

## РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СОЗДАНИЯ ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ИММУНОСЕНСОРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Кальной С.М.<sup>1</sup>, Куличенко А.Н.<sup>1</sup>, Дикова С.П.<sup>1</sup>, Жарникова И.В.<sup>1</sup>, Ляпустина Л.В.<sup>1</sup>, Ковалев Д.А.<sup>1</sup>, Жарникова Т.В.<sup>1</sup>, Шестопалов К.В.<sup>2</sup>, Мельченко Е.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 355035, г. Ставрополь, e-mail: [snipchi@mail.stv.ru](mailto:snipchi@mail.stv.ru)

<sup>2</sup> Научно-производственная фирма ЗАО «ЭТНА», 105005, г. Москва

<sup>3</sup> Северо-Кавказский федеральный университет, кафедра медицинской биохимии клинической лабораторной диагностики и фармации

---

Технологии иммунохимического анализа для определения антигенов и антител являются важным направлением диагностики инфекционного процесса и специфической индикации патогенных агентов в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и т.д. Наиболее часто для этих целей используются иммунофлуоресцентный и иммуноферментный методы. В настоящее время для решения актуальной проблемы специфической индикации микроорганизмов находят применение аналитические устройства, позволяющие получать информацию о взаимодействиях антител и антигенов в форме электрических сигналов, с использованием различного рода биологических сенсоров. Разработана технология создания пьезоэлектрических иммуносенсоров (ПИ) для детекции возбудителей особо опасных инфекций (*Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*). Чувствительность анализа с применением ПИ при детекции чумного и туляремиального микробов, соответственно, составила  $1 \times 10^3$ – $1 \times 10^4$  м.к./мл, при отсутствии перекрестных реакций с гетерологичными штаммами, время анализа 15–20 мин.

---

Ключевые слова: пьезоэлектрический иммуносенсор, детекция микроорганизмов, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*.

## THE TECHNOLOGY DEVELOPMENT FOR CREATION OF PIEZOELECTRIC IMMUNOSENSOR FOR DANGEROUS INFECTIOUS DISEASES AGENTS DETECTION

Kalnoy S.M.<sup>1</sup>, Kulichenko A.N.<sup>1</sup>, Dikova S.P.<sup>1</sup>, Zharnikova I.V.<sup>1</sup>, Lapustina L.V.<sup>1</sup>, Kovalev D.A.<sup>1</sup>, Zharnikova T.V.<sup>1</sup>, Shestopalov K.V.<sup>2</sup>, Melchenko Y.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> The Federal Government Health Institution “Stavropol Plague Research Institute” of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, 355035, Stavropol, e-mail: [snipchi@mail.stv.ru](mailto:snipchi@mail.stv.ru)

<sup>2</sup> The Science-practical Enterprise ЗАО «ЭТНА», 105005, Moscow

<sup>3</sup> Severo-Kavkazsky Federal University, Medical Biochemistry of Clinical Laboratory Diagnostics and Pharmacy

---

Technologies of the immunochemical analysis for definition of anti-genes and antibodies are the important direction of diagnostics of infectious process and specific indication of pathogenic agents in objects of environment, foodstuff, etc. Most often for these purposes immunofluorescent and immunofermental methods are used. Now for the solution of an actual problem of specific indication of microorganisms the analytical devices, allowing to receive information on interactions of antibodies and anti-genes in the form of electric signals, with different use of biological sensors find application. The technology of creation piezoelectric immunosensor (PI) for the detection of dangerous infectious diseases agents (*Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*) have been developed. The sensitivity of PI test for detection of plague and tularemia microorganisms was showed as  $1 \times 10^3$ – $1 \times 10^4$  cell/ml, respectively, with no criss-crossed reaction with the cells of heterologic strains, the time duration of the test 15–20 minute.

---

Key words: piezoelectric immunosensor, detection of microorganisms, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*.

### Введение

Технологии иммунохимического анализа для определения антигенов и антител являются важным направлением диагностики инфекционного процесса и специфической

индикации патогенных агентов в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и т.д. Наиболее часто для этих целей используются иммунофлуоресцентный и иммуноферментный методы.

