküllerin miktarı ne kadar yüksek olursa, elde edilen yer değiştirme ve kayıtlı kapasitanstaki azalma o kadar büyük olur(11). Bu şekilde kapasitans ile elektrot üzerindeki değişimler ve IgG miktarı ölçülebilecektir. Farklı referanslara göre, normal konsantrasyonlar arasında serum IgG, 5,6-18 mg/mL olarak rapor edilmiştir. Bu aralıkta ve bu aralığın üzerindeki ölçümlerde IgG miktarının ölçülesi açısından biyosensör sistemi avantajlı olacaktır.

Sonuç olarak afinite temelli olarak tasarladığımız biyosensör sistemimizde, IgG ölçümü için PA biyotanıma ajanına bağlanan IgG moleküllerinin oluşturduğu kapasitif sinyaller ile yapılmıştır.

YÖNTEM

Elektrokimyasal ölçümler için Palmsens 3 marka potansiyostat (Hollanda, Palmsens BV.), elektrot olarak ise altın elektrotlar (BASi, U.S.A.) kullanılmıştır. Tüm kimyasal ve biyokimyasal maddeler Merck (U.S.A.) firmasından temin edilmiştir.

Altın elektrotlar tiyolik (SH grubu içeren) materyaller ile kolay etkileşebildiğinden, yüzey kaplaması olarak kullanılmışlardır. Kapasitif ölçüm alınabilmesi için elektrotlara 10000-0,05 Hz arasında 180 mV potansiyel uygulanarak, 10mV Alternatif akım (AC) ile kapasitif (C) ölçümler gerçekleştirilmiştir (12).

Elektrot yüzeyi kendi kendine düzenlenen tek tabaka (self-assembly monolayer; SAM) ile modifiye edilmiştir. SAM materyali olarak 4-aminotiyofenol (4-ATP) kullanılmıştır. Altın elektrot bu maddenin etanol içerisinde 100 mM konsantrasyonlarını içeren çözeltide gece boyu bekletilmiştir. Bu işlemden sonra elektrot sırasıyla etanol ve su ile yıkanarak bağlanmamış SAM materyali uzaklaştırılmıştır. Kapasitif ölçüm ile immobilizasyon tabakaları (SAM) kontrol edilerek doğrulanmıştır.

SAM modifiyeli elektrotlar yüzey alanını artırarak duyarlılığı artırmak için amin uçlu poliamidoamin (PAMAM; 5. Jenerasyon; G5) ile modifiye edilmişlerdir, ancak bu işlemden önce 4-ATP ile modifiye edilen elektrotlar %2,5 glutaraldehit içeren sulu çözeltide 30 dakika bekletilerek PAMAM bağlanması için aktif aldehit uçları

oluşturulmuştur. Elektrot saf su ile nazikçe yıkanarak ve azot gazı ile kurutulmuştur.

Elektrotlar 1mM PAMAM içeren (pH=6,8) çözeltilere daldırılarak bekletilmiş, sonrasında saf su ile yıkanarak kurutulduktan sonra elektrot C ile karakterize edilmiştir (13). Ardından %2,5 glutaraldehit içeren sulu çözeltide 30 dk. bekletilen elektrotlar böylece PA immobilizasyonuna hazır hale gelmiştir.

Bu aşamadan sonra elektrotların üzerine mililitresinde 10 miligram olan PA (10mg/mL) konsantrasyonda elektrot yüzeyine damlatılarak 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiş ve kapasitans ölçümü alınmıştır.

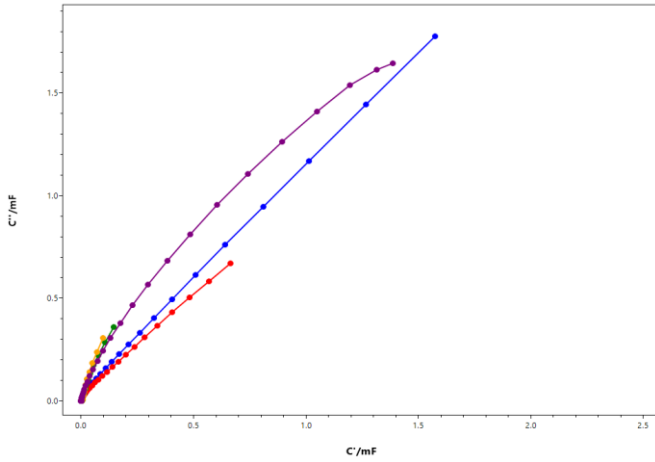
Bu işlemden sonra IgG miktarının belirlenmesi için standart grafik, tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, LOD ve LOQ değerleri belirlenerek,

yapay serum örneğinde IgG miktarı tayin edilmiştir. LOD ve LOQ hesaplama formülleri ise $LOD = 3,3 \text{ (Standart Sapma(S))/standart grafik eğimi(m)}$, $LOQ = 10 \text{ (Standart Sapma(S))/standart grafik eğimi(m)}$ şeklinde hesaplanmıştır.

