

**ІМУННІ БІОСЕНСОРИ НА ОСНОВІ ППР ТА ЕПВВ ДЛЯ
ДІАГНОСТИКИ ТА КОНТРОЛЮ *SALMONELLA TYPHIMURIUM***

Ю. О. Огороднійчук, аспірант^{*}

М.Ф. Стародуб, доктор біологічних наук

*Представлено високоспецифічні біосенсори для визначення *Salmonella typhimurium*, розроблені на основі явищ поверхневого плазмонного резонансу (ППР) та еліпсометрії повного внутрішнього відбиття (ЕПВВ). Для підвищення чутливості біосенсорів у всіх випадках проводили попередню модифікацію поверхні трансдюсерів. У разі ППР-біосенсорів рівень визначення становив 103 – 107 клітин/мл (за використання приладу типу «Спрета») та 101 – 106 клітин/мл (для приладу Плазматест»). Максимального рівня чутливості – менше 5 клітин на 10 мл – було досягнуто у випадку використання біосенсора на основі ЕПВВ.*

Ключові слова: біосенсор, поверхневий плазмонний резонанс, еліпсометрія повного внутрішнього відбиття, антиген, антитіло, *Salmonella typhimurium*.

Більшість представників роду *Salmonella* є патогенними для тварин і людини, але у епідеміологічному відношенні лише деякі з них займають вагоме місце і спричиняють у 85-91% випадків сальмонельозу, серед яких збудником є *S. typhimurium*. Причиною заражень і виникнення токсикоінфекцій найчастіше є харчові продукти (м'ясо, яйця та ін.), заражені живими мікроорганізмами [1], які небезпечні для здоров'я людини, і завдають значної шкоди харчовій промисловості та сільському господарству.

^{*} Науковий керівник – професор М. Ф. Стародуб

Методи визначення мікробіологічного забруднення, що відомі на сьогодні, є досить різноманітними і забезпечують високу якість діагностики, завдяки їх специфічності та чутливості. Але разом із тим, більшість із них є непридатними або досить дорогими для проведення постійного моніторингу об'єктів довкілля. Так технологія виділення чистих культур для визначення *Salmonella spp.* потребує 3 – 4 дні для надання попередніх результатів, а також необхідно витратити ще додатково 1–2 дні для їх подальшого біохімічного підтвердження [3]. Альтернативою традиційним є більш сучасні лабораторні методи визначення мікроорганізмів: твердофазний імуоферментний аналіз (ТІФА) та різні види полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Але ці методи також мають ряд недоліків. Для ТІФА це, перш за все, недостатній рівень чутливості $>10^5$ КУО/мл, кросреактивність, зміна антигенів у зв'язку з ацилюванням і зміна розпізнавальної здатності антитіл. Використання ПЛР для визначення патогенів у зразках продуктів харчування дуже часто обмежується такими чинниками, як присутність речовин, що інгібують реакцію, низька якість цільової ДНК, або недостатнє збагачення необхідної ДНК. Більше того, цей метод вимагає використання очищених зразків і значних затрат часу на проведення (від 5 до 24 годин, без урахування будь-яких етапів попереднього збагачення зразка) [4, 5].

У зв'язку з цим розробка нових недорогих і швидких методів визначення патогенних мікроорганізмів у навколишньому середовищі є дуже актуальним питанням. Водночас, ці методи мають бути високочутливими і специфічними, оскільки висуваються жорсткі вимоги до мікробіологічних показників. У питній воді вміст *E.coli* має становити на рівні КУО в 100 мл за відсутності патогенних ентеробактерій в 1 л води [2]. Інші автори вказують інфекційну дозу для *E. coli* O157:H7 або *Salmonella* – 10 клітин і вміст *E. coli* у воді – 4 клітин у 100 мл [6].

Мета досліджень – розробити імунні біосенсорив на основі оптичних явищ ППР та ЕПВВ, відпрацювати методики визначення *S. typhimurium* у

модельних розчинах, аналіз чутливості реєстрації цього типу мікроорганізму залежно від попередньої підготовки поверхні трансдюсера.

