

РОЗРОБКА ІМУНОБІОСЕНСОРНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ЕКСПРЕС-ДІАГНОСТИКИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

О. Ю. Новгородова, М. Ф. Стародуб
oleksandra_n@yahoo.com

Національний університет біоресурсів та природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна

У статті наведено результати досліджень з розробки імунобіосенсорної тест-системи для експрес-діагностики бактерій *Pseudomonas aeruginosa*, їх детекції в біологічному матеріалі та в об'єктах довкілля.

Оцінку *P. aeruginosa* здійснювали за допомогою аналітичного приладу — імунобіосенсора, на трансдюцерній поверхні якого іммобілізували специфічні антитіла, що взаємодіяли з клітинними антигенами, в результаті чого реєстрували зсув величини резонансного кута. На підготовлену поверхню трансдюцера наносили розчин антитіл, а після промивки фізіологічним розчином — суспензію клітин з відповідною концентрацією (від 10 клітин в 1 мл і на порядки більше). При утворенні на поверхні трансдюцера імунних комплексів спостерігається його відповідний зсув. Зміна величини кута залежить від кількості імунних комплексів, утворених на трансдюцерній поверхні.

У цій розробці був використаний варіант поверхневого плазмонного резонансу, де у якості трансдюцера використовується тонка плівка золота (20 нм), нанесена на скляну пластинку шляхом напилення у вакуумі. Це дозволяє з великою чутливістю виявляти речовини при реєстрації імунореактивної взаємодії та явища поверхневого плазмонного резонансу. Спосіб дозволяє виявляти щонайменше 10 клітин в 1 мл, причому при збільшенні концентрації на порядок статистична вірогідність результату аналізу різко зростає. Лінійність залежності імунобіосенсорного відгуку концентрації *P. aeruginosa* лежить в межах 10^1 – 10^6 клітин в 1 мл. Чутливість цього імунного аналізу може бути суттєво підвищена за використання високоафінних специфічних моноклональних антитіл.

Ключові слова: *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, БАКТЕРІЇ, ПОВЕРХНЕВИЙ ПЛАЗМОННИЙ РЕЗОНАНС, ІМУНОБІОСЕНСОР, ТРАНСДЮСЕР, ЕКСПРЕС-ДІАГНОСТИКА, АНТИГЕН, АНТИТІЛА

DEVELOPMENT OF THE IMMUNOSENSOR SYSTEM FOR EXPRESS-DIAGNOSIS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

O. Yu. Novgorodova, M. F. Starodub
oleksandra_n@yahoo.com

National University of Life and Environmental Science of Ukraine,
15 Heroyiv Oborony Street, Kyiv 03041, Ukraine

The article presents the results of development of the immune biosensor test systems for the express diagnostics of bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, their detection in biological material and in the environment.

Assessment of *P. aeruginosa* was carried out using an analytical device — immunosensor with immobilized specific antibodies on the transducer surface. The antibodies interact with cell antigens, and the resulting shift value resonance angle is recorded. Changing the angle depends on the amount of the immune complexes formed on the transducer surface. The antibody solution was applied on the prepared transducer surface, and after flushing saline the suspension cells with the appropriate concentration (10 cells in 1 ml and more orders) was applied. The interaction on the surface of immune complexes has been observed. This method can detect at least 10 cells in 1 ml.

In our research we used surface plasmon resonance method. As a transducer a thin film of gold (20 nm) was used, which was applied upon a glass plate by evaporation in vacuum. This surface allows detecting substances in the registration immune interactions with great sensitivity. Statistical significance of the analysis grows sharply with the increasing of concentrations. Linearity of the immunosensor is between 10^1 – 10^6 cells in 1 ml. Sensitivity analysis of the immune analyze can be significantly increased using highly specific affinity monoclonal antibodies.

Keywords: *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, BACTERIA, SURFACE PLASMON RESONANCE, IMMUNOSENSOR, TRANSDUCER, EXPRESS-DIAGNOSTICS, ANTIGENS, ANTIBODIES

РАЗРАБОТКА ИММУНОБИОСЕНСОРНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

А. Ю. Новгородова, М. Ф. Стародуб
oleksandra_n@yahoo.com

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,
ул. Героев Оборона 15, г. Киев, 03041, Украина

В статье представлены результаты исследований по разработке иммунобиосенсорной тест-системы для экспресс-диагностики бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, их детекции в биологическом материале и в объектах окружающей среды.

