

УДК 602.1:53.082.9:579-07

НОВГОРОВОДА О. Ю., наук. співробітник

СТАРОДУБ М. Ф., д-р біол. наук

УШКАЛОВ В. О., д-р вет. наук

Національний університет біоресурсів і природокористування України

oleksandra_n@yahoo.com; nikstarodub@yahoo.com; ushkalov63@gmail.com

ЕКСПРЕС-ВИЗНАЧЕННЯ ПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ НА ОСНОВІ ІМУНОБІОСЕНСОРНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ

Представлено результати досліджень з розробки імунобіосенсорної тест-системи для експресної детекції патогенних бактерій в біологічному матеріалі та в об'єктах довкілля. Оцінку мікроорганізмів здійснювали за допомогою аналітичного приладу – імунобіосенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР), за принципом постановки імунної реакції «антиген-антитіло» в режимі реального часу на поверхні трансдюцера, в результаті утворення імунного комплексу реєструється зсув величини резонансного кута. Спосіб дозволяє виявляти щонайменше 10 клітин в 1 мл, причому за збільшення концентрації на порядок, – статистична вірогідність результату аналізу різко зростає. Чутливість залежності імунобіосенсорного відгуку від концентрації досліджуваних бактерій лежить в межах 10^1 – 10^7 кліт/см³.

Ключові слова: біосенсор, мікроорганізми, бактерії, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, експрес-діагностика, трансдюцер антитіла, антиген.

Постановка проблеми, аналіз останніх досліджень і публікацій. Циркуляція патогенних бактерій в навколишньому середовищі потребує постійного моніторингу для забезпечення епідемічного та епізоотологічного благополуччя, що важливо в цілому для біобезпеки країни. Традиційні методи бактеріологічної ідентифікації патогенних мікроорганізмів, таких як *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, потребують не менше 2 годин для здійснення аналізу в умовах добре обладнаної лабораторії, забезпечують отримання результатів відповідно до термінів не раніше 2–3 діб від моменту дослідження, і зазвичай, не здатні виявляти патогени в кількості від 10^1 мікробних клітин у 1 см³ [1–5].

Біосенсори є потужним аналітичним інструментом і альтернативною технологією швидкого експресного визначення мікроорганізмів та токсинів [6–8]. Оптичні імунобіосенсори на основі явища ППР мають ряд переваг порівняно з традиційними та іншими інструментальними методами аналізу, а саме: швидкість отримання результатів, можливість проведення аналізу в реальному часі, використання прямої реєстрації аналізу, 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 за визначення мікроорганізмів, яка в декілька разів перевищує чутливість методу твердофазного імуноферментного аналізу [11–14].

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

Мета досліджень – розробити імунобіосенсорну тест-систему для експрес-визначення патогенних бактерій в біологічному матеріалі та в об'єктах довкілля.

Матеріал і методика дослідження. Матеріалом для досліджень були високоспецифічні сироватки проти *Pseudomonas aeruginosa* (штам *P. aeruginosa* ATCC 9027, наданий Державним науково-контрольним інститутом біотехнології штамів і мікроорганізмів, м. Київ), отримані шляхом імунізації тварин-донорів (в нашому випадку кролів) та аналітичний прилад імунобіосенсор «Плазмонтест», що являє собою 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 імунобіосенсору реєстрували взаємодію антиген-антитіло в режимі реального часу.

Особливістю імунобіосенсора «Плазмонтест» є те, що чутливий шар формується на скляній пластинці, поверхня якої покрита 1–2 нм адгезійним шаром ніобію та 50 нм плівкою золота, що забезпечує виникнення ППР. Під час падіння плоскополяризованого лазерного променя на поверхню шару золота, за визначеного (критичного) кута, виникає явище ППР, яке з'являється за

виникнення осциляції щільності зарядів на межі між двома середовищами з металом та діелектриком. Частина енергії променя витрачається на осциляцію і тому інтенсивність віддзеркаленого променя, за визначеного (критичного) кута, зменшується, а кут віддзеркалення є сталою характеристикою конкретного стану трансдюцера. При іммобілізації антитіл на поверхню золота критичний кут, за якого виникає ППР змінюється, і величина зсуву кута знаходиться в прямій залежності від концентрації реагенту, який визначається. Зазвичай чутливість визначення ряду біологічних аналітів становить на рівні 5 нг/см^3 .

