

---

## **REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

Studii privind dezvoltarea unor senzori electrochimici pentru detecția selectivă a unor microorganisme patogene

---

**Doctorand Alexandra Canciu**

---

**Conducător de doctorat Prof. dr. Cecilia Cristea**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	<b>3</b>
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	<b>3</b>
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	<b>4</b>
<b>1. Metodologie generală</b>	<b>4</b>
<b>2. Studiul 1 – Dezvoltarea unui senzor electrochimic pentru analiza individuală a enterobactinei - un siderofor al <i>Escherichia coli</i></b>	<b>4</b>
2.1. Introducere	4
2.2. Ipoteza de lucru	5
2.3. Materiale și metode	5
2.4. Rezultate și discuții	5
2.5. Concluzii	6
<b>3. Studiul 2 – Senzor electrochimic portabil pentru analiza simultană a piocianinei și enterobactinei - doi metaboliți bacterieni, din probe de mediu</b>	<b>6</b>
3.1. Introducere	6
3.2. Ipoteza de lucru	6
3.3. Materiale și metode	7
3.4. Rezultate și discuții	7
3.5. Concluzii	7
<b>4. Studiul 3 - Aptasenzor electrochimic pentru detectarea rapidă a unei proteine de suprafață a <i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>8</b>
4.1. Introducere	8
4.2. Ipoteza de lucru	8
4.3. Materiale și metode	8
4.4. Rezultate și discuții	9
4.5. Concluzii	9
<b>5. Studiul 4 - Aptasenzor electrochimic inovativ bazat pe un film nanostructurat pentru detectarea rapidă a <i>Campylobacter jejuni</i></b>	<b>9</b>
5.1. Introducere	9
5.2. Ipoteza de lucru	9
5.3. Materiale și metode	10
5.4. Rezultate și discuții	10
5.5. Concluzii	11
<b>6. Concluzii generale</b>	<b>11</b>
<b>7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	<b>11</b>
<b>BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ</b>	<b>12</b>

**CUVINTE CHEIE:** bacterii patogene, factori de virulență, senzori electrochimici, platforme electrochimice portabile, nanomateriale, aptasenzori

## **INTRODUCERE**

Detectarea și monitorizarea bacteriilor reprezintă o prioritate esențială pentru asigurarea sănătății publice și calității mediului, dar și pentru prevenirea și diminuarea răspândirii agenților patogeni. Metodele de analiză utilizate în prezent pentru identificarea bacteriilor patogene și diagnosticul bolilor infecțioase sunt reprezentate în principal de metodele microbiologice, moleculare, imunologice sau spectrometria de masă. Acestea prezintă unele inconveniente, precum durate lungi până la obținerea rezultatului, protocoale complexe de analiză, necesitatea unor echipamente sofisticate, reactivi costisitori și personal specializat, implicând costuri ridicate, ceea ce limitează aplicabilitatea lor în analizele de rutină sau în testarea descentralizată.

Senzorii și biosenzorii electrochimici reprezintă alternative promițătoare de analiză a agenților patogeni având în vedere performanțele lor analitice excelente, timp scurt de detecție, costul accesibil, ușurința de operare, potențialul de miniaturizare și de integrare în dispozitive portabile. De asemenea, aceștia pot fi funcționalizați cu diverse biomolecule și nanomateriale pentru îmbunătățirea selectivității și sensibilității.

În acest context, studiile realizate în cadrul acestei teze au avut ca scop dezvoltarea unor metode electrochimice rapide și selective pentru detecția unor microorganisme patogene, fie prin intermediul unor factori de virulență, fie cu ajutorul unor strategii biomimetice ce presupun funcționalizarea senzorilor cu aptameri.

## **STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII**

O amenințare globală asociată cu un risc înalt de mortalitate este reprezentată de bacteriile patogene care au dezvoltat rezistență la antimicrobiene (RAM) și care sunt implicate în infecții asociate asistenței medicale (IAAM)<sup>1</sup>. Se estimează că RAM bacteriană a fost direct responsabilă pentru 1,27 milioane de decese la nivel global în 2019<sup>2</sup>, iar mortalitatea atribuită RAM ar putea crește dramatic până în 2050, cu peste 10 milioane de decese prevăzute anual<sup>3</sup>. În Europa, sunt estimate 4,8 milioane de cazuri de IAAM anual în spitale de urgență<sup>4</sup>.

Metodele convenționale actuale de diagnostic inclus în principal identificarea microorganismelor prin cultivarea pe plăci de agar, imunotestele (ELISA, imunocromatografia), metodele moleculare bazate pe amplificarea acidului nucleic (qPCR, LAMP), spectrometria de masă<sup>1</sup>. Deși oferă specificitate și sensibilitate ridicate, permițând detecția cu acuratețe, aceste metode au o aplicabilitate limitată din cauza naturii lor laborioase și consumatoare de timp, protocoalelor complicate de analiză cu proceduri complexe pentru pretratamentul probelor, necesității de echipamente și reactivi costisitori și de personal calificat. Mai mult, majoritatea nu sunt potrivite pentru utilizare pe teren, în zone greu accesibile și cu resurse limitate<sup>5,6</sup>.

În ultimii ani, s-a constatat o cerere considerabilă de detectare descentralizată în spațiul clinic, dar și pentru analizele de mediu, dispozitivele de tip *point-of-care* (POC) fiind opțiuni de interes. Pentru a dezvolta astfel de dispozitive, elaborarea și validarea de noi metode de analiză sensibile și rapide sunt primordiale <sup>5</sup>.

(Bio)senzorii electrochimici s-au remarcat ca abordări atractive pentru analiza și screeningul prezenței agenților patogeni datorită avantajelor lor, fiind ideali pentru dezvoltarea platformelor de diagnostic robuste și fiabile <sup>7,8</sup>. Utilizarea nanomaterialelor și elementelor biomimetice pentru funcționalizarea platformelor, a facilitat dezvoltarea de noi strategii sensibile și selective pentru detectarea în sistem descentralizat a microorganismelor patogene <sup>9,10</sup>.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

### 1. Metodologie generală

Reactivii utilizați au fost de puritate analitică și au fost folosiți fără purificare suplimentară. Experimentelor electrochimice s-au realizat cu ajutorul unor potențiostate Autolab PGSTAT302N (Metrohm, Spania) și PGSTAT-12 (Eco Chemie, Olanda) sau folosind echipamente portabile de analiză precum potențiostatele SensitBT, EmStat Blue și minipotențiostatele ultraportabile SensiSmart (PalmSens B.V., Olanda), cu software-uri dedicate operate cu dispozitive inteligente (tabletă sau smartphone).

Comportamentul electrochimic al analiților a fost evaluat prin voltametrie ciclică (CV) și voltametrie puls diferențială (DPV). Etapele de dezvoltare și optimizare ale platformelor electrochimice au fost caracterizate prin CV, DPV și spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS) folosind ca sondă redox soluția de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5 mM în KCl 0,1 M, iar performanțele analitice (limită de detecție, limită de cuantificare, domeniu de liniaritate, sensibilitate) ale senzorilor au fost urmărite prin DPV și EIS. De asemenea, au fost evaluate selectivitatea și aplicabilitatea metodelor pe probe reale.

Estimarea concentrației de microorganisme din culturile bacteriene testate în *Studiul 3* și în *Studiul 4* s-a realizat prin determinarea numărului total de bacterii exprimat ca unități formatoare de colonii (UFC) care au crescut pe mediile de cultură.

### 2. Studiu 1. Dezvoltarea unui senzor electrochimic pentru analiza individuală a enterobactinei – un siderofor al *Escherichia coli*

#### 2.1. Introducere

Detectarea rapidă și descentralizată a bacteriilor din probele biomedicale, de mediu și alimentare reprezintă un subiect de interes în cercetarea actuală mai ales în contextul apariției tulpinilor multirezistente la antibiotice <sup>11,12</sup>. *E. coli* este o cauză proeminentă a diferitelor infecții, provocând unele afecțiuni severe, inclusiv sindromul dizenteric și sindromul hemolitic uremic <sup>13-15</sup>. Enterobactina (Ent) este sideroforul

predominant secretat de către *E. coli*, fiind o moleculă electroactivă, importantă pentru colonizarea bacteriană și procesele patogene <sup>16</sup>.