Оценку *P. aeruginosa* осуществляли с помощью аналитического прибора — иммунобиосенсора, на трансдьюсерной поверхности которого иммобилизовали специфические антитела для взаимодействия с клеточными антигенами, в результате чего регистрировали смещение величины резонансного угла. На подготовленную поверхность трансдьюсера наносили раствор антител, а после промывки физиологическим раствором — суспензию клеток с соответствующей концентрацией (от 10 клеток в 1 мл). При образовании на поверхности трансдьюсера иммунных комплексов наблюдается его соответствующий сдвиг. Изменение величины угла зависит от количества иммунных комплексов, образованных на трансдьюсерной поверхности.

В данной разработке был использован вариант поверхностного плазмонного резонанса, где в качестве трансдьюсера используется тонкая пленка золота (20 нм), нанесенная на стеклянную пластинку путем напыления в вакууме. Это позволяет с большой чувствительностью выявлять вещества при регистрации иммунореактивного взаимодействия и явления поверхностного плазмонного резонанса. Способ позволяет выявлять не менее 10 клеток в 1 мл, причем при увеличении концентрации на порядок статистическая достоверность результата анализа резко возрастает. Линейность зависимости иммунобиосенсорного отклика концентрации *P. aeruginosa* лежит в пределах 10^1 – 10^6 клеток в 1 мл. Чувствительность данного иммунного анализа может быть существенно повышена при использовании высоко аффинных специфических моноклональных антител.

Ключевые слова: *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, БАКТЕРИИ, ПОВЕРХНОСТНЫЙ ПЛАЗМОННЫЙ РЕЗОНАНС, ИММУНОБИОСЕНСОР, ТРАНСДЬЮСЕР, ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКА, АНТИГЕН, АНТИТЕЛА

Бактерії *Pseudomonas aeruginosa* відносять до розряду соціально значущих «проблемних» мікроорганізмів, циркуляція яких в навколишньому середовищі потребує постійного моніторингу для забезпечення епідемічного та епізоотологічного благополуччя, що важливо для біобезпеки країни в цілому [1–3]. Традиційні методи бактеріологічної ідентифікації патогенів забезпечують отримання результатів відповідно термінів не раніше 2–3 діб від моменту дослідження, що значно гальмує надання завчасної адекватної допомоги [4, 5].

Біосенсори є потужним аналітичним інструментом і альтернативною технологією

швидкого експресного визначення мікроорганізмів та токсинів [6–8]. Оптичні імунобіосенсори на основі явища поверхневого плазмонного резонансу (ППР) мають низку переваг перед традиційними та іншими інструментальними методами аналізу, а саме: швидкість отримання результатів, можливість проведення аналізу в реальному часі, використання прямої реєстрації аналіту, можливість отримання кількісних і якісних показників залежно від вимог користувача, простота у використанні, можливість проведення аналізу за межами лабораторії та його дешевизна [9, 10]. Крім цього, вони демонструють високу чутливість при визначенні мікроорганізмів, яка в кілька разів пере-

вищує чутливість методу твердофазного імуноферментного аналізу [11–14].

Імунобіосенсорна тест-система на основі ППР охоплює розробку методик попередньої підготовки чутливої поверхні біосенсора та зразків для аналізу [15, 16].

Метою нашої роботи було розробити імунобіосенсорну тест-систему для експрес-діагностики *P. aeruginosa* в біологічному матеріалі та в об'єктах довкілля.

Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень були високоспецифічні сироватки проти *P. aeruginosa* (штам *P. aeruginosa* ATCC 9027), отримані шляхом імунізації тварин-донорів (в нашому випадку — кролів) та аналітичний прилад імунобіосенсор «Плазмонтест» — оптичний пристрій на базі ППР, оснащений CCD-матрицею на 2048 пікселів, який з'єднується безпосередньо з комп'ютером та реєструє і обробляє отриманий оптичний сигнал. Прилад розроблено в Інституті кібернетики ім. В. М. Глушкова НАН України (патент UA 100934). За допомогою імунобіосенсора реєстрували взаємодію «антиген-антитіло» в режимі реального часу. На підготовлену поверхню трансдюцера наносили розчин антитіла, а після промивки фіз-розчином — суспензію клітин з відповідною концентрацією (від 10 клітин в 1 мл і на порядки більше).

