

## بیوسنسور تشخیصی برای ویروس zika

مهران کریمیان ریزی<sup>۱</sup>

مریم فریور<sup>۲</sup>

وحید رنجبر عین الدین<sup>۳</sup>

دانشجو کارشناسی ارشد، مهندسی پزشکی، دانشگاه تبریز، ایران، mehrankarimian97@ms.tabrizu.ac.ir

مری سازمان آموزش فنی و حرفه ای کشور، شاهین شهر، ایران، Farivar.maryam@yahoo.com

دانشجو کارشناسی ارشد، مهندسی پزشکی، دانشگاه تبریز، ایران، v.ranjbar98@ms.tabrizu.ac.ir

**چکیده:** ما یک بیوسنسور فعال با گرافن قابل انتقال برای شناسایی ویروس زیکا با یک آنتی بادی مونوکلونال غیرمتحرک توسعه داده ایم. اثرمیدانی بیوحسگر (FEB) با آنتی بادی های مونوکلونال که به صورت گرافیکی با هم ارتباط دارند، باعث تشخیص کمی از آنتی ژن های بومی ویروس زیکا (ZIKV) در زمان واقعی می شود. تغییر درصد ظرفیت در پاسخ به دوز آنتی ژن (ZIKV) با سطوح اهمیت بالینی با تشخیص آنتی ژن در بافر در غلظت های ۴۵۰ pM معادل است. کاربرد های تشخیصی بالقوه با اندازه گیری آنتی ژن زیکا در سرم شبیه سازی شده انسان نشان داده شد. انتخاب پذیری توسط Encephalitis NS1، یک آنتی ژن ویروسی همولوگ و بالقوه متقابل اعتبارسنجی شد. علاوه بر این، پلتفرم گرافن می تواند به طور همزمان داده های پیشرفته ای از ابزارهای سینتیک بیوفیزیک غیر کلاسیک فراهم کند، و آن را برای هر دو تحقیق بالینی و کاربردهای تشخیصی سازگار کند. سرعت، حساسیت و انتخاب پذیری بیوسنسور زیکا فعال شده باگرافن برای اولین بار از نوع خود نامزدی ایده آل برای توسعه به عنوان یک تست تشخیصی پزشکی است.

**کلیدواژه‌ها:** بیوسنسور، زیکا، FEB

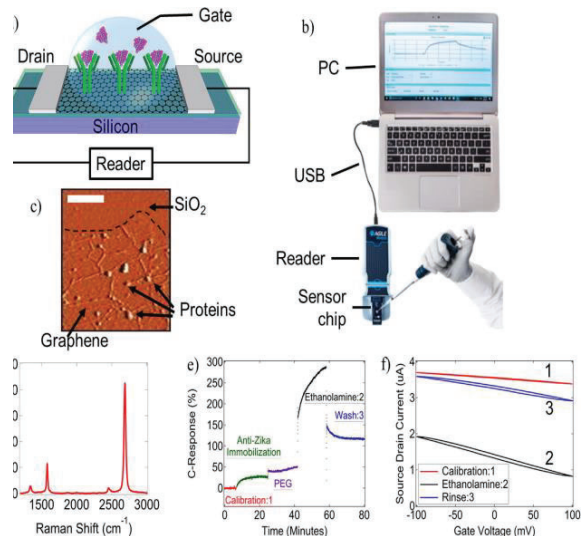
### مقدمه

تشخیصی فعلی برای تشخیص Zika عبارتند از: RNA Trioplex، Nucleic Acid Testing (RNA NAT)، rRT-PCR یا آنتی بادی Zika IgM آنتی بادی آنزیمی مرتبط با آنزیم مرتبط با ایمونوسوربنت (-Zika MAC-ELISA) در ادرار، سرم یا مایع مغزی [۶]. با این حال، به دلیل واکنش پذیری متقابل با ویروس های cocirculating مانند دنگ<sup>۲۸</sup> و آنسفالیست<sup>۲۹</sup> ژاپنی (Sironi) [۷] میزان تایید نتایج مثبت پیش فرض کمتر از ۵۰٪ برای ELISA تست Igm تجاری [۸] هر دو قابلیت تشخیصی به موقع و دقیق فن آوری های در حال ظهور برای مبارزه با این تهدید بهداشت عمومی مورد نیاز است.