У разі перевищення критичного кута плоскополяризованого променя світла, за найвищого значення коефіцієнта заломлення, відбувається повне внутрішнє віддзеркалення. У цих умовах, у поверхневих плазмонних поляритонах, спостерігають, обумовлений перекачкою енергії випромінювання, резонансний мінімум залежності інтенсивності віддзеркалення випромінювання від кута падіння лазерного променя на плівку золота. Взаємодія антигену із специфічними до цього білка антитілами, реєструється за зміною кута віддзеркалення по типу зазначеної вище залежності, що обумовлює можливість моніторингу процесу зв'язування антигену з антитілом і, врешті решт – високу чутливість за визначення рівня антигену, а значить і можливість ранньої та статистично достовірної діагностики патогенних бактерій. Згідно з останніми даними літератури, іммобілізація антитіл на чисту поверхню золота є досить неефективною для розпізнавання антигенів, оскільки специфічні сайти зв'язування можуть блокуватися, внаслідок того, що антитіла хаотично зв'язуються з поверхнею. Тому бажано проводити попередню підготовку трансдюцера нанесенням різних речовин, що забезпечують сайт-орієнтовне зв'язування антитіл, в подібних випадках активність антитіл може зростати до $> 70 \%$.

Отже, в нашому випадку, підготовку робочої поверхні імуносенсору здійснювали так: вкривали поліелектричною нерозчинною плівкою з використанням поліаліламіну гідрохлориду (ПАА), в концентрації 1 мг/см^3 , потім наносили розчин білка А від *Staphylococcus aureus* в концентрації 1 мг/см^3 . Після нанесення білка А на поверхню трансдюцера адсорбували поліклональні антитіла специфічні до *P. aeruginosa*, потім наносили бичачий сироватковий альбумін (БСА) для блокування можливих вільних ділянок на золотій поверхні, в концентрації 1 мг/мл . Нанесення БСА не змінило суттєво величину резонансного кута, – значить на робочій поверхні імуносенсора фактично не лишилось вільних місць для зв'язування, а концентрація антитіл була достатньою для створення максимально щільного шару.

Наступним етапом експерименту було нанесення розчинів різних концентрацій мікроорганізму, який визначається. В нашому випадку – *P. aeruginosa* (штам *P. aeruginosa* ATCC 9027, ДНКІБШМ, м. Київ). З вихідного розчину готували 6 робочих розчинів різних концентрацій від 10^1 до 10^6 кліт./ см^3 . Час експозиції кожного розчину становив від 5 до 10 хвилин за температури 25°C , оскільки надалі зміна резонансного кута не спостерігалася. На кожному етапі промивали комірки фізіологічним розчином.

Основні результати дослідження. Чутливість імунобіосенсорної тест-системи для визначення патогенних бактерій, на базі аналітичного приладу «Плазмонотест» була в межах 10^1 – 10^7 кліт./ см^3 . Доведено, що на рівень чутливості приладу впливає значною мірою попередня обробка робочої поверхні трансдюцера, метою якої є створення орієнтованого шару антитіл.

В результаті фізичної адсорбції антитіл *P. aeruginosa* безпосередньо на золотій поверхні трансдюцера імунобіосенсора «Плазмонотест» чутливість приладу становила 10^3 – 10^7 кліт./ см^3 .

Для порівняння одночасно проводили детекцію *P. aeruginosa* методом твердофазного імуноферментного аналізу. При цьому антиген вдалось визначити на рівні 10^4 кліт./ см^3 за загальної тривалості аналізу близько 5 годин.

Лінійне наростання сигналу спостерігалось у межах концентрації бактеріальних клітин від 2 до 6×10^6 клітин/ см^3 . Аналіз статистичної значимості вказує на стандартне відхилення 5% . Причому чутливість цього імуноаналізу, як і іншого імуноаналізу, може бути суттєво підвищена за використання високоафінних специфічних моноклональних антитіл.