Аналіз здійснювався таким чином: поверхню трансдюцера попередньо обробляли водним розчином поліаліламіну гідрохлориду (за концентрації 20 нг/мл), далі на ній іммобілізували білок А з *Staphylococcus aureus* за концентрації 20 нг/мл в забуференому фізіологічному розчині (ЗФР) рН 7,4, 140 мМ NaCl, а потім після промивки тим же буфером поверхню обробляли розчином, що містить специфічні антитіла, попередньо розведені в ЗФР. На наступній стадії після промивки трансдюцера ЗФР на його поверхні іммобілізували бичачий сироватковий альбумін (БСА) для блокування можливих неспецифічних сайтів зв'язування, потім її знову промивали за допомогою ЗФР. Кожна з чотирьох стадій попередньої обробки трансдюцерної поверхні

тривала 10–15 хв і здійснювалась за кімнатної температури. Після закінчення попередньої обробки трансдюцерної поверхні реєстрували величину резонансного кута в присутності ЗФР. Після цього комірку, де розташована трансдюцерна поверхня, наповнювали досліджуваним розчином, що містить бактеріальні клітини, та знову фіксували величину резонансного кута. При утворенні на поверхні трансдюцера імунних комплексів спостерігається його відповідний зсув. Зміна величини кута залежить від кількості імунних комплексів, утворених на трансдюцерній поверхні.

Попередньо підготовлені трансдюцерні поверхні в підсушеному на повітрі вигляді за кімнатної температури можуть зберігатись до 10 днів у холодильнику. Такі поверхні можуть бути потім використані при необхідності. У такому разі спочатку реєстрували резонансний кут при введенні у вимірювальну комірку ЗФР (10 мкл). Потім у неї вводили розчин, що містив пробу з клітинами патогену, витримували його там 10–15 хв при кімнатній температурі, комірку промивали ЗФР та реєстрували зсув резонансного кута. Для побудови калібрувальної кривої використовували послідовне розведення популяції *P. aeruginosa* із забезпеченням в розчині концентрації від 10 до 10^5 клітин/мл.

Результати і обговорення

При падінні плоскополяризованого лазерного променя на поверхню шару золота при визначеному (критичному) куті спостерігається явище ППР, яке виникає при появі осциляції щільності зарядів на межі між двома середовищами з металом та діелектриком. Частина енергії променя витрачається на осциляцію, тому інтенсивність віддзеркаленого променя при визначеному (критичному) куті зменшується, а кут віддзеркалення є сталою характеристикою конкретного стану трансдюцера. При іммобілізації антигену (антитіла) на поверхню золота критичний кут, при якому виникає ППР, змінюється, і величина зсуву кута перебуває у прямій залежності від концентрації реагенту, який визначається. Зазвичай чутливість визначення низки біологічних ана-

літів (окремих мікотоксинів, білків тощо) становить 5 нг/мл.

У цій розробці був використаний варіант ППР, де у якості трансдюцера (сенсорного чипа) використовується тонка плівка золота (20 нм), яка наносилась на скляну пластинку

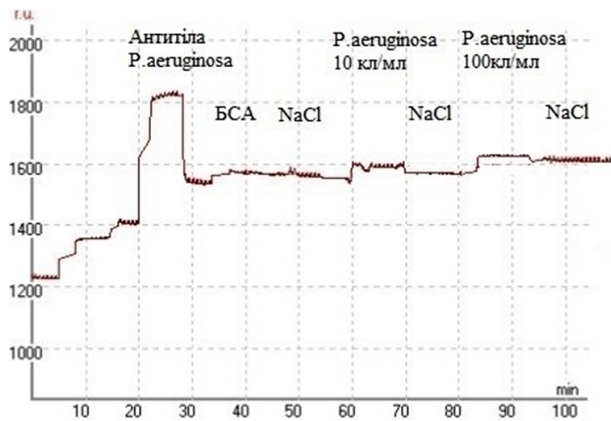


Рис. 1. Графік відгуку біосенсора «Плазмонотест» при визначенні *P. aeruginosa* в модельних розчинах за проведення попередньої підготовки трансдюцера
Fig. 1. Graph of the response biosensor "Plazmonotest" determining *P. aeruginosa* in model solutions during preconditioning of transducer