Identificarea de noi markeri reprezintă o strategie atractivă pentru detectarea indirectă, dar mai simplă și mai sigură a agenților patogeni care ar putea înlocui metodele existente aplicate în analiza curentă. Senzorii portabili și electrozii imprimați în laborator prezintă alternative promițătoare, oferind analize rapide, la fața locului.

## 2.2. Ipoteza de lucru

Primul obiectiv al studiului a presupus investigarea amprentei electrochimice a Ent prin studierea semnalului caracteristic pe diferite materiale electrodice și alegerea celui mai potrivit material pentru dezvoltarea senzorilor electrochimici. Astfel, platforma a fost elaborată prin modificarea suprafeței de lucru alese cu un electrolit semisolid și nanoparticule metalice.

Senzorii electrochimici dezvoltati pe baza electrozi serigrafiați (SPE) comerciali și imprimați manual au fost aplicați în continuare pentru detectarea Ent din probe standard, medii de cultură și probe de apă. În plus, s-au imprimat celulele electrochimice și pe o mânășă medicală, constituind un prim pas în fabricarea unui senzor purtabil (*wearable*) adecvat pentru analiza și screeningul descentralizat.

## 2.3. Materiale și metode

S-au utilizat SPE de grafit, aur și platină (Metrohm, Spania) și electrozi din carbon vitros (GCE) (BASi, SUA). Celulele electrochimice elaborate în laborator au fost imprimate manual cu cerneluri conductoare prin serigrafiere.

Pentru elaborarea platformei, suprafața electrozilor a fost acoperită cu o suspensie de hidrogel de agar 0,5% (m/V) în tampon fosfat salin (PBS) 20 mM cu pH 7,4 și nanoaliaj Au/Ag (Nanovex, Spania) într-un raport de 3:1.

Comportamentul electrochimic al Ent (Sigma Aldrich, SUA) a fost evaluat în probe standard și în două medii de cultură diferite selective pentru bacteriile Gram-negative, agar cu lactoză Drigalski (DLA) și bulion lisogen Miller (ML). Prezența Ent a fost evaluată în probe de apă netratate și tratate (ape uzate, ape subterane și apă de la robinet).

## 2.4. Rezultate și discuții

Amprenta electrochimică a Ent a fost evaluată prin DPV pe diferite configurații de electrozi. Cea mai mare intensitate a curentului a fost observată pe suprafața pe bază de grafit care a fost ales ca material electrodic optim pentru dezvoltarea platformei. Suprafața de lucru a fost modificată cu un amestec de hidrogel de agar și nanoaliaj Au/Ag (3:1), prezența nanoparticulelor de metale nobile facilitând transferul de electroni și determinând creșterea sensibilității.

Configurația a fost testată în soluții standard de Ent și în medii de cultură. În probele standard preparate în PBS 20 mM cu pH 7,4, intensitatea curentului a crescut proporțional cu concentrația pe domeniul de liniaritate cuprins între 1,25  $\mu\text{M}$  și 37,5  $\mu\text{M}$ , cu o limită de detecție (LOD) de 0,41  $\mu\text{M}$ . Curentul a variat proporțional cu concentrația de Ent și în ML (6,25  $\mu\text{M}$  - 37,5  $\mu\text{M}$ ) și în DLA (2,5  $\mu\text{M}$  - 37,5  $\mu\text{M}$ ). S-a utilizat același protocol folosind senzori pe bază de SPE imprimați manual în laborator pe un substrat

polimeric flexibil și pe degetele unei mănuși medicale. Sensibilitatea a fost ușor mai scăzută în cazul platformelor imprimate manual comparativ cu SPE comerciali, diferențele fiind date de dimensiunile diferite ale suprafeței electrodului de lucru și de tipul de cerneală conductoare pe bază de carbon.

Platforma elaborată a fost evaluată și în prezența unui alt marker bacterian, piocianina (PyoC), specifică metabolismului *P. aeruginosa*. Semnalele corespunzătoare oxidării ambilor analiți țintă au putut fi observate, demonstrând capacitatea de a determina indirect și simultan prezența *P. aeruginosa* și *E. coli*.

Prezența Ent a fost monitorizată și în matrici complexe de tipul apelor uzate, subterane și de la robinet. Analitul țintă a putut fi detectat în probele de apă, cu regăsiri satisfăcătoare (peste 80%) în principal în apele uzate limpezite și efluenții epurate pentru toate concentrațiile testate.

### 2.5. Concluzii

Ent, un siderofor secretat de *E. coli*, a fost pentru prima dată studiat privind comportamentul său electrochimic. Analitul a fost detectat cu succes, fără interferențe majore, în medii de cultură și în probe de apă, având ca posibile aplicații monitorizarea Ent și, indirect, a *E. coli* din mediu. Noutatea studiului a constat în utilizarea unei configurații imprimate pe o mănușă medicală pentru a detecta Ent în prezența unui alt marker bacterian (PyoC). Astfel de noi platforme mobile și portabile oferă o oportunitate considerabilă pentru screeningul descentralizat rapid cu costuri reduse.

## 3. Studiu 2. Sensor electrochimic portabil pentru analiza simultană a piocianinei și enterobactinei, doi metaboliți bacterieni, din probe de mediu

### 3.1. Introducere

Calitatea apei trebuie asigurată și monitorizată în conformitate cu prevederile și recomandările emise de autoritățile competente. Conform OMS, agenții patogeni prezenți în apă asociați cu un risc ridicat și moderat pentru sănătatea umană sunt: *E. coli* O157:H7, *Legionella* spp., *P. aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, norovirus, *Cryptosporidium* și *Giardia* <sup>17</sup>.

Testul Colilert® este o metodă aprobată de USEPA pentru determinarea *E. coli* care se bazează pe fluorescența produsă de interacțiunea enzimelor bacteriene specifice cu substratul lor <sup>18</sup>. În ciuda sensibilității sale ridicate, metoda necesită incubare de 18h la 35 °C ± 0,5 °C, ceea ce face imposibilă detectarea contaminării în timp real.

Dezvoltarea de metode și tehnologii moderne este crucială pentru detectarea rapidă a patogenilor din apă <sup>19</sup>. Prin urmare, metodele de detectare *in-situ*, folosind senzori portabili care oferă rezultate imediate fără a fi nevoie de transportul probelor constituie soluții valoroase pentru gestionarea eficientă a acestor riscuri.

### 3.2. Ipoteza de lucru

În acest studiu, s-a urmărit dezvoltarea unui sensor electrochimic portabil ușor de utilizat pentru detectarea simultană a metaboliților bacterieni Ent și PyoC. Studiul

descrie aplicarea pentru prima dată a unei metodei electrochimice optimizate pentru detectarea simultană a *E. coli* și *P. aeruginosa* în probe de apă și validarea acesteia în trei laboratoare din Europa. Scopul studiului a fost de a evalua și valida performanța și aplicabilitatea tehnologiei dezvoltate, mai precis a senzorului portabil electrochimic denumit PathoTeSTICK pentru testarea rapidă pe teren a contaminării apei.

### 3.3. Materiale și metode

Senzorii electrochimici, cu un design optimizat (PathoTeSTICK), au fost fabricați utilizând SPE pe bază de carbon. Tehnica de detecție electrochimică utilizată în testele de validare a fost reprezentată de DPV cu o durată de 16 s.

Validarea a fost efectuată atât pentru tulpinile de *E. coli* și *P. aeruginosa* cultivate în laborator (tulpini standard și de mediu), în diferite medii de cultură, cât și pe probe reale de apă (apă de suprafață, apă uzată și apă potabilă). Toate măsurătorile au fost efectuate în triplicat. Probele de apă uzată au fost colectate de la diferite stații de epurare din România, Spania și Olanda. Din aceste probe au fost preparate diluții zecimale seriale în apă potabilă distilată sau sterilă și analizate prin imersarea senzorului în probă.

### 3.4. Rezultate și discuții

În urma analizei simultane a PyoC și Ent, LOD obținute au fost de 165 nM (35 ng/mL pentru PyoC, respectiv 110 ng/mL pentru Ent) sugerând posibilitatea detectării simultane a *E. coli* și *P. aeruginosa* utilizând metoda DPV și senzorii dezvoltate.

Rezultatele obținute cu metoda electrochimică au fost comparate cu metode standard, metoda creșterii pe plăci de cultură și testele Colilert MPN. Tehnologia de detectare a fost aplicată cu succes pentru detectarea contaminării microbiene în matricile de apă, demonstrând astfel utilitatea senzorului ca metodă de alertă rapidă.