زیکا یک عفونت ویروسی حاملی است که در اواسط قرن بیستم در جنگل زیکا اوگاندا رخ داده است [۱]. از زمان کشف آن، چند شیوع مهم زیکا، اخیرا در سال ۲۰۱۵ در آمریکای شمالی و جنوبی از جمله ایالات متحده وجود دارد [۲]. اثرات درازمدت زیکا شامل نقایص شدید مغزی در جنین [۳] و سندرم Guillain-Barre در بزرگسالان است [۴]. به عنوان یک نتیجه، اپیدمی ویروس زیکا نگرانی رو به رشد در بهداشت عمومی در ایالات متحده است. بیش از ۴۱۰۰۰ مورد از عفونت ویروس Zika از ژانویه ۲۰۱۵ در ایالات متحده و سرزمین های آن گزارش شده است که ۳۴۶۱ مورد آن زنان باردار هستند [۵]. استانداردهای

<sup>29</sup> encephalitis

<sup>28</sup> dengue



شکل ۱ (a) نمودار المان سنسور تراشه ی بیوسنسور گرافن. آنتی بادی ها با استفاده از یک لینک دهنده با طول صفر به گرافن بکر تبدیل می شوند. همراه با بلوک PEG، این آنتی بادی ها دی الکتریک را در یک ترانزیستور مجهز به یک کانال گرافن تشکیل می دهند. (b) تصویر کل سیستم تراشه سنسور، شامل تراشه سنسور، الکترونیک خواننده و کنترل دیجیتال و نرم افزار کنترل و ارائه اطلاعات در کامپیوتر است. (c) تصویر AFM گرافن پس از پیوستن پروتئین موفق، نوار مقیاس ۱ میکرومتر و ارتفاع Z 10 نانومتر است. (d) طیف رامان پس از ساخت دستگاه نسبت  $D/G$  کم، و گرافن با کیفیت بالا را نشان می دهد. (e) تغییر درصد ظرفیت خازنی در هنگام بی تحرک سازی هدف و خنک کردن روی سطح تراشه ی بیوسنسور گرافن. (f)  $I-V_g$  منحنی در مراحل مختلف بی تحرک سازی. تغییر چشمگیر شیب  $I-V_g$  نشان دهنده تغییر قابل ملاحظه در شیمی سطح و افزایش حساسیت بیوسنسور است.

## ۲- مواد و روش ها

### ۲-۱- ساخت بیوسنسور گرافن

تراشه های بیوسنسور در ریخته گری تجاری همانطور که قبلا شرح داده شد، ساخته شده است [17]. به طور خلاصه، فتولیتوگرافی و CVD پلاسمایی با استفاده از گرافیت به