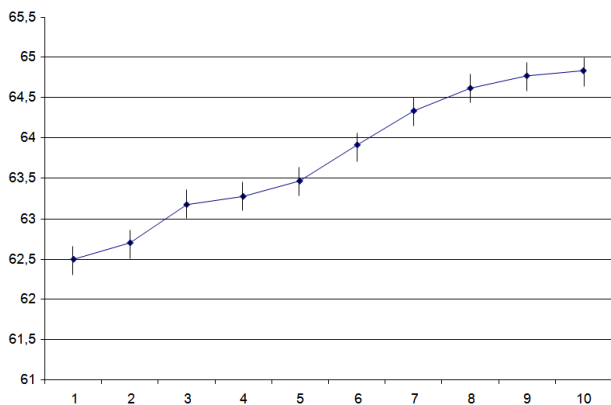


Рис. 2. Залежність зміни рефракторного кута ППР імунного біосенсора від концентрації клітин *P. aeruginosa* у зразку, що піддається аналізу.
По осі абсцис (при наявності на трансдюцерній поверхні): 1 — ПАА; 2 — білка А; 3 — специфічних антитіл; 4 — БСА; 5 — 10^1 ; 6 — 10^2 ; 7 — 10^3 ; 8 — 10^4 ; 9 — 10^5 та 10^6 клітин в 1 мл.
По осі ординат — кутові хвилини

Fig. 2. Dependence of change of the refractive angle immune SPR biosensor from cell concentration of *P. aeruginosa* in a sample undergoing analysis.
On the horizontal axis (on the transducer's surface): 1 — PAA; 2 — protein A; 3 — specific antibodies; 4 — BSA; 5 — 10^1 ; 6 — 10^2 ; 7 — 10^3 ; 8 — 10^4 ; 9 — 10^5 and 10 — 10^6 cells in 1 ml.
On the vertical axis: angular minutes

шляхом наплення у вакуумі. Цей сенсорний чип дозволяє з великою чутливістю виявляти речовини при реєстрації імунореактивної взаємодії та явища ППР.

За перевищення критичного кута плоскополяризованого променя світла за найвищого значення коефіцієнта заломлення відбувається повне внутрішнє віддзеркалення. У цих умовах в поверхневих плазмонних поляритонах спостерігають обумовлений перекачкою енергії випромінювання резонансний мінімум залежності інтенсивності віддзеркалення випромінювання від кута падіння лазерного променя на плівку золота. Взаємодія антигену (штам *P. aeruginosa* ATCC 9027) зі специфічними до цього білка антитілами реєструється після зміни кута віддзеркалення за типом зазначеної вище залежності, що обумовлює можливість моніторингу процесу зв'язування антигену з антитілом і, врешті-решт, високу чутливість при визначенні рівня антигену, а значить, і можливість ранньої та статистично вірогідної діагностики *P. aeruginosa*.

Результати досліджень оброблені статистично з використанням пакета програм Microsoft Excel 2003 (for Windows XP).

Результати тестування різних концентрацій *P. aeruginosa* представлені на рис. 1, 2.

Лінійне наростання сигналу спостерігалось в межах концентрації бактеріальних клітин від 2 до 6×10^6 клітин/мл. Аналіз статистичної значимості вказує на стандартне відхилення 5 %. Спосіб дозволяє виявляти в межах 10 клітин в 1 мл, причому їх концентрація в межах 100 клітин в 1 мл може бути виявлена з великою статистичною вірогідністю. Причому чутливість цього імунного аналізу, як й іншого імунного типу, може бути суттєво підвищена при використанні високо афінних специфічних моноклональних антитіл.

Висновки

Імунобіосенсорна тест-система на основі ППР для експрес-діагностики здатна здійснювати реєстрацію наявності бактерій *P. aeruginosa* в модельних розчинах в межах 10 мікробних клітин в 1 мл, причому при підвищенні їх концентрації в межах 100 клітин в 1 мл ре-

зультати аналізу набувають статистичної вірогідності.

Лінійна залежність відгуку імунного біосенсора була в межах концентрації 10^1 – 10^6 клітин в 1 мл. Чутливість цього імунного аналізу може бути суттєво підвищена за використання високоафінних специфічних моноклональних антитіл.

Запропонований спосіб детекції дає можливість різко прискорити час, необхідний для аналізу бактерій в модельних розчинах, а у разі попередньої підготовки трансдюцерної поверхні — до 10–15 хвилин.

Перспективи подальших досліджень.

У подальших дослідженнях ми плануємо експериментально перевірити ефективність використання розробленої імунобіосенсорної тест-системи для експрес-діагностики наявності бактерій *P. aeruginosa* в низці реальних зразків.