În urma studiilor de selectivitate, s-a reușit detectarea tuturor celor 10 tulpini de *E. coli* și 8 tulpini de *P. aeruginosa* testate utilizând metoda dezvoltată. Dintre cele 18 tulpini non-*E. coli* și non-*P. aeruginosa* testate, două tulpini au generat un semnal pentru PyoC și trei alte specii producătoare de Ent au fost detectate cu PathoTeSTICK.

Parametrii obținuți în timpul validării intra-laborator au fost confirmați prin testarea de probe de apă contaminate cu bacterii în validarea interlaboratoare. În starea sa actuală conceptul utilizat pentru dezvoltarea PathoTeSTICK are o aplicabilitate limitată la analiza apelor contaminate cu peste  $10^6$  UFC/100 mL *E. coli* și  $10^5$  UFC/100 mL *P. aeruginosa*<sup>20,21</sup>. În ciuda LOD destul de mari, metoda de detectare optimizată este simplă, rapidă și potrivită pentru analize pe teren, în sistem descentralizat.

### 3.5. Concluzii

Versiunea finală a senzorului electrochimic portabil în formă de stick, PathoTeSTICK, și metoda optimizată de testare au fost adaptate pentru a detecta *in situ* *E. coli* și *P. aeruginosa* în probe complexe de apă într-un interval scurt de timp (sub 1 min), fără nicio etapă de pretratament. În plus, costul redus, operarea ușoară chiar și de către utilizatorii neexperimentați și portabilitatea sunt alte caracteristici cheie ale metodei propuse.

## 4. Studiu 3. Aptasenzor pentru detectarea rapidă a proteinei A de pe suprafața *Staphylococcus aureus*

### 4.1. Introducere

*S. aureus* face parte din grupul de "superbacterii" ESKAPE, care mai include *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *A. baumannii* și *P. aeruginosa*, având un impact extraordinar asupra sistemelor de sănătate la nivel global <sup>22</sup>. Infecțiile cu *S. aureus* sunt dificil de gestionat din cauza rezistenței frecvente la antibiotice a tulpinilor, dintre care varianta rezistentă la metilicilină (MRSA) determină infecții cu durate prelungite de spitalizare, cu mortalitate și morbiditate sporite. PrA este o proteină de pe suprafața peretelui celular stafilococic cu roluri multiple în patogenitatea *S. aureus* <sup>23</sup>.

Metodele convenționale aprobate pentru diagnosticarea unei infecții cu *S. aureus* includ cultivarea microorganismelor pe medii de cultură, tehnicile moleculare și cele imunoenzimatic. Deoarece aceste tehnici de laborator implică personal cu expertiză și utilizarea unor echipamente specifice, au fost dezvoltate kituri de testare rapidă pentru analize simplificate, însă de multe ori acuratețea acestora este scăzută <sup>23</sup>.

### 4.2. Ipoteza de lucru

În acest studiu a fost dezvoltat un aptasenzor electrochimic nemarcat pentru detectarea rapidă și selectivă a unei componente a peretelui celular al *S. aureus*, mai precis a PrA. În acest sens, SPE comerciali cu suprafața de lucru din Au (AuSPE) au fost funcționalizați cu un aptamer (APT) specific și incubați cu ținta din probe de ser uman și culturi bacteriene în vederea detectării impedimetrice.

### 4.3. Materiale și metode

PrA, albumina serică bovină (BSA), albumina serică umană (HSA), interleukina-6 (IL-6) și serul uman comercial au fost achiziționate de la Sigma Aldrich (Merck, Germania). Toate soluțiile au fost preparate în apă liberă de nucleaze (Invitrogen, SUA). Secvența de APT PA#2/8[S1-58], specifică pentru PrA <sup>24</sup>, utilizată în acest studiu a fost nemarcată și modificată cu tiol la capătul 3' (Eurogentec, Belgia). Cor-APT (Eurogentec, Belgia) și Gli-APT (AlphaDNA, Canada) au fost aleși pentru studiul de selectivitate. Soluțiile de APT au fost preparate în tampon TRIS 10 mM cu pH = 7,2.

Protocolul de dezvoltare a aptasenzorului a implicat trei etape de lucru: (1) imobilizarea APT pe suprafața AuSPE (Metrohm-DropSens, Spania), (2) blocarea situsurilor neocupate pe suprafața de Au și (3) incubarea cu ținta. După fiecare etapă, platforma a fost caracterizată electrochimic prin DPV și EIS.

S-au analizat probe de ser uman comercial îmbogățite cu PrA, diluate 1:10 și 1:100 cu tampon TRIS cu pH 7,2. Suspensiile bacteriene s-au obținut prin creșterea tulpinii de *S. aureus* ATCC25923 (Tody Laboratories, România) în bulion nutritiv 24 h la 37°C, apoi numărate cu metoda diluțiilor în serie. Aptasenzorul a fost incubat cu suspensiile bacteriene 30 min, după care testarea probelor s-a realizat prin metoda DPV.



#### 4.4. Rezultate și discuții

APT a fost imobilizat pe suprafața AuSPE printr-o procedură rapidă și eficientă de amperometrie multipuls (MPA), urmată de o etapă de blocare pentru a preveni adsorbția nespecifică care s-a realizat de asemenea prin MPA. Afinitatea dintre APT PA#2/8[S1-58] și PrA a fost confirmată prin studii de rezonanță plasmonică de suprafață (SPR), fiind obținută o constantă de disociere ( $K_{D, \text{cinetic}}$ ) de  $180,44 \pm 43,22$  nM.

După incubarea aptasenzorului cu PrA, detectarea țintei s-a efectuat indirect prin DPV și EIS într-o sondă redox. Aptasenzorul a demonstrat capacitatea de a detecta PrA pe un domeniu larg de concentrații (de la 25 nM la 1000 nM), fiind determinată o LOD de 8,33 nM. Selectivitatea aptasenzorului față de PrA a fost demonstrată în matrici complexe în raport cu trei alte proteine. În plus, selectivitatea a fost evaluată prin imobilizarea altor două secvențe de oligonucleotide (Cor-APT și Gli-APT).

Performanțele analitice ale aptasenzorului au fost evaluate și pe probe de ser îmbogățite cu un număr cunoscut de colonii de *S. aureus*, dar și în probe de culturi bacteriene. Rezultatele DPV au indicat faptul că interacțiunea specifică dintre APT și PrA a avut loc cu succes, iar semnalul înregistrat a fost proporțional cu concentrația țintei. Etapele modificării platformei și captarea țintei (PrA și *S. aureus*) au fost confirmate prin microscopie electronică de baleiaj (SEM) și microscopie de forță atomică (AFM).

#### 4.5. Concluzii

În acest studiu s-a dezvoltat cu succes un aptasenzor electrochimic pentru detecția PrA, o proteină specifică *S. aureus*. Etapele de elaborare și incubare au implicat doar 35 min până la obținerea rezultatului. Aptasenzorul a demonstrat capacitatea de a detecta PrA pe un domeniu liniar larg cu o LOD de 8,33 nM. Performanța aptasenzorului a fost evaluată și în medii complexe, în ser uman și culturi de *S. aureus*. Rapiditatea și specificitatea metodei propuse cu aplicabilitate dovedită pe probe reale sugerează potențialul pentru dezvoltarea unui dispozitiv de testare de tip POC.

### 5. Studiu 4. Aptasenzor inovativ pentru detecția rapidă a *Campylobacter jejuni*

#### 5.1. Introducere

*C. jejuni* este o cauză majoră de gastroenterită bacteriană la om la nivel mondial cu o incidență ridicată și impact socio-economic dramatic, reprezentând o etiologie importantă a mortalității infantile în țările în curs de dezvoltare. Conform OMS, anual sunt raportate 550 de milioane de cazuri de boli provocate de consumul de alimente contaminate, frecvent la copii sub cinci ani <sup>25</sup>. În 2022, majoritatea cazurilor (61,3%) de zoonoze au fost reprezentate de campylobacterioză <sup>26</sup>. Dezvoltarea de metode rapide și selective pentru detecția *C. jejuni* este de real interes.