В настоящее время для решения актуальной проблемы специфической индикации микроорганизмов находят применение аналитические устройства, позволяющие получать информацию о взаимодействиях антител и антигенов в форме электрических сигналов, с использованием различного рода биологических сенсоров [1; 5].

Одним из вариантов последних являются пьезоэлектрические (пьезокварцевые) иммуносенсоры (ПИ), создаваемые на основе кварцевых резонаторов (КР), которые применяют для детекции бактерий, идентификации биологических наночастиц [7; 9; 11; 12]. ПИ позволяют осуществлять прямую регистрацию биохимических взаимодействий рецепторных молекул без дополнительного введения меток (флуоресцентных, ферментных и др.), что выгодно отличает их от аналогичных устройств. Они характеризуются малой инерционностью, легкостью в эксплуатации, возможностью включения в мультисенсорные системы, а также в автоматические системы сбора информации [6].

Отличительной особенностью ПИ является сочетание высокой чувствительности, обеспечиваемой использованием в качестве физического преобразователя кварцевого резонатора, и селективности, определяемой специфичностью применяемых рецепторных молекул [3]. Принцип функционирования ПИ основан на регистрации изменений электрического сигнала под действием массы иммунокомплекса на кварцевую пластину резонатора. Наличие на КР специфического биослоя позволяет с высокой степенью селективности определять гомологичные антигены в сложной по составу смеси, не прибегая к дополнительным операциям, связанным с использованием других реагентов [2; 4].

**Цель исследования** – разработка технологии создания пьезоэлектрических иммуносенсоров для детекции возбудителей особо опасных инфекций (чума, туляремия) с учетом требований к чувствительности, специфичности и сохранению стабильности.

#### **Материал и методы исследования**

В качестве лигандов использовали специфические иммуноглобулины (IgG) с активностью в реакции иммунодиффузии 1:16, фракционированные из гипериммунных сывороток к бактериальным патогенам (*Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*) каприловой кислотой [13]. Количественное определение белка проводили на спектрофотометре СФ-46 («ЛОМО», г. Санкт-Петербург) при длине волны 280 нм.

Тестировали пятикратные разведения обеззараженных культур вакцинных штаммов *Y. pestis* EV, *F. tularensis* ЖТВ и гетерологичных штаммов бактерий (ПИ для детекции возбудителя чумы – *Y. pseudotuberculosis* I–II серовар, *Escherichia coli* 0–10, *F. tularensis*

Miura, *Brucella abortus* 19-BA; ПИ для детекции возбудителя туляремии – *B. abortus* 19-BA, *B. melitensis* 16 M, *B. suis* 1330) в концентрации  $1,0 \times 10^9 - 1 \times 10^3$  м.к./мл (по ОСО-42–28–85 П<sup>1</sup>). Штаммы получены из коллекции ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора».

Для активирования поверхности КР применяли бензальдегид (БА) –  $C_6H_5CHO$  (молекулярная масса 106,1; плотность  $1,05 \text{ г/см}^3$ ) и низкомолекулярный полиэтиленимин (ПЭ) –  $[-CH_2CH_2NR-N]$  (молекулярная масса меньше 10 000; плотность  $1,05 \text{ г/см}^3$ ), способные полимеризоваться и образовывать тонкие пленки, содержащие реакционно-функциональные группы. Активацию пластин КР проводили растворами БА и ПЭ в формамиде фирмы «Applied Biosystems» (США) или в парах плазмы БА и ПЭ. Контроль плазменной полимеризации реагентов осуществляли с помощью лазерного денситометра «Ultrascan 2202» (LKB, Швеция) и зондовой микроскопии («Зондовая нанолaborатория NTEGRA Prima», NT-MDT, Россия). В качестве датчиков при создании ПИ использовали коммерческие кварцевые резонаторы РК-12 (9,5 МГц) с диаметром пластины 8,0 мм и никелевыми электродами (ЗАО «ЭТНА», Москва). Для работы с пластинами КР и ПИ применяли установку для измерения параметров и настройки пьезоэлектрических резонаторов «CPNA-330» (ЗАО «ЭТНА», г. Москва). Результаты оценивали по сдвигу частот в Гц (разности частотных характеристик) ПИ до и после его взаимодействия с разведениями обеззараженных культур вакцинных штаммов *Y. pestis* EV, *F. tularensis* ЖТВ и гетерологичных штаммов бактерий. Положительным считали сдвиг частот в сторону уменьшения на 200 Гц и более. В качестве отрицательного контроля использовали ПИ, инкубированные в разводящей жидкости без антигена.