نانومواد بسیار حساس به عنوان حسگرهای بیوسنسور، با محدودیت پایین تر تشخیص با انتخاب پذیری بهتر، نسبت به آزمایشات قدیمی نشان می دهد. یک نامزد بوسنسور امیدبخش، گرافن، یک ورقه دو لایه از اتم های کربن شش ضلعی است که ابتدا در سال ۲۰۰۴ به صورت آزمایشی جداسازی شدند [۹]. به عنوان یک ماده دوجانبه هدایت کننده، هر اتم در یک ورق گرافن، در تماس مستقیم با محیط آن قرار دارد و به نوسانات الکترواستاتیک پاسخ می دهد، و آن را نامزد ایده آل برای کاربردهای سنجش می کند [۱۰]. در واقع، گرافن در تمام انواع شامل سنسورهای فشار [۱۱]، سنسورهای بخار شیمیایی [۱۲]، حسگرهای نوری [۱۳] و سنسورهای مولکولی [۱۴] گنجانده شده است. اخیرا استفاده از یک تراشه گرافنی تجاری به عنوان یک حسگر بیوسنس را با استفاده از سخت افزار الکترونیکی قابل حمل اثبات کرده ایم ۲۰۱۶. [۱۵] گرافن به عنوان ماده پایه ای برای پلتفرم ما بر روی سایر نانومواد ها؛ بخاطر تاریخ انتشار گسترده ای از دستگاه های حسگر همراه با دسترسی اخیر تراشه های بیوسنسور گرافن که از طریق فاکتورهای تجاری، بسته بندی و فرایندهای QA پردازش شده اند انتخاب شده است [۱۶]. استفاده از تراشه های بیوسنسور تجاری به جای چیپ های بیوسنسور ساخته شده در آزمایشگاه، ما را قادر به ارزیابی ویژگی های مواد و دستگاه با استفاده از تولید مقیاس نزدیک تر به آنچه که برای یک دستگاه تشخیصی بالقوه در مقایسه با یک دستگاه آزمایشگاهی ساخته شده است می نماید. این تراشه ها برای تشخیص حساس و خاص پروتئین غدد ساختاری ویروسی ZIKV NS1 (Zika) در اینجا اصلاح شده است.

تحرك و اندازه گیری، ۷۵ میکرولیتر از تمام محلول ها بر روی تراشه های بیوسنسور استفاده شد و مراحل انکوباسیون در دمای اتاق انجام شد. این نرم افزار به مدت ۶۰ ثانیه در ابتدا با pH 7.4 PBS 1/4 pH کالیبره شد. Anti-Zika NS1 با انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه بر روی سطح قرار گرفت. پلی اتیلن گلیکول (PEG) قبلاً نشان داده شده است که یک بلوک موثر در برابر تعاملات غیر اختصاصی به طور کلی و به طور خاص هنگامی که به صورت کششی به دستگاه های گرافن متصل می شوند می باشد [14]. بنابراین، ابتدا گروه های فعال NHS فعال با استفاده از ۳ میلی مولار آمینو PEG5 الکل (آمینو PEG) اتانولامین pH 8.5 خنک شدند. هر مرحله به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد و سپس چندین شستشو در ۱ X PBS pH 7.4 انجام شد. غلظت بالا PEG مورد استفاده در حین مسدود کردن منجر به PEG متصل بطور کووالانسی به سطح گرافن و جذب PEG به بقیه سطوح تراشه می شود.

شکل گرافیتی و منعقد شدن با Ti / Pt بر روی ۶ "ویفر سیلیکون [۱۸] مورد استفاده قرار می گیرد. فیلم های گرافن تک لایه با کیفیت بالا از طریق CVD روی فویل مس (Alfa Aesar) رشد می کنند و از طریق انتقال حباب انتقال می یابند [۱۹]. قالب های فردی با استفاده از یک پردازنده تراشه بسته بندی شده و با اپوکسی انکپسوله می شوند تا به خوبی در معرض سطوح بالاتر از سطح بیوسنسور گرافن قرار گیرند.

