

ІМУННІ БІОСЕНСОРИ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ТА КОНТРОЛЮ *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Ю. О. Огороднійчук, аспірант*
М. Ф. Стародуб, доктор біологічних наук

Запропоновано декілька типів біосенсорів на основі оптичних (ППР, ЕПВВ) і потенціометричних (ІсПТ) трансдюсерів, та біосенсор на основі наностержнів ZnO для визначення *S. typhimurium*. Проаналізовано вплив попередньої підготовки трансдюсерів на чутливість аналізу. Встановлено, що усі запропоновані біосенсиори ефективні під час визначення *S. typhimurium* в модельних розчинах і можуть використовуватися в практиці на різних рівнях діагностики. Найвищу чутливість отримали за використання біосенсору на основі ЕПВВ, що становила декілька клітин (менше 5) в 10 мл.

Імунний біосенсор, реакція антиген-антитіло, наностержні ZnO, *Salmonella typhimurium*.

Представники роду *Salmonella* найчастіше призводять до спалахів харчових отруєнь у всьому світі. У епідеміологічному відношенні лише деякі бактерії роду *Salmonella* займають вагоме місце і спричиняють 85-91% випадків сальмонельозів, серед яких і *S. typhimurium* [1]. Причиною виникнення токсикоінфекцій у людини найчастіше є харчові продукти, такі як м'ясо, яйця, риба, кисломолочні продукти, свіжі овочі та фрукти, заражені живими мікроорганізмами [5]. Вимоги до інфекційних доз для *Salmonella* наводяться дещо різні, що, швидше за все залежить від відмінності державних стандартів країн світу. Деякі автори вказують інфекційну дозу для *Salmonella* на рівні 10 клітин і вміст її у воді – 4 клітини у 100 мл [7]. Згідно з наказом МОЗ України № 400 від 12.05.2010 про затвердження Державних санітарних норм та правил "Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною" вимоги до мікробіологічних показників питної води передбачають відсутність патогенних ентеробактерій в 1 л води [2].

Для захисту населення від патогенних мікроорганізмів потрібно проводити постійний моніторинг об'єктів навколишнього середовища. На жаль, традиційні методи визначення *S. typhimurium* не можуть повною мірою задовольнити потреби практики, оскільки являють собою послідовний, складний процес, який включає попереднє збагачення, селективне збагачення, біохімічне тестування та серологічне підтвердження. Технологія введення в культуру для визначення *Salmonella* spp. потребує 3–4 дні для

*Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор М. Ф. Стародуб
© Ю. О. Огороднійчук, М. Ф. Стародуб, 2015

надання попередніх результатів, та додаткових 1 – 2 дні для подальшого біохімічного підтвердження [9].

Альтернативними методами, що часто застосовуються для визначення *Salmonella* є твердофазний імуноферментний аналіз (ТІФА) та різні види полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Але ці методи також мають ряд недоліків, таких як низька чутливість, кросреактивність, втрата розпізнавальної здатності антитіл, потреба в спеціальному обладнанні, та довготривалість проведення аналізу [3]. У зв'язку з цим розробка недорогих та швидких методів визначення патогенних мікроорганізмів у навколишньому середовищі є дуже актуальним питанням.

Мета досліджень – розробка швидких та високочутливих методів експресної діагностики *S. typhimurium*.

Матеріали та методика досліджень. В роботі використовували різні види сенсорних систем, а саме: оптичні, потенціометричні та наностержні ZnO. Як селективний біологічний елемент використовували поліклональні антитіла (Ab), специфічні до *S. typhimurium* (Ag) і в основі роботи біосенсорів використовували реакцію антиген-антитіло. Для підвищення чутливості приладів здійснювали попередню підготовку трансдюсерів. Визначення *S. typhimurium* проводили у модельних розчинах, що є суспензією автоклавованих клітин *S. typhimurium* у фізіологічному розчині, з початковою концентрацією 10^9 клітин/мл, з якого готували необхідні для роботи розведення.

Оптичні біосенсиори. В роботі використовували сенсори на основі явища поверхневого плазмонного резонансу (ППР), а саме модуль Spreeta (США), сенсор «Плазмонотест» (розробка Інституту кібернетики ім. В.М. Глушкова НАН України, патент UA 100934) та сенсор на основі явища еліпсометрії повного внутрішнього відбиття (ЕПВВ). В усіх випадках визначення *S. typhimurium* за допомогою оптичних імунобіосенсорів використовували прямий метод аналізу. Оскільки під час проведення досліджень біомолекулярних взаємодій не рекомендують використовувати немодифіковану золоту поверхню, здійснювали попередню модифікацію поверхні трансдюсерів поліаліламінгідрохлоридом (ПАА), та білком А від *Staphylococcus aureus*. Для уникнення явища неспецифічного зв'язування антигену (Ag) з поверхнею трансдюсера, наносили бичачий сироватковий альбумін (БСА) для блокування вільних ділянок на поверхні золота. У випадку використання біосенсора на основі ЕПВВ підготовку трансдюсера здійснювали за тією ж самою методикою, що і для ППР-біосенсорів.