Матеріали та методика досліджень. У біосенсорах на основі ППР використовують оптичний метод вимірювання показника заломлення поблизу поверхні сенсора, яка представлена тонкою (~50 нм) металевою плівкою (найчастіше золотою або срібною) [6,7]. Зміна резонансного кута під час адсорбції речовин на поверхні трансдюсера дає змогу фіксувати протікання реакції антиген-антитіло та відслідковувати динаміку процесів у реальному часі без проведення попереднього мічення реагентів.

Спочатку для аналізу використовували біосенсор на основі модуля Spreeta [8]. Принцип роботи біосенсора «Plasmonotest», розробленого Інститутом кібернетики ім. В.М. Глушкова НАН України (пат. UA 100934), є дуже близьким до першого. «Plasmonotest» є оптичним пристроєм на основі призмової схеми, оснащеним CCD матрицею на 2048 пікселів, який з'єднується безпосередньо з комп'ютером, реєструє і обробляє отриманий оптичний сигнал. Особливістю цього приладу є те, що чутливий шар формується не на поверхні призми, як у випадку модуля Spreeta, а на скляній пластинці, поверхня якої покрита 1-2 нм адгезійним шаром ніобію та 50 нм плівкою золота, що забезпечує виникнення поверхневого плазмонного резонансу. Пластинка поєднується з призмою за допомогою імерсійної рідини. Такий підхід досконаліший та зручніший для практичного використання, оскільки дає можливість заздалегідь забезпечити попередню підготовку чутливої поверхні. Також пластинки можна легко змінювати, або регенерувати відповідно до вимог користувача.

Еліпсометрія – це оптичний метод дослідження поверхонь та середовищ, в основі якого лежить аналіз амплітудних і фазових змін світлової хвилі під час її взаємодії з досліджуваним об'єктом. У випадку ЕПВВ в основі біосенсора використовували комерційний спектроскопічний аналізатор, що обертається і працює в межах довжини хвилі 350-1000 нм. Імобілізацію чутливого шару здійснювали на скляну пластинку, вкриту

адгезійним шаром хрому та шаром золота, яка далі кріпилася на трапецієподібну призму 68 (BK7, $n = 1.515$). Така призма забезпечує ефект повного внутрішнього відбиття між склом та водним розчином ($n = 1.33$). Для аналізу зразків на призму кріпили спеціально розроблену комірку, об'ємом $1,5 \text{ см}^3$.

Оскільки попередньо було підтверджено ефективність використання ППР та ЕПВВ для розпізнавання специфічних взаємодій між антигеном і антитілом [9,10], які були використані як селективний елемент. Як зазначається у багатьох роботах, іммобілізація антитіл на чисту поверхню золота є досить неефективною для розпізнавання антигенів, оскільки вони хаотично зв'язуються з поверхнею, в результаті чого можуть блокуватися специфічні сайти зв'язування. Щоб уникнути цього, проводять попередню підготовку поверхні трансдюсера нанесенням різних речовин, які забезпечують сайт-орієнтоване зв'язування антитіл. У деяких випадках за вказаного підходу активність антитіл зростає до $>70\%$ [11].

У випадку ППР-сенсорів підготовку робочої поверхні здійснювали так: поверхню вкривали поліелектролітичною нерозчинною плівкою з використанням поліаліламіну гідрохлориду (ПАА), в концентрації 1 мг/мл ; потім наносили розчин білка А від *Staphylococcus aureus*, розчин якого було приготовано в трис HCl буфері (pH 7,4) концентрацією 1 мг/мл . Після нанесення білка А адсорбували поліклональні антитіла (Ab), специфічні до *S. typhimurium*. Антитіла, використані в досліді, були надані Державним науково-дослідним контрольним інститутом ветеринарних препаратів та кормових добавок (Львів, Україна). Розчин антитіл готували в трис HCl буфері (pH 7,4). Потім наносили бичачий сироватковий альбумін (БСА) для блокування можливих вільних ділянок на золотій поверхні. Розчин БСА (Sigma, США) готували, використовуючи трис HCl буфер (pH 7,4) концентрацією 1 мг/мл . Нанесення БСА суттєво не змінило величину резонансного кута, що свідчить про те, що на поверхні практично не залишалось вільних місць зв'язування, а концентрація антитіл була