## ۲-۲ اندازه گیری بیوسنسور گرافن:

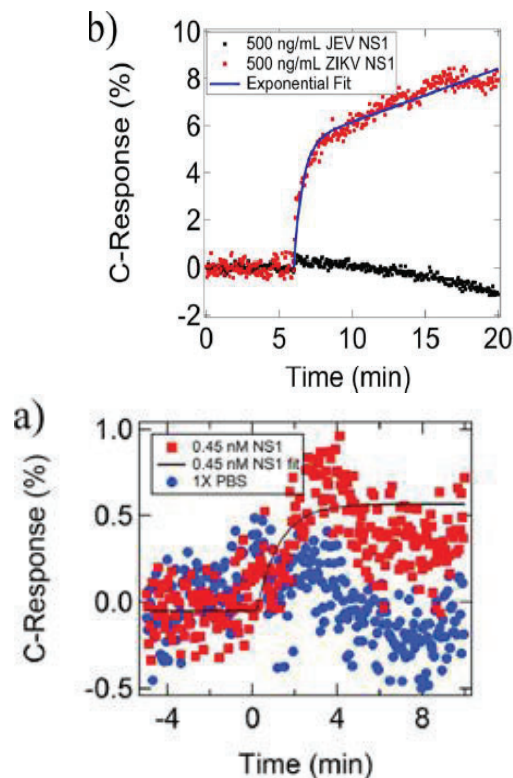
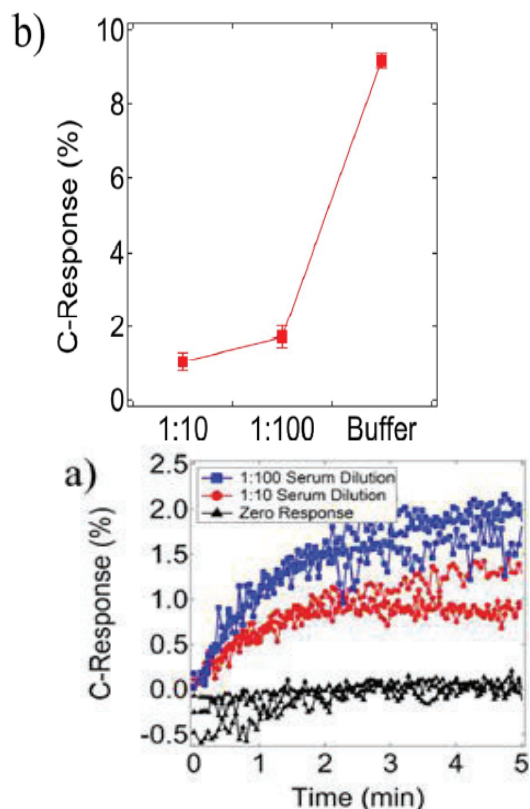
تراشه های بیوسنسور گرافن با استفاده از سیستم تجاری Agile R100 (Diagnostics Nanomedical)، که قبلاً در جزئیات توضیح داده شده، خوانده می شود [۱۹]. با استفاده از این سیستم، تراشه های بیوسنسور گرافن به یک خواننده الکترونیکی وارد می شود که یک ولتاژ منبع تخلیه را در سراسر کانال گرافن و ولتاژ دروازه بین مایع اعمال شده و الکتروود تخلیه گرافن اعمال می کند. ۲ کانال قابل خواندن موجود است: پاسخ- $I^{3-}$  (جریان از طریق کانال) و پاسخ- $C^{3-}$  (ظرفیت بیوسنسور به مایع). در این مطالعه، کانال پاسخ C استفاده می شود. کنترل سیستم و همچنین خواندن داده ها از طریق نرم افزار Agile Plus اجرا می شود که بر روی یک کامپیوتر متصل به سیستم از طریق USB اجرا می شود، همانطور که در شکل b1 نشان داده شده است.

## ۲-۳ عدم تحریک پروتئین

قبلاً شیمی سطح NHS را برای ساخت تراشه های حسگر آماده برای پیوست پروتئین مورد استفاده توضیح داده ایم (افصحی و همکاران، ۲۰۱۷). سپس تراشه های بیوسنسور با هدف، موش ضدباکتری موسوم به anti-Zika NS1 موسوم به مراکز کنترل بیماری (CDC) توسعه یافت. Anti-Zika NS1 به یک غلظت کاری ۱۴,۶ nM در X1 فسفات بافر شور (pH 7.4) PBS رقیق شد. در طی عدم