#### 5.2. Ipoteza de lucru

Scopul acestui studiu a fost dezvoltarea unui aptasenzor electrochimic de tip „label-free” pentru detecția specifică și cu sensibilitate ridicată a *C. jejuni*. Sensibilitatea a fost obținută prin funcționalizarea suprafeței senzorului cu nanomateriale, mai exact prin decorarea cu nanostructuri de Au electrogenerate urmată

de funcționalizarea cu un amestec nanohibrid de MXene:AuNP. Specificitatea față de țintă a fost asigurată prin imobilizarea APT (secvența ONS-23 și varianta truncată a acesteia, ONS-23TA) prin MPA. Aptasenzorul a fost testat cu probe dintr-o cultură a unei tulpini de *C. jejuni*. Detectarea concentrației de bacterii s-a realizat indirect prin monitorizarea semnalului impedimetric înregistrat pentru sonda redox.

### 5.3. Materiale și metode

S-au utilizat SPE pe bază de carbon (C-SPE) (Metrohm, Spania), acid tetracloroauric ( $\text{HAuCl}_4$ ) (Merck, SUA), suspensie de AuNP de 50 nm (Nanovex Biotechnologies, Spania), dispersie  $\text{Ti}_3\text{C}_2\text{T}_x$  (MXene) 1 mg/mL (Nanochemazone, Canada). Secvențele APT specifice *C. jejuni* (ONS-23 și ONS-23TA)<sup>27</sup> au fost sintetizate cu grupări tiol la capătul 3' (FRIZ Biochem, Germania). Testele de interacțiune între APT și *C. jejuni* s-au efectuat prin spectrofotometrie în domeniul UV ( $\lambda = 260$  nm).

Protocolul de dezvoltare a aptasenzorului a presupus patru etape de lucru: (1) obținerea platformei compozite nanostructurate pe bază de AuNP/MXene; (2) imobilizarea APT prin MPA; (3) blocarea situsurilor neocupate pe suprafața nanostructurată; (4) incubarea cu ținta. După fiecare etapă, platforma a fost caracterizată electrochimic prin DPV și EIS, și prin tehnici de microscopie, AFM și SEM.

Aptasenzorul a fost testat prin incubare 1 h cu suspensii de *C. jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 9428 (TCS Biosciences Ltd., UK) în agar Brucella (prin incubare 48 h la 42°C în microaerofilie). S-au testat diluții în TRIS cu aptasenzori diferiți, urmărind semnalul impedimetric, iar rezultatele s-au corelat cu concentrațiile coloniilor dezvoltate.

### 5.4. Rezultate și discuții

Prima etapă în dezvoltarea aptasenzorului a constat în depunerea electrochimică de nanostructuri de Au pe suprafața C-SPE pentru a facilita funcționalizarea ulterioară cu APT tiolat prin legătură Au-S. S-au testat două protocoale de electrodepunere, metoda aleasă fiind CV datorită reproductibilității mai bune a platformei comparativ cu depunerea prin CA. Suprafața a fost funcționalizată în continuare cu un film compozit de MXene și AuNP, rezultatele cele mai bune fiind obținute în cazul depunerii unui singur strat de amestec conținând proporții egale din cele două nanomateriale. S-a ales imobilizarea electrochimică a APT printr-o procedură MPA optimizată (utilizând potențialele alternative + 0,5 V și - 0,2 V și durată de 60 s) care a generat o acoperire mult mai eficientă față de incubarea clasică în timp.

Pentru a evalua aplicabilitatea metodei, aptasenzorul optimizat a fost incubat cu o serie de diluții dintr-o suspensie cu bacteriile cultivate. Semnalul analitic a variat liniar cu concentrația de *C. jejuni* pentru domeniul cuprins între  $10^2$  -  $10^{10}$  UFC/mL, în cazul ambelor secvențe de APT utilizate. S-a estimat o LOD egală cu limita de cuantificare, de  $10^2$  UFC/mL. Sensibilitatea metodei a fost mai crescută pentru APT truncat.

Imaginile SEM au evidențiat prezența ambelor nanomateriale (AuNP și MXene) și distribuția relativ uniformă pe suprafața de carbon. După imobilizarea *C. jejuni* s-a observat distribuția destul de uniformă a bacteriilor pe suprafața scanată, dar și forma

sigmoidă specifică acestei bacterii. Prezența *C. jejuni* după incubarea aptasenzorilor cu suspensiile cu bacterii a fost confirmată și prin analiza AFM.

### 5.5. Concluzii

În acest studiu, a fost elaborat și optimizat cu succes un aptasenzor electrochimic pentru detecția indirectă în sistem "label-free" a *C. jejuni*. Performanța aptasenzorului a fost dovedită pe un domeniu larg de concentrații ( $10^2 - 10^{10}$  UFC/mL), obținând o LOD de  $10^2$  UFC/mL. Cercetarea subliniază potențialul aptamerilor și a metodelor electrochimice în dezvoltarea de platforme utile pentru detecția specifică și sensibilă în aproximativ 70 min a *C. jejuni*, reducând timpul de așteptare comparativ cu metoda standard a culturilor pe plăci. Studiul poate oferi noi perspective în ceea ce privește depistarea și monitorizarea infecțiilor (zoonozelor) în diverse medii de contaminare.

## 6. Concluzii generale

În această teză s-au dezvoltat dispozitive electrochimice inovative pentru detectarea bacteriilor patogene *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* și *C. jejuni*. Au fost analizați markeri bacterieni de tipul sideroforilor și factorilor de virulență (PyoC și Ent) caracteristici pentru *P. aeruginosa*, respectiv *E. coli* pe baza semnalului electrochimic, acesta fiind ulterior corelat cu prezența bacteriilor corespunzătoare. A doua direcție, vizând detectarea componentelor structurale (PrA), respectiv a celulelor bacteriene integrale (*C. jejuni*), s-a bazat pe interacțiunea specifică cu elemente biomimetice de tipul aptamerilor. Lucrarea de față reprezintă încă o dovadă privind versatilitatea metodelor electrochimice, dar și utilitatea aplicării acestora pentru detectarea unor markeri bacterieni, respectiv a bacteriilor patogene.

## 7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Această teză de doctorat abordează o problemă actuală, oferind alternative la metodele convenționale de detectare a bacteriilor patogene cu scopul reducerii prevalenței IAAM și RAM. A fost elaborată, pentru prima dată, o metodă simultană rapidă și simplă pentru detectarea Ent și PyoC. Senzorii au fost integrați în dispozitive de tip mănuși, aplicate în detectarea prezenței *E. coli* și *P. aeruginosa*. Dispozitivul PathoTeSTICK dezvoltat a fost validat în trei laboratoare din Europa pe probe de mediu.

Teza propune abordări moderne precum utilizarea aptamerilor pentru detectarea specifică a unor ținte inactive electrochimic, PrA și celula *C. jejuni*. Detectarea *S. aureus* prin intermediul PrA s-a realizat din fluide biologice (ser) și din culturi bacteriene. Aptasenzorul elaborat pentru *C. jejuni* pe baza unei platforme inovative cu MXene reprezintă unul dintre puținii senzori electrochimici pentru această bacterie, majoritatea studiilor raportate referindu-se la imunosenzori colorimetrici.

În plus, s-au utilizat potențiostate miniaturizate portabile pentru efectuarea analizelor în sistem descentralizat, pe teren, reprezentând un punct de plecare pentru dezvoltarea de dispozitive de tip POC pentru bacterii patogene.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Canciu A, Cernat A, Tertis M, Graur F, Cristea C. Tackling the issue of healthcare associated infections through point-of-care devices. Vol. 161, TrAC - Trends in Analytical Chemistry. Elsevier B.V.; 2023. p. 116983.
2. Antimicrobial resistance [Internet]. [cited 2024 Aug 17]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
3. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. 2022;399(10325):629–55.
4. Suetens C, Kärki T, Diamantis P. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals 2022-2023. 2022; Available from: [www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu)
5. Wang C, Liu M, Wang Z, Li S, Deng Y, He N. Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices. *Nano Today*. 2021 Apr 1;37:101092.
6. Capatina D, Feier B, Hosu O, Tertis M, Cristea C. Analytical methods for the characterization and diagnosis of infection with *Pseudomonas aeruginosa*: A critical review. *Anal Chim Acta*. 2022 Apr 29;1204:339696.
7. Canciu A, Tertis M, Hosu O, Cernat A, Cristea C. Modern Analytical Techniques for Detection of Bacteria in Surface and Wastewaters. *Sustainability*. 2021;13(13):7229.
8. Wang C, Liu M, Wang Z, Li S, Deng Y, He N. Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices. *Nano Today*. 2021 Apr 1;37:101092.
9. Shen Y, Zhang Y, Gao ZF, Ye Y, Wu Q, Chen H yuan, et al. Recent advances in nanotechnology for simultaneous detection of multiple pathogenic bacteria. *Nano Today*. 2021;38(101121).
10. Stefan G, Hosu O, De Wael K, Lobo-Castañón MJ, Cristea C. Aptamers in Biomedicine: Selection Strategies and Recent Advances. *Electrochim Acta*. 2021 Feb;137994.
11. Wang Y, Xiao T, Zhu Y, Ye J, Yang K, Luo Q, et al. Economic Burden of Patients with Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli*. *Infect Drug Resist*. 2020;13:3583.
12. Bonten M, Johnson JR, Van Den Biggelaar AHJ, Georgalis L, Geurtsen J, Ibarra De Palacios P, et al. Epidemiology of *Escherichia coli* Bacteremia: A Systematic Literature Review. *Clinical Infectious Diseases*. 2021;72(7):1211–9.
13. Schwidder M, Heinisch L, Schmidt H. Genetics, toxicity, and distribution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin. Vol. 11, *Toxins*. MDPI AG; 2019.
14. Newell DG, La Ragione RM. Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies? *Transbound Emerg Dis*. 2018 May 1;65:49–71.
15. Jiang L, Yang W, Jiang X, Yao T, Wang L, Yang B. Virulence-related O islands in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Vol. 13, *Gut Microbes*. Taylor and Francis Ltd.; 2021.