1. Lazoryshynets V. V., Salmanov A. G., Mariyevskyy V. F., Khobzey M. K. The antibiotic resistance of clinical strains of *Pseudomonas Aeruginosa* in surgical hospitals of Ukraine in 2010. Ukraine. *Health of the Nation*, 2011, no. 2, pp. 162–169.

2. Yang L., Bashir R. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Biotechnol. Adv.*, 2008, no. 26, pp. 135–150.

3. Verbitsky P. I., Kosenko N. V., Avdosyeva I. K., Melnychuk I. L., Basarab A. B., Zon G. A. Pseudomonosis of birds. Guidelines, Kyiv, 2000, 16 p. (in Ukrainian)

4. Pirogov L. V., Starodub M. F. Immobilization of antigen Bovine leukemia virus on the surface of immune biosensor. *Biotechnologia Acta*, 2008, vol. 1, no. 2, pp. 52–58. Available at: http://nbuv.gov.ua/UJRN/biot_2008_1_2_7 (in Ukrainian)

5. Smirnov V. V., Kyprianova E. A. *Bacteria Pseudomonas*, Kyiv, Naukova Dumka, 1990, 264 p. (in Ukrainian)

6. Vaschyk E. V. Modern diagnostics of the pseudomonosis in poultry. *Bulletin of Sumy National Agrarian University*. Series “Veterinary Medicine”, 2013, no. 2, pp. 98–101. (in Ukrainian)

7. Koubová V, Brynda E, Karasová L, Škvor J, Homola J, Dostálek J, Tobiška P, Rošický J. Detec-

tion of foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2001, vol. 74, no. 1–3, pp. 100–105.

8. Song J. M. Vo-Dinh. Miniature biochip system for detection of *Escherichia coli* 0157:H7 based on antibody immobilized capillary reactors and enzyme-linked immunosorbent assay. *Analytica Chimica Acta*, 2004, vol. 507, no. 1, pp. 115–121.

9. Starodub N. F., Ogorodnychuk Yu. A., Romanov V. O. Optical immune biosensor based on the surface plasmon resonance for the control of *Salmonella typhimurium* level in solutions. *Scientific Bulletin of NUBiP Ukraine*, Series “Veterinary medicine, quality and safety of food”, 2010, vol. 151, no. 2, pp. 183–189.

10. Starodub N. F., Ogorodnychuk I., Lebedeva T., Shpylovyy P. Optical immune biosensor “Plasmon Test” for the determination of *Salmonella typhimurium*. *Sensor Electronics and Microsystems Technology*, 2013, vol. 10, no. 1, pp. 106–113.

11. Starodub N. F., Ogorodnychuk I., Lebedeva T., Shpylovyy P. Optical immune biosensors for *Salmonella typhimurium* detection. *Advances in Biosensors and Bioelectronics (ABB)*, 2013, vol. 2, no. 3, pp. 39–46.

12. Starodub N. F., Slyshyk N. F., Ogorodnychuk Yu. O., Sitnik Yu. A. Biosensors for the control of some toxins, viral and microbial infections to prevent actions of bioterrorists. In Proceeding: “*Portable Sensors for the Rapid Determination of Chemical and Biological Agents and other Weapons of Terrorism*”, Ed. D. Nicoleties, NATO Ser. For Peace, Ser. B — Physics and Biophysics, 2012, vol. 5, pp. 95–117.

13. Oh B. K., Lee W., Kim Y. K., Lee W. H., Choi J. W. Surface plasmon resonance immunosensor using self-assembled protein G for the detection of *Salmonella paratyphi*. *J. Biotechnol.* 2004, vol. 1, no. 111 (1), pp. 1–8.

14. Otten W., Gilligan C.A., Thornton C.R. Quantification of fungal antigens in soil with a monoclonal antibody-based ELISA: Analysis and reduction of soil-specific bias. *Phytopathology*, 1997, no. 87, pp. 730–736.

15. Qi C., Gao G., Jin G. Label-free Biosensors for Health Applications. In book “Biosensors for Health, Environment and Biosecurity”, edited by Pier Andrea Serra. InTech, 2011, 550 p.

16. Starodub N. F. Efficiency of Biosensors in Environmental Monitoring. Book of SERIES IN SENSORS, Portable Biosensing of Food Toxicants and Environmental Pollutants, New York, CRC Press, Taylor&Francis Croup Boca Raton London, 2013, pp. 515–560.