Схема исследований пробы на наличие патогенов с использованием созданных ПИ включала следующие основные этапы: 1) подготовка пробы для анализа (титрация); 2) измерение исходных параметров ПИ на установке «CPNA-330»; 3) инкубация ПИ с исследуемой пробой патогена; 4) отмывка, высушивание; 5) регистрация параметров ПИ.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Известны различные методы иммобилизации белковых молекул: физическая сорбция, специфическая сорбция и хемосорбция. Были апробированы следующие варианты конструирования ПИ: а) на неактивированных пластинах КР (метод физической сорбции); б)

---

<sup>1</sup> Отраслевой стандартный образец мутности (ОСО-42–28–85 П) производства ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Мутность стандарта, равная 10 единицам, эквивалентна концентрации клеток в 1 мл:  $0,93 \times 10^9$  м.к./мл микробов кишечной группы;  $1,7 \times 10^9$  м.к./мл для *Brucella spp.*;  $5,0 \times 10^9$  м.к./мл для *Francisella spp.*

на пластинах КР, активированных растворами БА и ПЭ; в) на пластинах КР активированных в парах плазмы БА и ПЭ.

При конструировании ПИ путем физической сорбции иммуноглобулинов измеряли параметры исходных КР, затем инкубировали с IgG чумными, туляремиными. Несвязавшиеся антитела удаляли с КР путем промывания дистиллированной водой (ДВ). Для фиксации IgG на поверхности пластины варьировали их концентрацию и длительность экспозиции. При этом способе адгезия IgG к поверхности пластины КР достигалась за счет электростатических взаимодействий и образования водородных или координационных связей между атомами металла электрода и, например, атомами серы, входящими в состав белков [10].

Иммобилизованный КР обрабатывали суспензией детектируемых клеток возбудителей чумы или туляремии, которые специфически связывались с иммобилизованными на поверхности пластины КР молекулами IgG с образованием иммунокомплекса. Не связавшиеся компоненты удаляли с пластин ПИ путем промывания ДВ, затем сушили в потоке воздуха. После обработки бактериальными суспензиями пластины отмывали, сушили и измеряли параметры ПИ на установке «CPNA-330». Увеличение массы пластины за счет связавшихся IgG с КР приводило к снижению резонансной частоты ПИ. Обработка пластин КР в растворах с более высокими концентрациями IgG приводила к нарушению функции резонатора, а с низкой концентрацией IgG – к снижению эффективности биоспецифического взаимодействия в реакции антитело (Ат) и антиген (Аг).

Метод физической сорбции КР обеспечивал сохранение стабильности ПИ (специфической активности) в течение не более 10 сут. Чувствительность ПИ составила  $1 \times 10^4$  м.к./мл, при отсутствии перекрестных реакций с гетерологичными штаммами.