16. Khasheii B, Mahmoodi P, Mohammadzadeh A. Siderophores: Importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry. *Microbiol Res.* 2021 Sep 1;250:126790.
17. World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality, 4th edition, incorporating the 1st addendum [Internet]. Geneva, Switzerland; 2017 [cited 2024 Jan 16]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950>
18. Colilert - IDEXX US [Internet]. [cited 2024 Apr 8]. Available from: <https://www.idexx.com/en/water/water-products-services/colilert/>
19. Moreira NA, Bondelind M. Safe drinking water and waterborne outbreaks. Vol. 15, *Journal of Water and Health*. IWA Publishing; 2017. p. 83–96.
20. Vestergaard LS, Olsen KE, Stensvold R, Böttiger BE, Adelhardt M, Lisby M, et al. Outbreak of severe gastroenteritis with multiple aetiologies caused by contaminated drinking water in Denmark, January 2007. *Eurosurveillance.* 2007 Mar 29;12(3):3164.
21. Jalava K, Rintala H, Ollgren J, Maunula L, Gomez-Alvarez V, Revez J, et al. Novel Microbiological and Spatial Statistical Methods to Improve Strength of Epidemiological Evidence in a Community-Wide Waterborne Outbreak. *PLoS One.* 2014 Aug 22;9(8):e104713.
22. Kouijzer IJE, Fowler VG, ten Oever J. Redefining *Staphylococcus aureus* bacteremia: A structured approach guiding diagnostic and therapeutic management. *Journal of Infection.* 2023 Jan 1;86(1):9–13.
23. Tătaru AM, Canciu A, Tertîș M, Cristea C, Cernat A. *Staphylococcus aureus* – Review on potential targets for sensors development. *Bioelectrochemistry.* 2023 Oct 1;153:108492.
24. Stoltenburg R, Schubert T, Strehlitz B. In vitro selection and interaction studies of a DNA aptamer targeting Protein A. *PLoS One.* 2015 Jul 29;10(7):e0134403.
25. *Campylobacter* [Internet]. [cited 2024 Sep 9]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>
26. The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA Journal.* 2023 Dec 1;21(12).
27. Kim YJ, Kim HS, Chon JW, Kim DH, Hyeon JY, Seo KH. New colorimetric aptasensor for rapid on-site detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken carcass samples. *Anal Chim Acta.* 2018 Oct 31;1029:78–85.

---

**DOCTORAL THESIS SUMMARY**

Studies for the development of electrochemical sensors for the selective detection of pathogen microorganisms

---

**PhD candidate Alexandra Canciu**

---

**PhD supervisor Prof. dr. Cecilia Cristea**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	<b>16</b>
<b>STATE OF THE ART</b>	<b>16</b>
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	<b>17</b>
<b>1. General methodology</b>	<b>17</b>
<b>2. Study 1 - Development of an electrochemical sensor for the individual assessment of enterobactin - a siderophore of <i>Escherichia coli</i></b>	<b>17</b>
2.1. Introduction	17
2.2. Objectives	18
2.3. Materials and methods	18
2.4. Results and discussions	18
2.5. Conclusions	19
<b>3. Study 2 - Portable electrochemical sensor for the simultaneous assessment of pyocyanin and enterobactin, two bacterial metabolites, in environmental samples</b>	<b>19</b>
3.1. Introduction	19
3.2. Objectives	19
3.3. Materials and methods	20
3.4. Results and discussions	20
3.5. Conclusions	20
<b>4. Study 3 - Electrochemical aptasensor for the rapid detection of a surface protein of <i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>21</b>
4.1. Introduction	21
4.2. Objectives	21
4.3. Materials and methods	21
4.4. Results and discussions	21
4.5. Conclusions	21
<b>5. Study 4 - Innovative electrochemical aptasensor based on a nanostructured film for the rapid detection of <i>Campylobacter jejuni</i></b>	<b>22</b>
5.1. Introduction	22
5.2. Objectives	22
5.3. Materials and methods	23
5.4. Results and discussions	23
5.5. Conclusions	24
<b>6. General conclusions</b>	<b>24</b>
<b>7. The originality and innovative contributions of the thesis</b>	<b>24</b>
<b>SELECTED REFERENCES</b>	<b>25</b>

**KEY WORDS:** pathogenic bacteria, virulence factors, electrochemical sensors, portable electrochemical platforms, nanomaterials, aptasensors

## INTRODUCTION

The detection and monitoring of bacteria is a key priority for ensuring public health and environmental quality, but also for preventing and reducing the spread of pathogens. The analysis methods currently used for the identification of pathogenic bacteria and the diagnosis of infectious diseases are mainly microbiological, molecular, immunological or mass spectrometry methods. They have some drawbacks, such as long duration until the result, complex analysis protocols, the need for sophisticated equipment, expensive reagents and specialized personnel, implying high costs, which limit their applicability in routine analyses or in decentralized testing.

Electrochemical sensors and biosensors are promising alternatives for pathogen analysis given their excellent analytical performance, short detection time, affordability, ease of operation, potential for miniaturization and integration into portable devices. They can also be functionalized with various biomolecules and nanomaterials to improve selectivity and sensitivity.

In this context, the studies carried out within this thesis aimed to develop rapid and selective electrochemical methods for the detection of pathogenic microorganisms, either through virulence factors or with the help of biomimetic strategies that involve the sensors functionalization with aptamers.

## STATE OF THE ART

A global threat with a high mortality risk is represented by pathogenic bacteria that have developed antimicrobial resistance (AMR) and are involved in healthcare-associated infections (HAIs)<sup>1</sup>. It is estimated that bacterial AMR was directly responsible for 1.27 million deaths globally in 2019<sup>2</sup>, mortality attributed to AMR is foreseen to increase dramatically by 2050, with more than 10 million deaths expected annually<sup>3</sup>. In Europe, 4.8 million cases of HAIs are estimated annually in emergency hospitals<sup>4</sup>.

Current conventional diagnostic methods mainly include the identification of microorganisms by plate culture, immunoassays (ELISA, immunochromatography), molecular methods based on nucleic acid amplification (qPCR, LAMP), mass spectrometry<sup>1</sup>. Although they yield high specificity and sensitivity, allowing for accurate detection, these methods have limited applicability due to their laborious and time-consuming nature, complicated analysis protocols with complex procedures for sample pre-treatment, the need for expensive equipment and reagents, and skilled personnel. Moreover, most are not suitable for use in the field, in hard-to-reach areas and with limited resources<sup>5,6</sup>.

In recent years, there has been a considerable demand for decentralized detection in clinical areas, but also for environmental analysis, with *point-of-care* (POC)



devices being options of interest. In order to develop such devices, the elaboration and validation of new sensitive and rapid analysis methods are paramount<sup>5</sup>.

Electrochemical (bio)sensors have emerged as attractive approaches for the analysis and screening of the presence of pathogens due to their advantages, being ideal for the development of robust and reliable diagnostic platforms<sup>7,8</sup>. The use of nanomaterials and biomimetic elements for the functionalization of the platforms facilitated the development of new sensitive and selective strategies for the detection of pathogenic microorganisms in decentralized systems<sup>9,10</sup>.