BULGULAR

IgG tayini için PA temelli bir biyosensörün geliştirilmesi için öncelikle elektrokimya ölçümler gerçekleştirilmiştir. Elektrot modifikasyonlarının tamamı kapasitif olarak izlenmiştir.

Altın elektrot (AuE) öncelikle, 4-ATP, sonrasında PAMAM ve protein A ile immobilize edildikten sonra kapasitans ile izlenmiştir (Şekil-1).



AuE: 1,7 mF

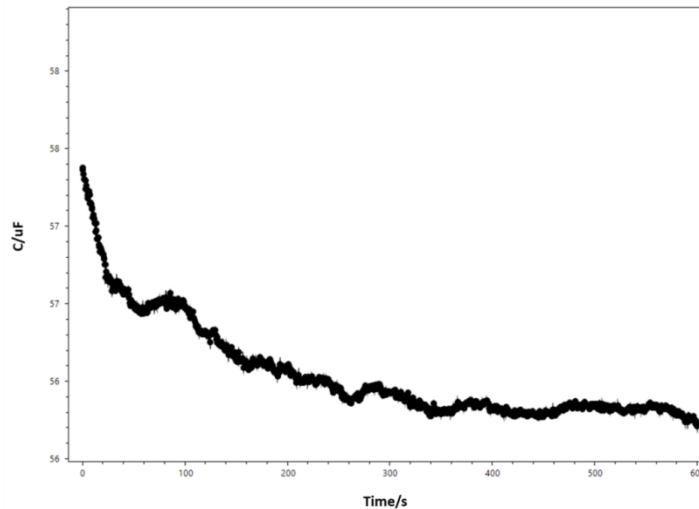
AuE/Cys: 1,4 mF