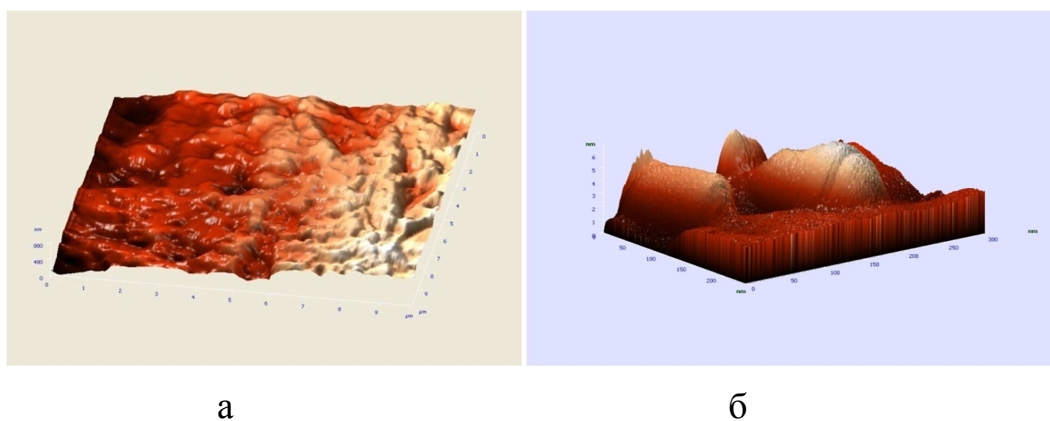
Другой использованный нами вариант активирования поверхности КР – обработка в растворах БА или ПЭ. Варьировали концентрацию этих реагентов и продолжительность экспозиции. Пластины КР в течение 5 мин инкубировали в растворах БА или ПЭ, затем сушили в потоке воздуха и иммобилизовывали IgG. Активированные и подготовленные ПИ обрабатывали суспензией с различной концентрацией микробных клеток возбудителей чумы или туляремии, время экспозиции 10 мин, после чего промывали в течение 2 мин ДВ, сушили и измеряли параметры ПИ.

В результате экспериментов установлено, что более высокие концентрации БА и ПЭ приводили к нарушению функции резонатора. Низкие концентрации не обеспечивали эффективной иммобилизации IgG. Чувствительность ПИ для детекции возбудителя чумы, активированных растворами БА, ПЭ составила  $1 \times 10^3$  м.к./мл (12%) и  $1 \times 10^4$  м.к./мл (88%).

Чувствительность ПИ для детекции возбудителя туляремии  $1 \times 10^3$  м.к./мл (8%) и  $1 \times 10^4$  м.к./мл (92%). При контроле специфичности отсутствовали перекрестные реакции с гетерологичными штаммами. Сохранение специфической активности ПИ, полученных активированием в растворах БА, ПЭ, отмечена в течение 40 сут (срок наблюдения).

Для повышения стабильности ПИ и эффективности активации поверхности пластин КР применена технология ковалентной иммобилизации. Использовали метод «тлеющего разряда» – низкотемпературное плазменное напыление парами БА и ПЭ в условиях вакуума под действием УВЧ-поля. Варьировали длительность обработки пластин КР. В результате такого воздействия образовывалось наноструктурное равномерное покрытие с доступными реакционно-функциональными группами для иммобилизации IgG.

На рисунке 1 показаны 3D-модели фрагментов поверхности пластины КР без полимеризации (а) и с областью полимеризации (б) после вакуумного напыления ПЭ.



**Рис. 1. 3D-модели фрагментов поверхности пластины КР:**

а) без полимеризации; б) с областью полимеризации после вакуумного напыления ПЭ.

При лазерной денситометрии отмечено увеличение оптической плотности поверхностей после обработки в плазме БА и ПЭ.

Полученные результаты согласовывались с данными авторов, доказавших прочность связывания биомолекул при применении ПЭ, образующего пленку, предохраняющую конформацию белковых глобул [8; 14]. Чувствительность чумных ПИ, активированных напылением как БА, так и ПЭ, составила  $1 \times 10^3$  м.к./мл (22%) и  $1 \times 10^4$  м.к./мл (78%), туляремийных ПИ –  $1 \times 10^3$  м.к./мл (12%) и  $1 \times 10^4$  м.к./мл (88%). Сохранение специфической активности ПИ, полученных при напылении БА, ПЭ, отмечена в течение 60 сут (срок наблюдения).

Для сравнения использовали ИФА с теми же лигандами, которые применяли при получении ПИ. При этом по чувствительности метод с применением ПИ в 10–100 раз

превышал традиционный ИФА, время постановки анализов с применением ПИ – 15–20 мин, что в 7,5 раз меньше продолжительности анализа в ИФА.