достатньою для створення максимально щільного шару. Наступним етапом експерименту було нанесення розчинів *S typhimurium* з різною концентрацією антигену (Ag). Розчин *S. typhimurium* був наданий Державним науково-дослідним контрольним інститутом ветеринарних препаратів та кормових добавок (Львів, Україна). З вихідного розчину приготували шість робочих розчинів різної концентрації, а саме від 10^1 – до 10^6 кліт./мл. Розведення вихідного розчину здійснювали 0,05 М розчином трис НСІ буфера (рН 7,4) у випадку Spreeta, та 0,9%-ним фізіологічним розчином (ФР) у всіх інших. 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 ФР.

У випадку використання біосенсора на основі ЕПВВ підготовку трансдюсера здійснювати за тією ж самою методикою, що і для ППР-біосенсорів. Модельні розчини Ag готували так, щоб концентрація клітин становила від 1 кліт./10 мл ФР і поступово збільшувалася до 10^5 кліт./мл. Час інкубації модельних розчинів з поверхнею трансдюсера становив 15 хв.

Результати досліджень та їх обговорення. За визначення *S. typhimurium* у модельних розчинах з використанням модуля Spreeta рівень визначення становив 10^3 – 10^7 кліт./мл. Чутливість імунобіосенсора «Plasmonotest» була в межах 10^1 – 10^6 кліт./мл. Доведено, що на рівень чутливості приладів значною мірою впливає попередня підготовка робочої поверхні, метою якої є створення орієнтованого шару антитіл. У результаті фізичної адсорбції антитіл безпосередньо на золотій поверхні трансдюсера біосенсора «Plasmonotest» чутливість приладу становила 10^4 – 10^6 кліт./мл. Для порівняння, одночасно проводили визначення *S. typhimurium* методом ТІФА. При цьому Ag вдалося визначити на рівні 10^4 кліт./мл за загальної тривалості аналізу близько 6 годин. Вищу чутливість отримали за використання біосенсора на базі ЕПВВ. У цьому випадку максимальний рівень чутливості сягав декількох клітин (менше 5) в 10 мл.

Отримані результати корелювали з описаними в літературі даними з визначення *S. typhimurium* у модельних розчинах. Oh та ін. [7] описали імуносенсор на основі ППР для визначення *S. typhimurium*, використовуючи білок G і отримали чутливість приладу в межах $10^2 - 10^9$ кліт/мл. Bokken та ін. [12] проводили визначення представників роду *Salmonella* за допомогою приладу «Bioscore». Мінімальна кількість клітин для отримання чіткого сигналу відповідала $1,7 \times 10^3$ кліт/мл.

Висновки

1. З'ясовано залежність чутливості біосенсорів від попередньої підготовки робочої поверхні трансдюсера. Запропонована методика підготовки поверхні дозволила значно підвищити чутливість приладів, порівняно з прямою адсорбцією реагентів на поверхню трансдюсера.

2. Прилад «Plasmonotest» характеризується на порядок вищою чутливістю, порівняно з іншими біосенсорами на основі ППР, і може використовуватися для первинного поверхневого аналізу мікробіологічного забруднення.

3. Підвищення чутливості ППР-імунобіосенсорів для максимально ефективного практичного використання може забезпечити використання моноклональних антитіл для проведення аналізу, а також попереднє концентрування антигена в досліджуваних зразках шляхом використання афінних колонок або магнітних частинок.

4. Чутливість імуносенсора на основі ЕПВВ найближчається до вимог практики і може забезпечити визначення мікроорганізмів на достатньому рівні без проведення будь-яких етапів попередньої підготовки зразка.

Список літератури

1. Зарицкий А. Сальмонеллезы / А. М. Зарицкий – К.: Здоровья, 1988. – 160 с.
2. Наказ МОЗ України №400 від 12.05.2010 Про затвердження Державних санітарних норм та правил «Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної

для споживання людиною» [Електронний ресурс]: / Верховна Рада України 1994-2015. – Режим доступу: <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/z0452-10/page>.