## PERSONAL CONTRIBUTION

### 1. General methodology

The reagents used were of analytical purity and without further purification. The electrochemical experiments were carried out with the help of Autolab PGSTAT302N (Metrohm, Spain) and PGSTAT-12 (Eco Chemie, The Netherlands) potentiostats or using portable analytical equipment such as the SensitBT, EmStat Blue potentiostats and the SensitSmart ultraportable minipotiostats (PalmSens B.V., The Netherlands), with dedicated software operated with smart devices (tablet or smartphone).

The electrochemical behavior of the analytes was evaluated by cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV). The development and optimization steps of the platforms were characterized by CV, DPV and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) using the solution of  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5 mM in KCl 0.1 M as a redox probe, and the analytical performance (limit of detection, limit of quantification, linearity range, sensitivity) of the sensors was monitored by DPV and EIS. Also, the selectivity and applicability of the methods on real samples were evaluated.

The estimation of the concentration of microorganisms in the bacterial cultures tested in Study 3 and Study 4 was performed by determining the total number of bacteria expressed as colony-forming units (CFUs) that grew on the culture media.

### 2. Study 1. Development of an electrochemical sensor for the individual assessment of enterobactin – a siderophore of *Escherichia coli*

#### 2.1. Introduction

The rapid and decentralized detection of bacteria from biomedical, environmental and food samples is a topic of interest in current research, especially in the context of the emergence of multidrug-resistant strains<sup>11,12</sup>. *E. coli* is a prominent cause of various infections, causing some severe conditions, including dysenteric syndrome and hemolytic uremic syndrome<sup>13-15</sup>. Enterobactin (Ent) is the predominant siderophore secreted by *E. coli*, being an electroactive molecule, important for bacterial colonization and pathogenic processes<sup>16</sup>.

The identification of new markers is an attractive strategy for the indirect, but more simple and safe detection of pathogens that could replace the existing methods

applied in the current analysis. Portable sensors and lab-printed electrodes present promising alternatives, providing fast, on-site analysis.

### *2.2. Objectives*

The first objective of the study was to investigate the electrochemical fingerprint of Ent by studying the characteristic signal on different electrode materials and choosing the most suitable material for the development of electrochemical sensors. Thus, the platform was developed by modifying the selected working surface with a semi-solid electrolyte and metal nanoparticles.

Electrochemical sensors developed based on commercial screen-printed electrodes (SPEs) and in lab-printed electrodes have been further applied for the detection of Ent from standard samples, culture media and water samples. In addition, the electrochemical cells were also printed on a medical glove, as a first step in the fabrication of a wearable sensor suitable for decentralized analysis and screening.

### *2.3. Materials and methods*

Graphite, gold and platinum SPEs (Metrohm, Spain) and glassy carbon electrodes (GCE) (BASi, USA) were used. The electrochemical cells developed in the lab were manually printed with conductive inks by screen printing.

For the elaboration of the platform, the surface of the electrodes was coated with a suspension of 0.5% agar hydrogel (m/V) in 20 mM phosphate buffer saline (PBS) with pH 7.4 and Au/Ag nanoalloy (Nanovex, Spain) in a ratio of 3:1.

The electrochemical behavior of Ent (Sigma Aldrich, USA) was evaluated in standard samples and in two different culture media selective for Gram-negative bacteria, Drigalski lactose agar (DLA) and Miller lysogenic broth (ML). The presence of Ent was assessed in untreated and treated water (waste-, ground- and tap water).

### *2.4. Results and discussions*

The electrochemical fingerprint of Ent was evaluated by DPV on different electrode configurations. The highest current intensity was observed on the graphite-based surface, which was chosen as the optimal electrode material for the development of the platform. The working surface was modified with a mixture of agar hydrogel and Au/Ag nanoalloy (3:1), the presence of noble metal nanoparticles facilitating electron transfer and increasing sensitivity.

The configuration has been tested in standard Ent solutions and in culture media. In standard samples prepared in PBS 20 mM with pH 7.4, the current intensity increased proportionally to the concentration in the linear range from 1.25  $\mu\text{M}$  to 37.5  $\mu\text{M}$ , with a limit of detection (LOD) of 0.41  $\mu\text{M}$ . The current varied proportionally with the concentration of Ent in ML (6.25  $\mu\text{M}$  - 37.5  $\mu\text{M}$ ) and DLA (2.5  $\mu\text{M}$  - 37.5  $\mu\text{M}$ ). The same protocol was carried using commercial and in lab-printed SPEs on a flexible polymer substrate and on the fingers of a medical glove. The sensitivity was slightly lower for the in lab-printed platforms compared to commercial SPEs, with differences due to the different working electrode areas and the type of carbon-based conductive ink.

The developed platform was also evaluated in the presence of another bacterial marker, pyocyanin (PycC), specific to the metabolism of *P. aeruginosa*. The oxidation signals of both target analytes could be observed, demonstrating the ability to indirectly and simultaneously determine the presence of *P. aeruginosa* and *E. coli*.

The presence of Ent was also monitored in complex matrices such as wastewater, groundwater and tap water. The target analyte could be detected in water samples, with satisfactory recoveries (over 80%) mainly in clarified wastewater and treated effluents for all concentrations tested.

### 2.5. Conclusions

The electrochemical behavior of Ent, a siderophore secreted by *E. coli*, was studied for the first time. The analyte was successfully detected, without major interferences, in culture media and in water samples, with potential applications for monitoring Ent and, indirectly, *E. coli* in the environment. The novelty of the study was the use of a configuration printed on a medical glove to detect Ent in the presence of another bacterial marker (PycC). Such new mobile and wearable platforms offer a considerable opportunity for rapid decentralized screening with low costs.

## 3. Study 2. Portable electrochemical sensor for simultaneous assessment of pyocyanin and enterobactin, two bacterial metabolites, from environmental samples

### 3.1. Introduction

Water quality must be ensured and monitored in accordance with the guidelines and regulations issued by competent authorities. According to the WHO, waterborne pathogens with a high and moderate risk to human health are: *E. coli* O157:H7, *Legionella* spp., *P. aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, norovirus, *Cryptosporidium* and *Giardia* <sup>17</sup>.

The Colilert® test is a USEPA-approved method for the determination of *E. coli* that is based on fluorescence produced by the interaction of specific bacterial enzymes with their substrate <sup>18</sup>. Despite its high sensitivity, the method requires incubation for 18 h at 35 °C ± 0.5 °C, which makes it challenging to detect contamination in real time.

The development of modern methods and technologies is crucial for the rapid detection of pathogens in water <sup>19</sup>. Therefore, *in-situ* detection methods, using portable sensors that provide immediate results without the need of samples transportation, are valuable solutions for the effective management of these risks.

### 3.2. Objectives

In this study, we aimed to develop an easy-to-use handheld electrochemical sensor for the simultaneous detection of bacterial metabolites Ent and PycC. The study describes the application for the first time of an electrochemical method optimized for the simultaneous detection of *E. coli* and *P. aeruginosa* in water samples and its validation in three laboratories in Europe. The objective of the study was to evaluate and validate the performance and applicability of the developed technology, more

specifically the portable electrochemical sensor called PathoTeSTICK, for rapid in-field testing of water contamination.

### 3.3. Materials and methods

The electrochemical sensors with an optimized design (PathoTeSTICK), were fabricated using carbon-based SPE. The electrochemical detection technique used in the validation tests was represented by DPV with a duration of 16 s.

Validation was performed both for lab-grown strains of *E. coli* and *P. aeruginosa* (standard and environmental), in different culture media, and on real water samples (surface-, wastewater and drinking water). All measurements were triplicates. Wastewater samples were collected from various treatment plants in Romania, Spain and the Netherlands. From these samples, decimal dilutions in distilled or sterile drinking water were prepared and analyzed by immersing the sensor in the sample.

### 3.4. Results and discussions

In the analysis of PyoC and Ent, an LOD of 165 nM was obtained (35 ng/mL for PyoC, respectively 110 ng/mL for Ent) suggesting the possibility of simultaneous detection of *E. coli* and *P. aeruginosa* using the DPV method and the developed sensors.

The results obtained with the electrochemical method were compared with standard methods, culture plates and Colilert MPN tests. The technology has been successfully applied for the detection of microbial contamination in water matrices, thus demonstrating the usefulness of the sensor as a rapid alert method.