### **Заключение**

Полученные результаты, позволяют сделать заключение, что разработанная технология создания пьезоэлектрических иммуносенсоров для детекции возбудителей особо опасных инфекций (чума, туляремия) обеспечивает выполнение анализа, отвечающего требованиям по показателям чувствительности, специфичности, времени анализа.

### **Список литературы**

1. Варфоломеев С.Д. Биосенсоры // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 1. – С. 47-50.
2. Егоров А.А. Систематика, принципы работы и области применения датчиков // Журнал радиоэлектроники. – 2009. – № 3. – С. 24-29.
3. Ермолаева Т.Н., Калмыкова Е.Н., Шашканова О.Ю. Пьезокварцевые биосенсоры для анализа объектов окружающей среды, пищевых продуктов и для клинической диагностики // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). – 2008. – Т. III. – № 2. – С. 17-29.
4. Мурашов Д.А., Мадюскина Л.Л., Розанов И.А. и др. Группы факторов для оценки применимости покрытий пьезохимических сенсоров // Координационная химия. – 1997. – Т. 23. – № 6. – С. 472-476.
5. Калмыкова Е.Н. Пьезокварцевые иммуносенсоры для определения биологически активных веществ и клинической диагностики : дис. ... д-ра. х. н. – Воронеж, 2007. – 41 с.
6. Филаретов Г.Ф. Проблемы построения и использования мультисенсорных систем // Функциональные материалы и структуры для сенсорных устройств : тезисы докл. Всерос. конф. – Новосибирск, 1999. – С. 12-13.
7. Byoung C.K., Young H.K. Monitoring Phase Transition in Polymer Using a Quartz Crystal Resonator / C.K. Byoung, H.K. Young // Proceedings of the 17th World Congress The International Federation of Automatic Control. Seoul, Korea, July 6-11, 2008. – P. 2248-2251.
8. Carter R.M. Quartz crystal microbalance detection of *Vibrio cholerae* O139 serotype. Text. / R.M. Carter, J.J. Mekalanos, M.B. Jacobs, G.J. Lubrano, G.G. Guilbault // J. Immunol. Meth. – 1995. – Vol. 187. – Is. 1. – P. 121-125.
9. Dultsev F.N. Identifying a single biological nano-sized particle using quartz crystal microbalance. A mathematical model / F.N. Dultsev, E.A. Kolosovsky // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2009. – Vol. 143. – № 1. – P. 17-24.
10. Horisberger M. Labeling of colloidal gold with protein / M. Horisberger, M. Vauthey // Histochem. Cell Biol. – 1984. – Vol. 80. – № 1. – P. 13-18.

11. Kon K. Detection of complementary couple of single-stranded DNAs by use of a quartz crystal device for determination of bacteria / K. Kon, T. Kuwahara, V. Shimomura // *Bioscience and Bioengineering*. – 2011. – Vol. 111. – № 2. – P. 242-245.
12. Santos F.C. Quartz crystal microbalance as a tool for kinetic enzymatic assays by variation of pH / F.C. Santos, L.M. Goncalves, C.S. Riccardi, A.A. Barros, P.R. Bueno // *Analytical Biochemistry*. – 2011. – Vol. 418. – № 1. – P. 152-154.
13. Steibuch G. The isolation of IgG from imanalion serra with the acid of caprilic / G. Steibuch, R. Andran Arch. Biochem. Stray Biophys. – 1969. – Vol. 139. – P. 279-284.
14. Tang A.H.J. Immunosensor for okadaic acid using quartz crystal microbalance / A.H.J. Tang, M. Pravda, G.G. Guilbault, S. Piletsky, A.P.F. Turner // *Anal. Chim. Acta*. – 2002. – Vol. 471. – Is. 1. – P. 33-40.

**Рецензенты:**

Таран Татьяна Викторовна, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, заведующая лабораторией питательных сред для культивирования микроорганизмов I–IV групп патогенности ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора», г. Ставрополь.

Будыка Дмитрий Александрович, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, заведующий научно-производственной лабораторией чумных вакцин ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора», г. Ставрополь.