<sup>۳۱</sup> C-Response

<sup>۳۰</sup> I-Response



شکل 3(A) پاسخ C از ۴ تراشه سنسور برای هر رقت ۱:۱۰ سرم بدون هیچ آنتی ژن spike in (پاسخ صفر)، رقت سرم با ۱:۱۰ با ۵۰۰ نانوگرم در میلی لیتر ZIKV spike-in NS1 و رقت سرم با ۱:۱۰۰ با ۵۰۰ نانوگرم در میلی لیتر ZIKV NS1 spike-in. (ب) تغییر در پاسخ C با فاکتور رقیق سازی. خطاها، انحراف استاندارد هستند.

این باعث ایجاد یک خاصیت ضد جذبی برای  $\text{SiO}_2$  و همچنین یک بلوک پایدار بر روی گرافن در مقابل تعاملات غیر خاص در سطح می‌شود. اندازه گیری ها در یک بافر  $1 \times \text{PBS pH } 7.4$  یا محلول سرم شبیه سازی شده (Cellastim, InVitria)، برای اندازه گیری هایی در نسبت های ۱:۱۰ و ۱:۱۰۰ از سرم به  $1 \times \text{PBS pH } 7.4$  انجام شد. بلافاصله پس از بی حرکت شدن و ثابت شدن، تراشه های بیوسنسور به مدت ۵ دقیقه در بافر مورد سنجش کالیبره شدند. آنتی ژن نوترکیب ZIKV NS1 (The Native Antigen Company) در بافر آزمون برای غلظت مورد نظر رقیق شد.

شکل 2(A) سنسوگرام پاسخ C بیوسنسور گرافن برای  $0.45 \text{ nM ZIKV NS1}$  در  $1 \times \text{PBS pH } 7.4$  باشد. کنترل (آبی) استفاده مجدد از  $1 \times \text{PBS pH } 7.4$  است. سنسوگرام پاسخ C در حین سنجش توسط  $500 \text{ ng/mL ZIKV NS1}$  بر میلی لیتر JEV NS1 مقابل غلظت مساوی ZIKV NS1. خط آبی نشان دهنده برازش نمایی منحصر به فرد برای منحنی پاسخ ZIKV NS1 می باشد. (برای تفسیر مراجع برای رنگ در شرح این شکل، خواننده به نسخه وب این مقاله ارجاع داده می شود).

تخلیه (source-drain) دارد، به همین دلیل کانال پاسخ C در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

هر کدام از مقادیر داده در شکل 1.e، مربوط به یک چرخه کامل ولتاژ گیت مایع از ۱۰۰- تا ۱۰۰+ میلی ولت (Mv) و مشکی است. شکل 1f منحنی ولتاژ ورودی در مقابل جریان کامل را در طول کالیبراسیون، خاموش کردن و شستشو نشان می دهد. افزایش شیب I-Vg (هدایت انتقالی بالاتر)، حساسیت بیوسنسور گرافن را افزایش می دهد. در توسعه یک آزمایش تشخیصی بالینی، به حداکثر رساندن حساسیت بسیار مهم است. در حال حاضر شیوع عفونت زیکا ناشی از میزان بالای واکنش متقابل با دیگر پاتوژن های فلاویویروس (flavivirus) نا معلوم است. برای این منظور، تشخیص یک پروتئین ویروسی خاص با اپیتوپ های (epitope) منحصر به فرد را هدف قرار می دهند. ساختار بلوری ZIKV NS1 نشان می دهد که پروتئین C-terminal دارای ویژگی های الکترواستاتیک است که آن