AuE/Cys/PAMAM: 0,651 mF

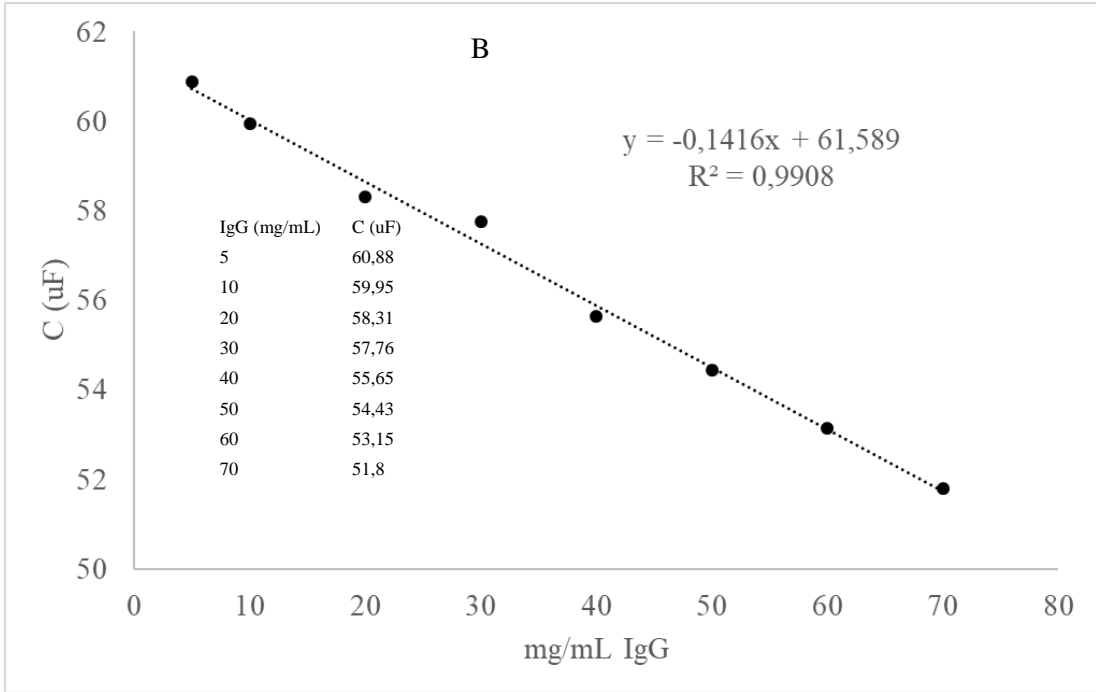
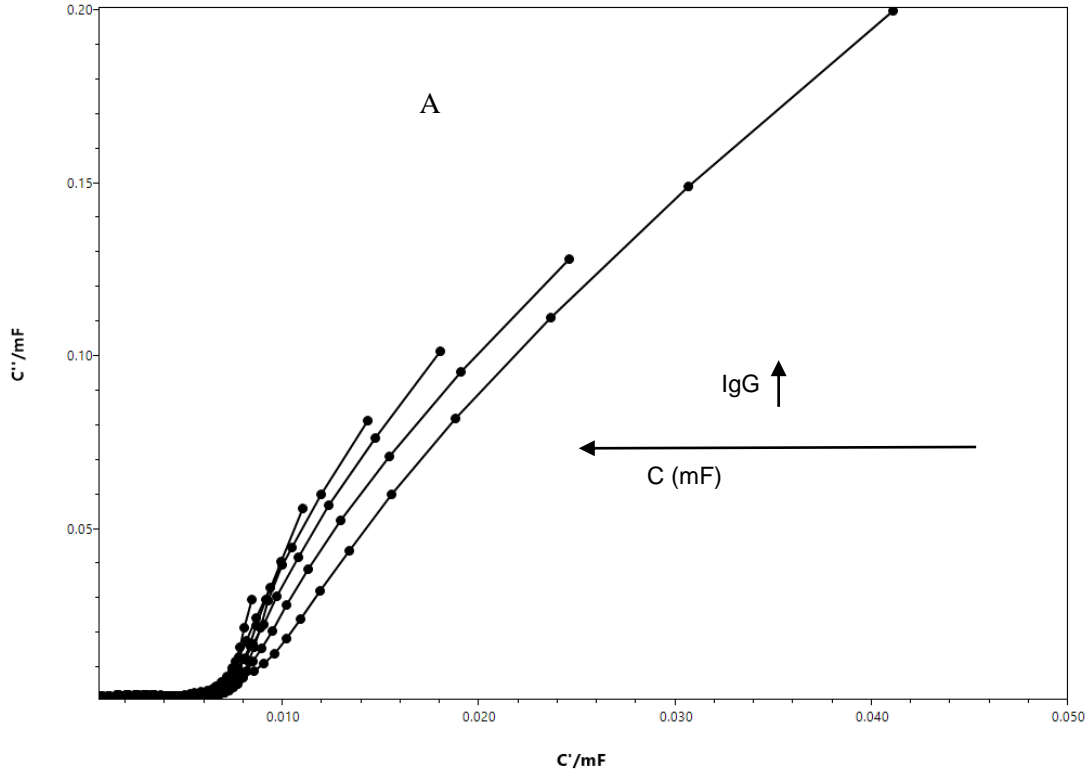
AuE/Cys/PAMAM/ProtA: 0,15 mF

AuE/Cys/PAMAM/ProtA/IgG: 0,06 mF

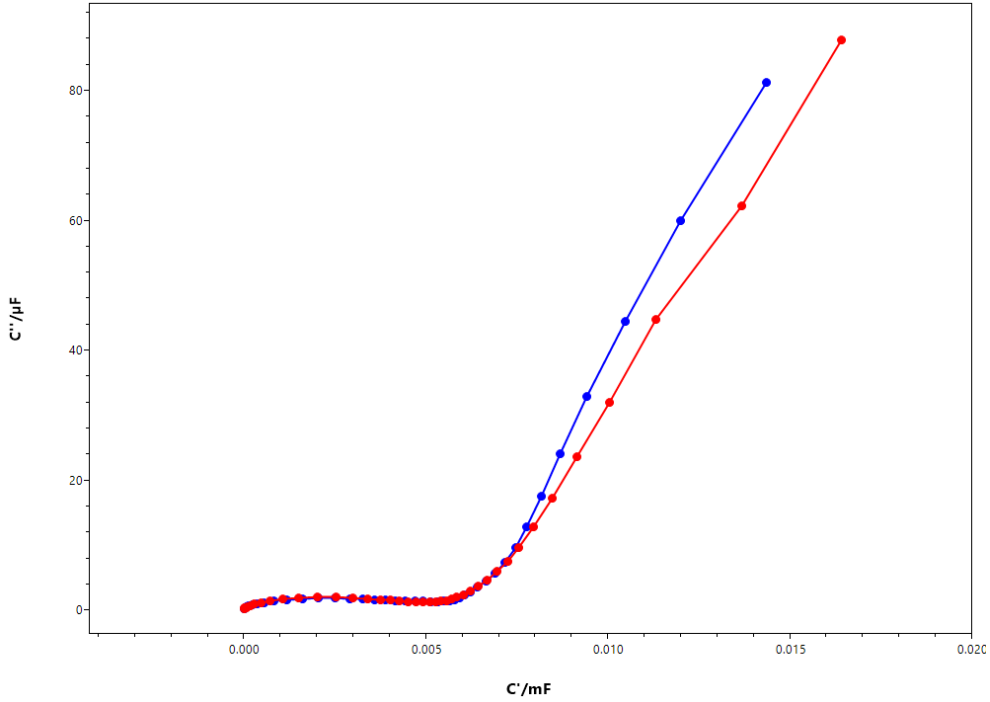
Şekil-1. Elektrot yüzey modifikasyonunun kapasitif olarak gösterilmesi; Mavi AuE, Mor AuE/Cys, Kırmızı AuE/Cys/PAMAM, Yeşil AuE/Cys/PAMAM/ProtA ve Sarı ise AuE/Cys/PAMAM/PA/IgG modifikasyonlarını göstermektedir.