3. Pividori M. PCR-Genosensor Rapid Test for Detecting Salmonella / M. Pividori, A. Merkoçi, J. Barbé, S. Alegret // *Electroanalysis*. – 2003. – Vol. 15, Issue 23-24. – P. 1815–1823.
4. Cox N. Salmonella methodology update / N. Cox // *Poultry Science* – 1988. – 67. – P.921-927.
5. Salmonella – A Dangerous Foodborne Pathogen / edited by Barakat S. M. Mahmoud. – InTech, 2012. – 450 p.
6. Ivnitski D. Biosensors for detection of pathogenic bacteria / D. Ivnitski, I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, E. Wilkins // *J. Biosensors & Bioelectronics*. – 1999. – Vol. 14. – P. 599–624.
7. Oh B. Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of Salmonella typhimurium / B. Oh, Y.Kim, K. Won Park, W. Hong Lee, J. Choi // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2004. – Vol.19. – P. 1497–1504.
8. Starodub N. Optical immune biosensor based on SPR for the detection of Salmonella typhimurium / N. Starodub, Ju. Ogorodnijchuk, V. Romanov // *The Sensor+Test 2011 Conference*. – Nurenberg – 2011: AMA Service GmbH – P. 139–144.
9. Pirogova L. Express diagnostic of cattle leucosis using immune sensor based on surface plasmon resonance / L. Pirogova, L. Nagaeva, M. Starodub // *Ukr. Biochem Journal*. – 2002. – Vol. 74 (3). – P. 88–92.
10. Baleviciute I. Study of antibody/antigen binding kinetics by total internal reflection ellipsometry / I. Baleviciute, Z. Balevicius, A. Makaraviciute, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius // *Biosens Bioelectron*. – 2013. – Jan 15;39(1):170-6.
11. Albers W. Surface Plasmon Resonance on Nanoscale Organic Films / W. Albers, I. Vikholm-Lundin // *Nano-Bio-Sensing*, Ed. by S. Carraro. – P. 83–125.

12. Bokken G. Immunochemical detection of Salmonella group B, D and E using an optical surface plasmon resonance biosensor / G. Bokken, R. Corbee, F. van Knapen, A. Bergwerff // FEMS Microbiol. Lett. – 2003. – 222. – P. 75.

ИМУННЫЕ БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ППР И ЭПВО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И КОНТРОЛЯ SALMONELLA TYPHIMURIUM

Ю. А. Огороднийчук, Н. Ф. Стародуб

Представлены высокоспецифические биосенсоры для определения Salmonella typhimurium, разработанные на основе явлений поверхностного плазмонного резонанса (ППР) и эллипсометрии полного внутреннего отражения (ЭПВО). Для повышения чувствительности биосенсоров во всех случаях проводили предварительную модификацию поверхности трансдюсеров. В случае ППР-биосенсоров уровень определения составлял $10^3 - 10^7$ клеток/мл (для модели типа «Спрета») и $10^1 - 10^6$ клеток/мл (для прибора типа «Плазматест»). Максимальный уровень чувствительности – меньше 5 клеток на 10 мл – был получен в случае использования биосенсора на основе ЭПВО.

Ключевые слова: биосенсор, поверхностный плазмонный резонанс, эллипсометрия полного внутреннего отражения, антиген, антитело, Salmonella typhimurium.

IMMUNE BIOSENSORS BASED ON SPR AND TIRE FOR DIAGNOSTICS AND CONTROL OF SALMONELLA TYPHIMURIUM

Ju. Ogorodniichuk, N. Starodub

In this work, high-specific biosensors for Salmonella typhimurium detection have been designed based on the surface plasmon resonance (SPR) and total internal reflection ellipsometry (TIRE). For improving biosensors' sensitivity previous modification of transducer surfaces has been applied in all cases. It has

been defined that in case with SPR based biosensors sensitivity was on the level $10^3 - 10^7$ cells/ml (for the device of type "Spreeta") and $10^1 - 10^6$ cells/ml (for the "Plasmatest"). Maximal sensitivity was on the level of several cells (less than 5) in 10 ml which has been obtained using the biosensor based on TIRE.

Keywords: *biosensor, surface plasmon resonance, total internal reflection ellipsometry, antigen, antibody, Salmonella typhimurium.*