Following the selectivity studies, it was possible to detect all 10 strains of *E. coli* and 8 strains of *P. aeruginosa* tested using the developed method. Of the 18 non-*E. coli* and non-*P. aeruginosa* strains tested, two strains generated a signal for PyoC and three other Ent-producing species were detected with PathoTeSTICK.

The parameters obtained during intra-laboratory validation were confirmed by testing bacteria-contaminated water samples during interlaboratory validation. In its current state, the concept used for the development of PathoTeSTICK has limited applicability to analysis of contaminated waters with more than  $10^6$  CFU/100 mL *E. coli* and  $10^5$  CFU/100 mL *P. aeruginosa* <sup>20,21</sup>. Despite the fairly high LODs, the optimized detection method is simple, fast and suitable for in-field decentralized analyses.

### 3.5. Conclusions

The final version of the portable stick-shaped electrochemical sensor, PathoTeSTICK, and the optimized test method were adapted to *in situ* detect *E. coli* and *P. aeruginosa* in complex water samples within a short time frame (less than 1 min), without any pretreatment step. In addition, low cost, easy operation even by inexperienced users, and portability are other key features of the proposed method.

## 4. Study 3. Electrochemical aptasensor for the rapid detection of a surface protein of *Staphylococcus aureus*

### 4.1. Introduction

*S. aureus* is part of the ESKAPE group of 'superbugs', which also includes *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, having a tremendous impact on global health systems<sup>22</sup>. *S. aureus* infections are difficult to manage due to the frequent antibiotic resistance of the strains, of which the methicillin-resistant variant (MRSA) causes infections with prolonged hospital stays, increased mortality and morbidity. PrA is a surface protein of the staphylococcal cell wall with multiple roles in the pathogenicity of *S. aureus*<sup>23</sup>.

Conventional methods approved for diagnosis of *S. aureus* infection include culture plates, molecular and immunoenzyme techniques. As these laboratory techniques employ personnel with expertise and the use of specific equipment, rapid test kits have been developed for simplified analyses, but their accuracy is often low<sup>23</sup>.

### 4.2. Objectives

In this study, a label-free electrochemical aptasensor was developed for the rapid and selective detection of a component of *S. aureus* cell wall, namely PrA. In this regard, commercial SPEs with Au working surface (AuSPE) were functionalized with a specific aptamer (APT) and incubated with the target from human serum samples and bacterial cultures for impedimetric detection.

### 4.3. Materials and methods

PrA, bovine serum albumin (BSA), human serum albumin (HSA), interleukin-6 (IL-6) and commercial human serum were purchased from Sigma Aldrich (Merck, Germany). All solutions were prepared in nuclease-free water (Invitrogen, USA). The APT sequence PA#2/8[S1-58], specific for PrA<sup>24</sup>, used in this study was unlabeled and modified with thiol group at the 3' terminus (Eurogentec, Belgium). Cor-APT (Eurogentec, Belgium) and Gli-APT (AlphaDNA, Canada) were used for the selectivity study. APT solutions were prepared in TRIS 10 mM buffer with pH = 7.2.

The aptasensor development protocol involved three working steps: (1) APT immobilization on the AuSPE surface (Metrohm-DropSens, Spain), (2) blocking of unoccupied sites on the Au surface, and (3) incubation with the target. After each modification step, the platform was electrochemically characterized by DPV and EIS.

Human serum samples were enriched with PrA, diluted 1:10 and 1:100 with TRIS buffer with pH 7.2. The bacterial suspensions were obtained by growing the *S. aureus* ATCC25923 (Tody Laboratories, Romania) strain in nutrient broth for 24 h at 37°C, then counted with the serial dilution method. The aptasensor was incubated with bacterial suspensions for 30 min, after which were tested by the DPV method.

### 4.4. Results and discussions

The APT was immobilized on the AuSPE surface by a rapid and efficient multipulse amperometry (MPA) procedure, followed by a blocking step to prevent non-specific adsorption which was also performed by MPA. The APT affinity for PrA was

confirmed by surface plasmonic resonance (SPR) studies, obtaining a binding constant ( $K_{D, \text{kinetic}}$ ) of  $180.44 \pm 43.22$  nM.

After incubation of the aptasensor with PrA, detection was performed indirectly by DPV and EIS in a redox probe. The aptasensor demonstrated the ability to detect PrA in a wide range of concentrations (from 25 nM to 1000 nM), with a LOD of 8.33 nM being determined. The selectivity of the aptasensor towards PrA has been demonstrated in complex matrices testing three interferent proteins. In addition, selectivity was assessed by immobilizing two other oligonucleotide sequences (Cor-APT and Gli-APT).

The analytical performance of the aptasensor was also evaluated on serum samples enriched with a known number of *S. aureus* colonies and in bacterial cultures. The DPV results indicated that the specific interaction between APT and PrA occurred successfully, and the registered signal was proportional to the target concentration. The platform modification steps and target capture (PrA and *S. aureus*) were confirmed by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM).

#### 4.5. Conclusions

In this study, an electrochemical aptasensor was successfully developed for the detection of PrA, specific protein of *S. aureus*. The elaboration and incubation steps involved only 35 min until the result. The aptasensor demonstrated the ability to detect PrA over a wide linear range with a LOD of 8.33 nM. The performance of the aptasensor was also evaluated in complex matrices, in human serum and *S. aureus* cultures. The rapidity and specificity of the proposed method with proven applicability on real samples suggest the potential for the development of a POC testing device.

### 5. Study 4. Innovative electrochemical aptasensor for the rapid detection of *Campylobacter jejuni*

#### 5.1. Introduction

*C. jejuni* is a major cause of bacterial gastroenteritis in humans worldwide with a high incidence and dramatic socio-economic impact, representing an important etiology of infant mortality in developing countries. According to the WHO, 550 million cases of diseases caused by contaminated food consumption are reported annually, frequently in children under five years<sup>25</sup>. In 2022, the majority of cases (61.3%) of zoonoses were represented by campylobacteriosis<sup>26</sup>. The development of rapid and selective methods for the detection of *C. jejuni* is of real interest.

#### 5.2. Objectives

The aim of this study was to develop a label-free electrochemical aptasensor for the specific and sensitive detection *C. jejuni*. The sensitivity was obtained by functionalizing the sensor surface with nanomaterials, more precisely with electrogenerated Au nanostructures and a nanohybrid mixture of MXene:AuNP. Target specificity was ensured by immobilizing an APT (ONS-23 sequence and its truncated variant, ONS-23TA) by MPA. The aptasensor was tested with samples from a culture of

a *C. jejuni* strain. The detection of the concentration of bacteria was achieved indirectly by monitoring the impedimetric signal using a redox probe.

### 5.3. Materials and methods

Carbon-based SPE (C-SPE) (Metrohm, Spain), tetrachlorauric acid ( $\text{HAuCl}_4$ ) (Merck, USA), 50 nm AuNP suspension (Nanovex Biotechnologies, Spain),  $\text{Ti}_3\text{C}_2\text{T}_x$  dispersion (MXene) 1 mg/mL (Nanochemazone, Canada) were used. *C. jejuni*-specific APT sequences (ONS-23 and ONS-23TA)<sup>27</sup> were synthesized with thiol groups at the 3' terminus (FRIZ Biochem, Germany). The interaction tests between the APT and *C. jejuni* were performed by spectrophotometry in the UV range ( $\lambda = 260$  nm).

The aptasensor development protocol involved four working steps: (1) obtaining the nanostructured composite platform based on AuNP/MXene; (2) APT immobilization by MPA; (3) blocking of the unoccupied sites on the nanostructured surface; (4) incubation with the target. After each step, the platform was electrochemically characterized by DPV and EIS, and by microscopy, AFM and SEM techniques.

The aptasensor was tested by 1 h incubation with suspensions of *C. jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 9428 (TCS Biosciences Ltd., UK) in Brucella agar (grown 48 h at 42°C in microaerophilia). Dilutions in TRIS were tested with different aptasensors, monitoring the impedimetric signal, and the results correlated with bacteria concentrations.