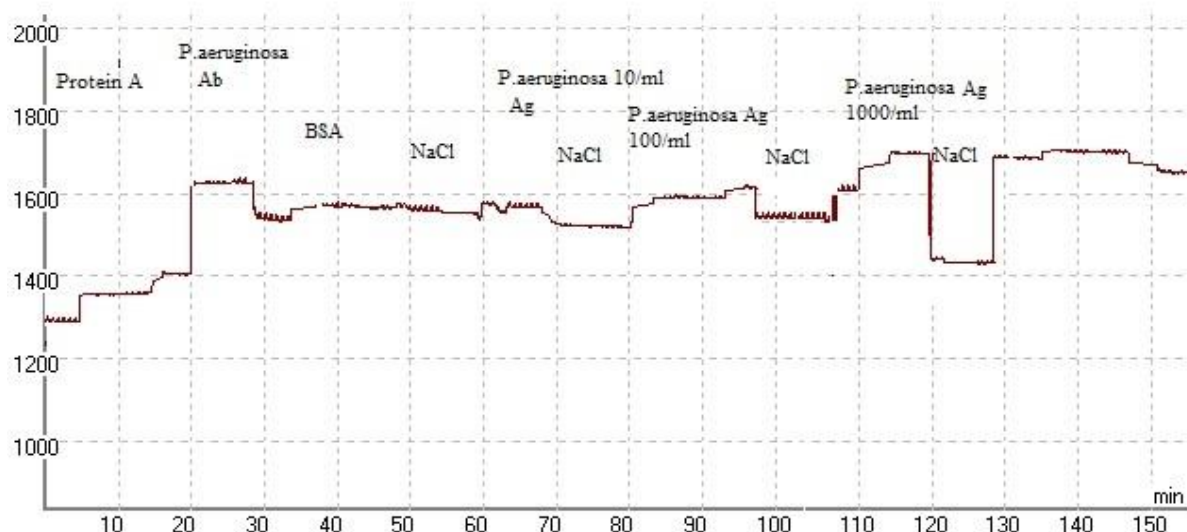


Рис. 1. Графік відгуку біосенсора «Плазмонотест» за визначення *P. aeruginosa* в модельних розчинах під час проведення попередньої підготовки трансдюцера.

Висновки. Імунобіосенсорна тест-система на основі приладу «Плазмонотест» може використовуватись для первинного скринінгу мікробіологічного забруднення. Запропонований спосіб детекції дає можливість різко прискорити час необхідний для аналізу бактерій в модельних розчинах та біологічних об'єктах, а у разі попередньої підготовки трансдюцерної поверхні, до 10–15 хвилин.

З'ясовано залежність чутливості імунобіосенсорів від попередньої обробки трансдюцера. Чутливість відгуку імунобіосенсора лежить в межах концентрації 10^1 – 10^7 кліт/см³.

Причому чутливість цього імуноаналізу, як і іншого імуноного типу, може бути суттєво підвищена за використання специфічних моноклональних антитіл, а також за попереднього концентрування антигену в досліджуваних зразках шляхом використання магнітних частинок або афінних колонок.

У подальших дослідженнях автори планують експериментально перевірити ефективність використання розробленої імунобіосенсорної тест-системи для експрес-діагностики наявності патогенних бактерій в ряді реальних зразків.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антибіотикорезистентність клінічних штамів *Pseudomonas Aeruginosa* у хірургічних стаціонарах України в 2010 році / В.В. Лазоришинець, А.Г. Салманов, В.Ф. Марієвський, М.К. Хобзей // Здоров'я нації. – 2011. – № 2. – С. 162–169.
2. The rapid alert system for food and feed 2013, Annual report. – Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2014. – http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/index_en.htm.
3. Псевдомоназ птиці: методичні рекомендації / [Вербицький П.І., Косенко М.В., Авдосьева І.К. та ін.]. – К.: ДДВМ, 2000. – 16 с.
4. Смирнов В.В. Бактерії роду *Pseudomona* / В.В. Смирнов, Є.А. Кіпріянова. – К.: Наук. думка, 1990. – 263 с.
5. Rehm V.H.A. *Pseudomonas*: Model Organism, Pathogen, Cell Factory / V.H.A. Rehm. – Weinheim: Wiley-VCH, 2008. – 403 p.
6. Пирогова Л.В. Імобілізація антигену ретровірусу лейкозу великої рогатої худоби на поверхні імуноного біосенсора / Л.В. Пирогова, М.Ф. Стародуб // *Biotechnologia Acta*. – 2008. – Т. 1, № 2. – С. 52–58.
7. Detection of foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors / V. Koubová, E. Brynda, L. Karasová [et al.] // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2001. – Vol. 74, № 1–3. – P. 100–105.
8. Magneto Actuated Biosensors for Foodborne Pathogens and Infection Diseases Affecting Global Health / I.M. Pivdori, A.B. Aissa, D. Brandao [et al.] // *Biosensors for Security and Bioterrorism Applications: Part of the series Advanced Sciences and Technologies for Security Applications*, 13 March. – 2016. – P. 83–114.