Şekil-2. Zamana bağlı kapasitif azalmanın IgG ölçümü ile değişiminin gösterilmesi.



Şekil-3. A: 5-70 mg/mL arasındaki IgG konsantrasyonlarına karşı elde edilen kapasitans eğrileri görünmektedir. **B:** şekil 4A'da elde edilen kapasitif değerlerin konsantrasyona karşı çizilerek standart grafik oluşturması.



Şekil-4. Biyosensörün seçicilik ve gerçek örnek denemelerinin yapılması (Kırmızı C: 50 mg/mL standart sinyali, mavi ise 50mg/mL IgG'nin serum içerisindeki sinyalini göstermektedir).

Şekil-1'de görüldüğü gibi elektrot yüzeyinde kaplanma ile kapasitif akımdaki değişim ile kapasitans azalmıştır. Bu da yüzey modifikasyonunu doğrulamaktadır. AuE beklenildiği gibi en yüksek kapasitif akıma (mili Faraday; mF) sahipken, yüzey modifiye edildikçe her modifikasyonda, düşüş gözlenmiştir.

Şekil-2'de biyosensörün ölçüm zamanı belirlenmiştir. Buna göre 40 mg/mL IgG ölçümü için zamana bağlı olarak ölçülen kapasitif değer 260. Saniyeye kadar azalış göstermiş sonrasında ise sabit kalmıştır.

Şekil-3'te görüldüğü gibi üretilen biyosensörün ölçüm aralığı 5 ile 70 mg/mL arasında IgG ölçülebilmektedir. R2 olarak adlandırılan regresyon katsayısı 0,9908 ile 1 değerine oldukça yakındır. Buna göre en düşük tayin limiti (LOD) 1,5 mg/mL ve en düşük tayin sınırı (LOQ) ise 4,54 mg/mL olarak hesaplanmıştır.

Satın alınan serum örnekleri içerisinde yapılan deneylerde ise 50mg/mL IgG içeren örnek biyosensör ile test edilmiş ve $47,7 \pm 2,43$ mg/mL olarak bulunmuştur (Şekil-4.). Buna göre göreceli sinyal azalması, % 4,7 olarak bulunmuştur. %5'in altında olan bu sinyaldeki azalma ise güven aralığına girmektedir. Dolayısıyla biyosensörün gerçek örnekler içerisinde kullanımı da kanıtlanmıştır.

Tüm sonuçlar toplanarak, tablo şekline Tablo-1'de verilmiştir.

Tablo-1. IgG biyosensörünün performans parametreleri.

Parametre	Sonuç
Ölçüm Zamanı	400 Saniye
Ölçüm Aralığı	5-70 mg/mL
Linearite	0,9908
LOD	1,5 mg/mL
LOQ	4,54 mg/mL
Gerçek Ölçüm Farkı	50 mg/mL için 47,7 mg/mL
Matriks Etkisi	% -4,7

TARTIŞMA

COVID-19 süreci ile başlayan bulaş ve sonrasındaki bağışıklığın ölçülmesi için geliştirilen kapasitif IgG biyosensörü başarılı bir şekilde çalışmıştır. Ölçümün kapasitif olması sadece PA'ya bağlanan IgG moleküllerinin ikincil bir işaretçi moleküle ihtiyaç duymaması ve hızlı ölçümü ile direkt olarak ölçülmesi ölçümün kolaylığını yansıtmaktadır.

Hastane laboratuvarlarında gelişmiş cihazlarla yapılan ölçümlerde ölçüm süresi olarak en az 15 dakikadır. Bu nedenle bu ölçüm süresini 260 saniyeye indirerek 5 dakika içerisinde ölçüm yapabilmek son derece iyidir. Bu şekilde ülkemize katma değer sağlayabilecek bir ürünün ilk aşamaları geliştirilmiştir.