### 5.4. Results and discussions

The first step in the aptasensor development consisted in the electrochemical deposition of Au nanostructures on the C-SPE surface to facilitate further functionalization with thiolated-APT by Au-S bond. Two electrodeposition protocols were tested, CV being chosen due to the better reproducibility of the platform compared to CA deposition. The surface was further functionalized with a composite film of MXene and AuNP, the best results being obtained in case of depositing a single layer of the mixture containing equal proportions of the two nanomaterials. The electrochemical immobilization of the APT was chosen as an optimized MPA procedure (using the alternative potentials + 0.5 V and - 0.2 V and a duration of 60 s) which generated a much more efficient coverage compared to classical incubation over time.

To evaluate the applicability of the method, the optimized aptasensor was incubated with dilutions of a suspension with the cultured bacteria. The analytical signal varied linearly with the concentration of *C. jejuni* in the  $10^2 - 10^{10}$  CFU/mL range, in the case of both APT sequences used. An LOD equal to the limit of quantification of  $10^2$  CFU/mL was estimated. The sensitivity of the method was higher for the truncated APT.

The SEM images highlighted the presence of both nanomaterials (AuNP and MXene) and the uniform distribution on the carbon surface. After the immobilization of *C. jejuni*, the fairly uniform distribution of bacteria on the scanned surface was observed, as well as the specific sigmoid shape of this bacterium. The presence of *C. jejuni* after incubation of aptasensors with bacterial suspensions was also confirmed by AFM.

### 5.5. Conclusions

An electrochemical aptasensor for indirect *label-free* detection of *C. jejuni* was successfully developed and optimized. The performance of the aptasensor was proved over a wide range of concentrations ( $10^2 - 10^{10}$  CFU/mL), obtaining a LOD of  $10^2$  CFU/mL. The research highlights the potential of aptamers and electrochemical methods in the development of useful platforms for the specific and sensitive detection of *C. jejuni* in about 70 min, reducing the waiting time compared to the standard method of plate cultures. The study may provide new insights into the detection and monitoring of infections (zoonoses) in various contamination environments.

### 6. General conclusions

In this thesis, innovative electrochemical devices were developed for the detection of four pathogenic bacteria *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* and *C. jejuni*. Bacterial markers such as siderophores and virulence factors of *P. aeruginosa* and *E. coli* (PyoC and Ent) were analyzed based on their electrochemical signal and correlated with the presence of the corresponding bacteria. The second research direction focused on the detection of structural components (PrA) and whole bacterial cells (*C. jejuni*), was based on the specific interaction with biomimetic elements such as aptamers. The present work is yet another proof of the versatility of electrochemical methods and their applicability for bacterial markers and pathogenic bacteria detection.

### 7. Originality and innovative contributions of the thesis

This doctoral thesis addresses a relevant issue, offering alternatives to conventional detection methods of pathogenic bacteria aiming to reduce the prevalence of HAIs and AMR. A fast and simple simultaneous method for detecting Ent and PyoC was developed for the first time. The sensors were integrated on a glove-based device, applied in the detection of the presence of *E. coli* and *P. aeruginosa*. The developed PathoTeSTICK device has been validated on environmental samples in three laboratories in Europe. The thesis proposes modern approaches such as the use of aptamers for the specific detection of electrochemically inactive targets, PrA and *C. jejuni* cell. The detection of *S. aureus* by PrA was performed in biological fluids (serum) and bacterial cultures. The aptasensor developed for *C. jejuni* based on an innovative MXene platform is one of the few electrochemical sensors for this bacterium, most reported studies referring to colorimetric immunosensors. In addition, portable miniaturized potentiostats were used to perform decentralized field analyses, representing a starting point for the development of POC-type devices for pathogenic bacteria.



## SELECTED REFERENCES

1. Canciu A, Cernat A, Tertis M, Graur F, Cristea C. Tackling the issue of healthcare associated infections through point-of-care devices. Vol. 161, TrAC - Trends in Analytical Chemistry. Elsevier B.V.; 2023. p. 116983.
2. Antimicrobial resistance [Internet]. [cited 2024 Aug 17]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
3. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. 2022;399(10325):629–55.
4. Suetens C, Kärki T, Diamantis P. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals 2022-2023. 2022; Available from: [www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu)
5. Wang C, Liu M, Wang Z, Li S, Deng Y, He N. Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices. *Nano Today*. 2021 Apr 1;37:101092.
6. Capatina D, Feier B, Hosu O, Tertis M, Cristea C. Analytical methods for the characterization and diagnosis of infection with *Pseudomonas aeruginosa*: A critical review. *Anal Chim Acta*. 2022 Apr 29;1204:339696.
7. Canciu A, Tertis M, Hosu O, Cernat A, Cristea C. Modern Analytical Techniques for Detection of Bacteria in Surface and Wastewaters. *Sustainability*. 2021;13(13):7229.
8. Wang C, Liu M, Wang Z, Li S, Deng Y, He N. Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices. *Nano Today*. 2021 Apr 1;37:101092.
9. Shen Y, Zhang Y, Gao ZF, Ye Y, Wu Q, Chen H yuan, et al. Recent advances in nanotechnology for simultaneous detection of multiple pathogenic bacteria. *Nano Today*. 2021;38(101121).
10. Stefan G, Hosu O, De Wael K, Lobo-Castañón MJ, Cristea C. Aptamers in Biomedicine: Selection Strategies and Recent Advances. *Electrochim Acta*. 2021 Feb;137994.
11. Wang Y, Xiao T, Zhu Y, Ye J, Yang K, Luo Q, et al. Economic Burden of Patients with Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli*. *Infect Drug Resist*. 2020;13:3583.
12. Bonten M, Johnson JR, Van Den Biggelaar AHJ, Georgalis L, Geurtsen J, Ibarra De Palacios P, et al. Epidemiology of *Escherichia coli* Bacteremia: A Systematic Literature Review. *Clinical Infectious Diseases*. 2021;72(7):1211–9.
13. Schwidder M, Heinisch L, Schmidt H. Genetics, toxicity, and distribution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin. Vol. 11, Toxins. MDPI AG; 2019.
14. Newell DG, La Ragione RM. Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies? *Transbound Emerg Dis*. 2018 May 1;65:49–71.
15. Jiang L, Yang W, Jiang X, Yao T, Wang L, Yang B. Virulence-related O islands in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Vol. 13, Gut Microbes. Taylor and Francis Ltd.; 2021.
16. Khasheii B, Mahmoodi P, Mohammadzadeh A. Siderophores: Importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry. *Microbiol Res*. 2021 Sep 1;250:126790.

17. World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality, 4th edition, incorporating the 1st addendum [Internet]. Geneva, Switzerland; 2017 [cited 2024 Jan 16]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950>
18. Colilert - IDEXX US [Internet]. [cited 2024 Apr 8]. Available from: <https://www.idexx.com/en/water/water-products-services/colilert/>
19. Moreira NA, Bondelind M. Safe drinking water and waterborne outbreaks. Vol. 15, Journal of Water and Health. IWA Publishing; 2017. p. 83–96.
20. Vestergaard LS, Olsen KE, Stensvold R, Böttiger BE, Adelhardt M, Lisby M, et al. Outbreak of severe gastroenteritis with multiple aetiologies caused by contaminated drinking water in Denmark, January 2007. *Eurosurveillance*. 2007 Mar 29;12(3):3164.
21. Jalava K, Rintala H, Ollgren J, Maunula L, Gomez-Alvarez V, Revez J, et al. Novel Microbiological and Spatial Statistical Methods to Improve Strength of Epidemiological Evidence in a Community-Wide Waterborne Outbreak. *PLoS One*. 2014 Aug 22;9(8):e104713.
22. Kouijzer IJE, Fowler VG, ten Oever J. Redefining *Staphylococcus aureus* bacteremia: A structured approach guiding diagnostic and therapeutic management. *Journal of Infection*. 2023 Jan 1;86(1):9–13.
23. Tătaru AM, Canciu A, Tertiș M, Cristea C, Cernat A. *Staphylococcus aureus* – Review on potential targets for sensors development. *Bioelectrochemistry*. 2023 Oct 1;153:108492.
24. Stoltenburg R, Schubert T, Strehnitz B. In vitro selection and interaction studies of a DNA aptamer targeting Protein A. *PLoS One*. 2015 Jul 29;10(7):e0134403.
25. *Campylobacter* [Internet]. [cited 2024 Sep 9]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>
26. The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA Journal*. 2023 Dec 1;21(12).
27. Kim YJ, Kim HS, Chon JW, Kim DH, Hyeon JY, Seo KH. New colorimetric aptasensor for rapid on-site detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken carcass samples. *Anal Chim Acta*. 2018 Oct 31;1029:78–85.