9. Optical immune biosensor based on the surface plasmon resonance for the control of *Salmonella typhimurium* level in solutions / N.F. Starodub, Ju.A. Ogorodnijchuk, V.O. Romanov [et al.] // Scientific Bulletin NUBiP Ukraine, Series "Veterinary medicine, quality and safety of food". – 2010. – Vol. 151, № 2. – P. 183–189.
10. Optical immune biosensor «Plasmon Test» for the determination of *Salmonella typhimurium* / N.F. Starodub, I. Ogorodniichuk, T. Lebedeva, P. Shpylovy // Sensor Electronics and Microsystems Technology. – 2013. – Vol. 10, № 1. – P. 106–113.
11. Wang Y. Gold nanoparticle-labeled biosensor for rapid and sensitive detection of bacterial pathogens / Y. Wang, E. Alcolija // Journal of Biological Engineering. – 2015. – Vol. 9. – P. 16.
12. Starodub N. Efficiency of Instrumental Analytical Approaches at the Control of Bacterial Infections in Water, Foods and Feed, in Biosensors for Security and Bioterrorism Applications / N. Starodub, J. Ogorodniichuk, O. Novgorodova; edited by Dimitrios P. – Nikolelis, 2016. – 199 p.
13. Oh B.K. Surface plasmon resonance immunosensor using self-assembled protein G for the detection of *Salmonella paratyphi* / B.K. Oh, W. Lee, Y.K. Kim // J Biotechnol. – 2004. – Vol. 1, № 111 (1). – P. 1–8.
14. Abdelhamida H. Multifunctional graphene magnetic nanosheet decorated with chitosan for highly sensitive detection of pathogenic bacteria / H. Abdelhamida, H.-F. Wu // J. Mater. Chem. B. – 2013. – Vol. 1. – P. 3950–3961.
15. Qi C. Label-free Biosensors for Health Applications / C. Qi, G. Gao, G. Jin. // 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 / N.F. Starodub // Book of SERIES IN SENSORS: Portable Biosensing of Food Toxicants and Environmental Pollutants. – CRC Press, Taylor&Francis Croup Boca Raton London, NewYork, 2013. – P. 515–560.