IgG normal değerlerinin, 5,6-18 mg/mL aralığında olması, olası COVID-19 geçirilmesi sonrası artan değerlerin de ölçülebilirliğini, 5-70 mg/mL aralığını ölçebildiği için sağlayabilmektedir. Düzlemsel olarak ölçüm yani lineer ölçümün doğruluğu ise 0,9908 olarak hesaplanmış bu değer de 1 sayısına çok yakın olduğundan, ölçümün linearitesi uygun olarak değerlendirilmiştir.

LOD ve LOQ değerleri yorumlandığında ise, LOQ değerinin standart grafiğin başlangıç değeri olan

5 mg/mL değerine yakın 4,54 mg/mL olarak bulunması da matematiksel olarak lineer ölçüm aralığını doğrulamaktadır.

Satın alınan serum örneklerine eklenen IgG ölçümünde ise % 5'ten daha az bir sapma olması da seçiciliğin yüksek olduğunu göstermektedir.

COVID-19 sürecine geliştirilen tanı ve ölçüm yöntemleri çok hızlı bir artış göstermiştir. COVID-19 ayrıca ülke ekonomilerinin bu şekilde ARGE çalışmalarına hızlı adapte olmasına ve geliştirdikleri ürünlerle ülkelerine katma değer sağlayacak sistemler geliştirilmesine de katkıda bulunacak ARGE çalışanlarının da önemini kanıtlamıştır. Geliştirdiğimiz bu çalışma da ise IgG tayinini dakikalar içerisinde ölçebilecek bir ölçüm sistemi geliştirerek yüksek performanslı bir ürün üretimi sergilemiş bulunmaktayız.

Çıkar çatışması: Çıkar çatışması yoktur.

Kaynaklar

1. Bournazos S, Chow SK, Abboud N, Casadeval A, Ravetch J V. Human IgG Fc domain engineering enhances antitoxin neutralizing antibody activity. J Clin Invest [Internet]. 2014; 124 (2): 725–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24401277/>
2. Schur PH. IgG subclasses - a review. Vol. 58, Annals of Allergy. 1987. p. 89–99.
3. Nimmerjahn F, Ravetch J V. Immunology: Divergent immunoglobulin G subclass activity through selective Fc receptor binding. Science (80-) [Internet]. 2005; 310 (5753): 1510–2. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/310/5753/1510>
4. Lock RJ, Unsworth DJ. Immunoglobulins and immunoglobulin subclasses in the elderly. Ann Clin Biochem. 2003; 40 (2): 143–8.
5. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. N Engl J Med. 2020; 382 (8): 727–33.
6. Wei X, Li X, Cui J. Evolutionary perspectives on novel coronaviruses identified in pneumonia cases in China. Vol. 7, National Science Review. Oxford University Press; 2020. p. 239–42.
7. Weiss SR, Leibowitz JL. Coronavirus pathogenesis [Internet]. Vol. 81, Advances in Virus Research. Academic Press Inc.; 2011. p. 85–164. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22094080/>
8. Biosensors : Fundamentals and Applications. Oxford University Press; 1987.
9. Berggren C, Bjarnason B, Johansson G. Capacitive Biosensors. Electroanalysis [Internet]. 2001 Mar 1 [cited 2021 Apr 21]; 13 (3): 173–80. Available from: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1521-4109\(200103\)13:3%3C173::AID-ELAN173%3E3.0.CO;2-B](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1521-4109(200103)13:3%3C173::AID-ELAN173%3E3.0.CO;2-B)
10. Daniels JS, Pourmand N. Label-free impedance biosensors: Opportunities and challenges [Internet]. Vol. 19, Electroanalysis. Electroanalysis; 2007. p. 1239–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18176631/>
11. Mattiasson B, Hedström M. Capacitive biosensors for ultra-sensitive assays. TrAC Trends Anal Chem [Internet]. 2015; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993615301138>
12. Uygun ZO, Dilgin Y. A novel impedimetric sensor based on molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite electrode for trace level determination of chlorpyrifos. Sensors Actuators, B Chem [Internet]. 2013 [cited 2021 Apr 12]; 188: 78–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.06.075>
13. Uygun ZO, Şahin Ç, Yılmaz M, Akçay Y, Akdemir A, Sağın F. Fullerene-PAMAM(G5) composite modified impedimetric biosensor to detect Fetuin-A in real blood samples. Anal Biochem [Internet]. 2018; 542: 11–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269717304542>