را از ویروس های عفونی مرتبط با آن متمایز می کند [14]. این بارهای منحصر بفرود برای توسعه mAbs خاص با واکنش متقابل محدود شده در میان ویروس های مرتبط مانند JEV. اجازه می دهد حساسیت تشخیص ZIKV NS1 بر روی یک تراشه بیوسنسور گرافن با استفاده از چندین غلظت آنالایزر تعیین شد. شکل 2a، برازش کالیبراسیون، پاسخ و سنسوگرام نمایی برای ۰.۴۵ nM ZIKV NS1 نشان می دهد. سطح نویز RMS سیستم Agile R100 در حدود  $\pm 0.2\%$  است. در کار قبلی ما برای اندازه گیری آنتیژن Zika در بافر، یک تشخیص محدودی از ۰.۴۱ nM ZIKV NS1 در بافر را نشان می دهد، که در استفاده از سیستم آنتی بادی آنتی ژن برای تکنیک های عاری از برجسب دیگر مانند BLI بهبود چشمگیری دارد [۱۰].

برای نشان دادن انتخاب پذیری anti-Zika NS1 که بر روی تراشه های بیوسنسور مبتنی بر گرافن ثابت شده است، ۵۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر ZIKV NS1 یا JEV NS1 بر

هر یک از غلظت ها برای تراشه های بیوسنسور به مدت حداقل ۵ دقیقه برای تولید پاسخ سنسور اعمال شد. کنترل منفی نیز با استفاده از 500ng/ml آنتی ژن ویروسی نو ترکیب NS1 (JEV) التهاب حاد مغزی (JEV) ژاپنی (The Native Antigen Company) انجام شد که برای تراشه های سنسور با استفاده از پروتکل مشابه ZIKV NS1 مورد استفاده قرار گرفت.

## نتایج و بحث

کیفیت گرافن با نسبت D / G کم ( $> 0.1$ ) در طیف Raman نشان داده شده در شکل d1 مشخص می شود. میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) نشان می دهد که عدم حرکت هدف در سطح گرافن با ضخامت ۱.۰ نانومتر (شکل S1) در چگالی بهینه  $5 \text{ proteins}/\mu\text{m}^2$  رخ می دهد و بنابراین تغییر در پاسخ C، پس از عدم تحرک پروتئین را تایید می کند (شکل 1c).

تراشه بیوسنسور گرافن به تکنولوژی Field Effect Biosensing (FEB) وابسته است، به این ترتیب ظرفیت الکتریکی کانال ها و دروازه های موجود یک ترانزیستور گرافینی اثر میدان مغناطیسی، زمانی که اهداف زیست محیطی مناسب به عنوان گیت دی الکتریک روی سطح ثابت می ماند، جا به جا می شود (شکل 1.a). گرافین Pristine برای اهداف مورد نظر عاملدار می شود. سطح گرافن سپس برای کاهش تعاملات غیر اختصاصی، مسدود می شود. بیوسنسورها در طول این فرایند نظارت می شوند، همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است. بدیهی است که بی حرکت شدن آنتی بادی (نوعی پروتئین خونی) موجب افزایش ۲۰٪ در پاسخ ظرفیت الکتریکی شد (شکل 1.e). علاوه بر این، افزایش ۱۰۰٪ در پاسخ C بین مرحله شستشو و پایه کالیبراسیون دیده می شود (شکل 1.e). این نشان می دهد که اصلاحات شیمیایی غیر قابل برگشت روی سطح انجام شده است، که به طور موفقیت آمیز بیوسنسور عاملدار شده است. Anti-Zika NS1 تأثیر بیشتری بر ظرفیت الکتریکی ترانزیستورهای گرافن نسبت به مقاومت منبع



اتصالات کووالانتهی anti-Zika NS1 بر روی تراشه ی بیوسنسور گرافن باعث می شود تا هزینه های کم و حصول قابل انتقال از داده های اتصال سینتیکی در زمان واقعی از طریق فن آوری FEB فراهم شود. تراشه بیوسنسور Agile R100 با anti-Zika NS1 عملکرد دارد، ZIKV NS1 را در غلظت های کم ۰,۴۵ نانومتری تشخیص می دهد.