REFERENCES

1. Antybiotykozystentnist' klinichnyh shtamiv Pseudomonas Aeruginosa u hirurgichnyh stacionarah Ukrai'ny v 2010 roci / V.V. Lazoryshynec', A.G. Salmanov, V.F. Marijevs'kyj, M.K. Hobzej // Zdorov'ja nacii'. – 2011. – № 2. – C. 162–169.
2. The rapid alert system for food and feed 2013, Annual report. – Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2014. – http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/index_en.htm.
3. Pseudomonoz ptyci: metodychni rekomendacii' / [Verbyc'kyj P.I., Kosenko M.V., Avdos'eva I.K. ta in.]. – K.: DDVM, 2000. – 16 s.
4. Smyrnov V.V. Bakterii' rodu Pseudomona / V.V. Smyrnov, Je.A. Kiprijanova. – K.: Nauk. dumka, 1990. – 263 s.
5. Rehm B.H.A. Pseudomonas: Model Organism, Pathogen, Cell Factory / B.H.A. Rehm. – Weinheim: Wiley-VCH, 2008. – 403 p.
6. Pyrogoval L.V. Imobilizacija antygeny retrovirusu lejkozy velykoi' rogatoi' hudoby na poverhni imunnogo biosensora / L.V. Pyrogoval, M.F. Starodub // Biotechnologia Acta. – 2008. – T. 1, № 2. – S. 52–58.
7. Detection of foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors / V. Koubová, E. Brynda, L. Karasová [et al.] // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2001. – Vol. 74, № 1–3. – P. 100–105.
8. Magneto Actuated Biosensors for Foodborne Pathogens and Infection Diseases Affecting Global Health / I.M. Pivdori, A.B. Aissa, D. Brandao [et al.] // Biosensors for Security and Bioterrorism Applications: Part of the series Advanced Sciences and Technologies for Security Applications, 13 March. – 2016. – P. 83–114.
9. Optical immune biosensor based on the surface plasmon resonance for the control of *Salmonella typhimurium* level in solutions / N.F. Starodub, Ju.A. Ogorodnijchuk, V.O. Romanov [et al.] // Scientific Bulletin NUBiP Ukraine, Series "Veterinary medicine, quality and safety of food". – 2010. – Vol. 151, № 2. – P. 183–189.
10. Optical immune biosensor «Plasmon Test» for the determination of *Salmonella typhimurium* / N.F. Starodub, I. Ogorodniichuk, T. Lebedeva, P. Shpylovy // Sensor Electronics and Microsystems Technology. – 2013. – Vol. 10, № 1. – P. 106–113.
11. Wang Y. Gold nanoparticle-labeled biosensor for rapid and sensitive detection of bacterial pathogens / Y. Wang, E. Alcolija // Journal of Biological Engineering. – 2015. – Vol. 9. – P. 16.
12. Starodub N. Efficiency of Instrumental Analytical Approaches at the Control of Bacterial Infections in Water, Foods and Feed, in Biosensors for Security and Bioterrorism Applications / N. Starodub, J. Ogorodniichuk, O. Novgorodova; edited by Dimitrios P. – Nikolelis, 2016. – 199 p.
13. Oh B.K. Surface plasmon resonance immunosensor using self-assembled protein G for the detection of *Salmonella paratyphi* / B.K. Oh, W. Lee, Y.K. Kim // J Biotechnol. – 2004. – Vol. 1, № 111 (1). – P. 1–8.
14. Abdelhamida H. Multifunctional graphene magnetic nanosheet decorated with chitosan for highly sensitive detection of pathogenic bacteria / H. Abdelhamida, H.-F. Wu // J. Mater. Chem. B. – 2013. – Vol. 1. – P. 3950–3961.
15. Qi C. Label-free Biosensors for Health Applications / C. Qi, G. Gao, G. Jin. // 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 / N.F. Starodub // Book of SERIES IN SENSORS: Portable Biosensing of Food Toxicants and Environmental Pollutants. – CRC Press, Taylor&Francis Croup Boca Raton London, NewYork, 2013. – P. 515–560.

Экспресс-определение патогенных бактерий на основе иммунобиосенсорной тест-системы

А. Ю. Новгорова, М. Ф. Стародуб, В. А. Ушкалов

Представлены результаты исследований по разработке иммунобиосенсорной тест-системы для экспресс-детекции патогенных бактерий в биологическом материале и в объектах окружающей среды. Оценку микроорганиз-

мов осуществляли с помощью аналитического прибора – иммунобиосенсора на основе поверхностного плазменного резонанса (ППР), по принципу постановки иммунной реакции «антиген-антитело» в режиме реального времени на поверхности трансдьюсера, в результате образования иммунного комплекса регистрируется смещение величины резонансного угла. Способ позволяет выявлять не менее 10 клеток в 1 см, причем при увеличении концентрации на порядок, – статистическая достоверность результата анализа резко возрастает. Чувствительность зависимости иммунобиосенсорного отклика от концентрации исследуемых бактерий лежит в пределах 10^1 – 10^7 клет/см³.

Ключевые слова: биосенсор, микроорганизмы, бактерии, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, экспресс-диагностика, трансдьюсер, антитела, антиген.

Express determination of the pathogenic bacteria based on the immunosensor test-system

O. Novgorodova, M. Starodub, V. Ushkalov

In recent years public concern about the safety of foods of animal origin has heightened due to problems that have arisen with outbreaks of foodborne bacterial infections, as well as growing concern about veterinary drug residues and microbial resistance to antibiotics. These problems have drawn attention to feeding practices within the livestock industry and have prompted health professionals and the feed industry to closely scrutinize food quality and safety problems that can arise in foods of animal origin as a result of animal feeding systems.