علاوه بر این، هنگامی که دستگاه با JEV NS1 مورد آزمایش قرار گرفت، هیچ واکنشی متقاطع قابل اندازه گیری وجود نداشت. LLOD و ویژگی آنتی ژن ZIKV NS1 فرصتی برای تشخیص مراحل اولیه بیماری های زودرس عفونی Zika فراهم می کند. پلت فرم Agile R100 FEB یک پایه امیدوار کننده برای توسعه برنامه های کاربردی بالینی Zika و بهبود تست تشخیص در اوایل عفونت فراهم می کند.

#### ۵- مرجع

[1] Afsahi, S.J., Locascio, L.E., Pan, D., Gao, Y., Walker, A.E., Barron, F.E., Goldsmith, B.R., Lerner, M.B., 2017. MRS Adv., 1-7. Centers for Disease Control, 2017. Zika Virus: Case Counts in the US [WWW Document]. May 16, 2017. Clinical Laboratory Standards Institute, 2012. NCCLS Doc. EP15-A2 25.

[2] Esfandiari, A., Kybert, N.J., Dattoli, E.N., Hee Han, G., Lerner, M.B., Akhavan, O., Irajizad, A., Charlie Johnson, A.T., 2013. Appl. Phys. Lett. 103. Food and Drug Administration, 2016. FDA Warns Health Care Providers Against Relying Solely on Zika Virus Serological IgM Assay Results. Reminds them to Wait for Confirmatory Test Results Before Making Patient Management Decisions: FDA Safety Communication [WWW Document]. May 16, 2017.

[3] Gao, L., Ren, W., Xu, H., Jin, L., Wang, Z., Ma, T., Ma, L.-P., Zhang, Z., Fu, Q., Peng, L.-M., Bao, X., Cheng, H.-M., 2012. Nat. Commun. 3, 699. Gao, N., Gao, T., Yang, X., Dai, X., Zhou, W., Zhang, A., Lieber, C.M.,

روی تراشه های بیوسنسور منحصر بفرد عامل دار شده با anti-Zika NS1 به کار گرفته می شود.

JEV NS1 دارای ۵,۵۶٪ آمینواسید اسید با ZIKV است و گونه های بالقوه متقابل واکنشی را نشان می دهد [15]. هنگامی که از یک برآزش نمایی برای نتایج سنسوگرام استفاده می شود ( شکل ۲b)، پاسخ c برای ZIKV NS1 ۸٪ بود. در مقایسه، JEV NS1 حساسی قابل اندازه گیری در هنگام قرار گرفتن در معرض anti-ZIKV NS1 را نشان نداد انتخاب پذیری بالایی برای آنتی ژن ZIKV NS1 نشان داد. اندازه گیری های -Spike in در سرم شبیه سازی شده در دو رقت در چهارنسخه انجام شد تا پتانسیل بهینه سازی این آزمایش برای اهداف تشخیصی را نشان دهد. سنسوگرام ها در شکل 3a نشان داده شده اند و پاسخ های متوسط پس از ۵ دقیقه با انحرافات استاندارد در شکل 3b نشان داده شده است.

رقیق سازی سرم سبب بهبود ضریب درصد تغییرات (CV%) با وجود کاهش پاسخ کلی سنسور می شود. به طور کلی، برامقدار CV% باید  $\geq 20\%$  باشد، با مقدار  $\geq 10\%$ ، یک تست به عنوان یک آزمون قابل اعتماد محسوب می شود. با این حال این پارامترها بر اساس دقت سنجی در رابطه با خطای مجاز بالقوه (موسسه استاندارد های آزمایشگاهی بالینی، ۲۰۱۲) استوار است.

در دقت ۱:۱۰، مقدار CV در حدود ۱۹,۸۹٪ است، در حالیکه در دقت ۱:۱۰۰، CV برابر با ۹,۱۷٪ (جدول تکمیلی S1 را ببینید)، که این امکان را برای یک ارزش تشخیصی در یک محیط بالینی فراهم می کند.

#### ۴- نتیجه گیری

بیماری های واگیردار در حال ظهور مانند زیکا، پیشرفت هایی در بخش های پزشکی و تحقیقاتی به دنبال داشته است. تفسیر نتایج آزمایشات آنتی بادی ویروس زیکا (IgM) ممکن است به علت واکنش پذیری بالا در میان ویروس های مرتبط با ویروسی مانند JEV. بگریج باشد.



- [15] Sikka, V., Chattu, V., Popli, R., Galwankar, S., Kelkar, D., Sawicki, S., Stawicki, S., Papadimos, T., 2016. *J. Glob. Infect. Dis.* 8, 3.
- [16] Sironi, M., Forni, D., Clerici, M., Cagliani, R., 2016. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–18.
- [17] Song, H., Qi, J., Haywood, J., Shi, Y., Gao, G.F., 2016. vol. 23, pp. 3–6.
- [18] Xu, X., Vaughan, K., Weiskopf, D., Grifoni, A., Diamond, M.S., Sette, A., Peters, B., 2016. *PLoS Curr.*
- [19] Zhu, S.E., Krishna Ghatkesar, M., Zhang, C., Janssen, G.C.A.M., 2013. *Appl. Phys. Lett.* 102.
2016. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, 14633–14638.
- [4] Geim, A.K., Novoselov, K.S., 2007. *Nat. Mater.* 6, 183–191. Huzly, D., Hanselmann, I., Schmidt-Chanasit, J., Panning, M., 2016. *Eurosurveillance* 21.
- [5] Kybert, N.J., Han, G.H., Lerner, M.B., Dattoli, E.N., Esfandiari, A., Charlie Johnson, A.T., 2014. *Nano Res.* 7, 95–103.
- [6] Ladhani, S.N., O'Connor, C., Kirkbride, H., Brooks, T., Morgan, D., 2016. *Arch. Dis. Child.* 0, (archdischild–2016–310590).
- [7] Lanciotti, R.S., Kosoy, O.L., Laven, J.J., Velez, J.O., Lambert, A.J., Johnson, A.J., Stanfield, S.M., Duffy, M.R., 2008. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1232–1239.
- [8] Lerner, M.B., Matsunaga, F., Han, G.H., Hong, S.J., Xi, J., Crook, A., Perez-Aguilar, J.M., Park, Y.W., Saven, J.G., Liu, R., Johnson, A.T.C., 2014. *Nano Lett.* 14, 2709–2714.
- [9] Lerner, M.B., Pan, D., Gao, Y., Locascio, L.E., Lee, K., Nokes, J., Afsahi, S., Lerner, J.D., Walker, A., Collins, P.G., Oegema, K., Barron, F., Goldsmith, B.R., 2016. *Sens. Actuators B Chem.*, 1–7.
- [10] Liu, B., Huang, P.-J.J., Zhang, X., Wang, F., Pautler, R., Ip, A.C., Liu, J., 2013. *Anal. Chem.* 85, 10045–10050.
- [11] Lu, Y., Goldsmith, B.R., Kybert, N.J., Johnson, A.T.C., 2010. *Appl. Phys. Lett.* 97.
- [12] Lu, Y., Lerner, M.B., John Qi, Z., Mitala, J.J., Hsien Lim, J., Discher, B.M., Charlie Johnson, A.T., 2012. *Appl. Phys. Lett.* 100.
- [13] Novoselov, K.S., Geim, A.K., Morozov, S.V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S.V., Grigorieva, I.V., Firsov, A.A., 2004. *Science* 306, 666–669, (80-).
- [14] Peterson, L., Jamieson, D., Powers, A., Honein, M., 2016. *N. Engl. J. Med.*, 1602113. Rasmussen, S.A., Jamieson, D.J., Honein, M.A., Petersen, L.R., 2016. *N. Engl. J. Med.*, 1–7.