Identification and detection of pathogen bacteria is in general required for routine surveillance and monitoring, evaluation of the most common food sources responsible for specific foodborne, during regulatory actions or from investigation of a foodborne outbreak. A wide range of methods are available for pathogen bacteria identification and detection, in connection with these programs, for the prevention and identification of problems related to health and safety. The choice of the right method is a key factor for the detection and identification of pathogen microorganism and the intended use of the method, for instance whether for a qualitative or semi-quantitative screening, quantitative and/or confirmatory analysis, must be clearly defined. To reduce the likelihood of bacterial illnesses, the early detection of pathogens is the key. Conventional practice commonly involves cultivating sample cells in laboratory settings, making this procedure time-consuming and costly. Additionally, the cells become “stressed” during transportation from the farm or factory to the laboratory, and this can lead to false positives. The gathering, identification of pathogens and bacteriological defense measures in advance in order to be effective, is very difficult. The environment (water, air, soil) reside in different amounts pathogenic microbes and various organic compounds, so when identifying bacteriological pathogens difficulties arise.

Depending on pathogen and method, tests typically require 2–3 days to obtain a result. Rapid methods, however, are based on immunochemical or nucleic acid technologies. Commercially available rapid tests can provide results in 8–48 h but results from these screening tests are presumptive and require further isolation of organism as proof of contamination. Thus, the combination of speed and sensitivity is the key for any rapid detection method.

The article presents the results on the development of the immune biosensor test systems for the express-diagnostics of pathogenic bacteria, their detection in biological material and in the environment. Assessment of bacteria was carried out using an analytical device – immunosensor, with immobilized specific antibodies on the transducer surface.

Immunosensor development and application are exciting fields in applied microbiology. The basic idea is simple, but the actual operation is quite complex and involves much instrumentation. Basically, an immunosensor is a molecule or a group of molecules of biological origin attached to a signal recognition material. When an analyte comes in contact with the biosensor, the interaction will initiate a recognition signal that can be reported in an instrument. Many types of biosensors have been developed, including a large variety of enzymes, polyclonal and monoclonal antibodies, nucleic acids, and cellular materials.

Optical immuno-sensing technologies can be split into two categories, namely luminescence (fluorescence) sensors and label-free sensors. In the first case sensitive elements, such as proteins, antibodies, enzymes, nano-particles are conjugated with the fluorescent labels; binding analyte molecules to such receptors causes luminescence (fluorescence) or its quenching. As result, the response can be easily visualized either by naked eye or with a suitable photodetector. The example could be the method of ELISA, which was established as a standard bio-sensing method in analytical laboratories, and other bio-sensing methods are commonly compared with it. Label-free optical methods based on the phenomenon of evanescent field or wave which appear as electromagnetic wave propagating along the interface between two materials with the different refractive indices when the light enter the material with lower refractive index at total internal reflection condition are the main focus of this article.

Phenomenon of the SPR in different modifications is widely used for biosensors creating. The most common SPR sensor platforms are based on the prism scheme and angular modulation, but recently, a lot of attention have been paid to the study of waveguides with optical phase detection technique since it demonstrates high sensitivity for the detection of bio-reactions. As a biological sensing elements the proteins (e.g., antibodies) and peptides are the most frequently used. In addition, it was shown that immobilization of biomolecules to the bare transducer surfaces has negative impact to their reactivity therefore different methods of previous surface preparation are used. The main aim of surface modification is to provide maximum interaction between selective biomolecule (ligand) and analyte.

The antibodies have interact with cell antigens, and the resulting shift value resonance angle 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 - suspension cells with the appropriate concentration (10 cells in 1 ml and more orders). The interaction on the surface of immune complexes observed. This method can detect 10 cells in 1 ml at least. In our research we used surface plasmon resonance method, as transducer uses a thin film of gold (20 nm), on which was applied to a glass plate by evaporation in a vacuum. This surface allows to detect substances in the registration immune interactions with great sensitivity. Statistical significance of the analysis grows sharply with the increasing of concentrations. Sensitivity of the immunosensor is between 10^1 – 10^6 cells in 1 ml. Sensitivity analysis of the immune analyse can be significantly increased using highly specific affinity monoclonal antibodies.

Key words: biosensor, microorganisms, bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, express-diagnostic, transducer, antibodies, antigen.

Надійшла 24.05.2016 р.