Потенціометричні біосенсиори. Як трансдюсер використовували іонселективні польові транзистори (ІсПТ) з пористою поверхнею CeOx замість Si_3N_4 , оскільки останні виявилися менш чутливими до зміни рН. ІсПТ активували за допомогою водного розчину глутаральдегіду (ГА) з подальшим алгоритмом аналізу як для ППР-біосенсорів. Блокування незв'язаних груп ГА здійснювали нанесенням розчину гліцину. Аналіз здійснювали «сендвіч-методом», для чого зв'язані на поверхні клітини *S. typhimurium* обробляли протягом 10 хв розчином специфічних антитіл, мічених пероксидазою хріну (ПХ).

Біосенсор на основі наностержнів ZnO. В основі принципу визначення *S. typhimurium* використовували явище фотолюмінесценції (ФЛ) наностержнів ZnO за кімнатної температури. Структури наностержнів ZnO отримували методом газодисперсного синтезу [8]. Методику осадження порошкоподібних структур наностержнів ZnO та їх основні характеристики описано в роботі [3]. Для тестування відповіді біосенсора, ФЛ записували для чистого ZnO, для ZnO з іммобілізованими Ab до *S. typhimurium*, для ZnO з Ab та БСА та після додавання Ag у вигляді модельного розчину клітин *S. typhimurium*. Після встановлення ключових параметрів чутливість біосенсора вивчали з використанням широкого ряду концентрацій *S. typhimurium*, а саме $10^1 - 10^6$ кліт./мл. Оскільки БСА використовували як блокуючий агент для запобігання неспецифічного зв'язування Ag на поверхні трансдюсера, інтенсивність фотолюмінесценції після нанесення БСА використовували як початкову точку для обрахунку відповіді біосенсору [3].

Результати досліджень та їх обговорення. За визначення *S. typhimurium* у модельних розчинах з використанням модуля Spreeta рівень чутливості аналізу становив $10^3 - 10^7$ кліт./мл. Чутливість імунобіосенсора «Плазмонотест» була дещо вищою і знаходилася в межах $10^1 - 10^6$ кліт./мл. Вищу чутливість отримали за використання біосенсора на базі ЕПВВ. У цьому випадку максимальний її рівень сягав декількох клітин (менше 5) в 10 мл.

Чутливість біосенсора на основі ІсПТ була в межах від 2 до 5×10^5 клітин/мл. Окрім високої чутливості додатковою перевагою цього методу є можливість повторного використання біочіпу (до 5 разів) без погіршення сигналу, під час обробки його за допомогою 0,1 М HCl протягом 5 хв.

Межа чутливості біосенсора на основі наностержнів ZnO становила 10^2 кліт./мл *S. typhimurium*. За вищих концентрацій Ag ($10^2 - 10^5$ кліт./мл) чутливість змінювалася майже лінійно. Насичення поверхні біосенсора відбувається за концентрацій Ag вище 10^5 кліт./мл.

Доведено, що в усіх випадках на рівень чутливості приладів значною мірою впливає попередня підготовка робочої поверхні, метою якої є створення орієнтованого шару антитіл. Для прикладу, в результаті фізичної адсорбції антитіл безпосередньо на золотій поверхні трансдюсера біосенсора «Плазмонотест» чутливість аналізу становила $10^4 - 10^6$ кліт./мл.

Оскільки тривалість іммобілізації кожного реактиву на поверхню трансдюсера становить в середньому 10 хв, тривалість повного циклу аналізу становить менше 1 год. Цей час можна значно скоротити, якщо використовувати чіпи, з попередньо іммобілізованими ПАА, білком А та специфічними антитілами. Для порівняння, метод твердофазного імуноферментного аналізу (ТІФА) забезпечує визначення *S. typhimurium* на рівні 10^4 кліт./мл [9], 10^6 кліт./мл [6] за загальної тривалості аналізу від 6 год.

Висновки.

1. Усі проаналізовані імунобіосенсиори є ефективними за визначення *S. typhimurium* у модельних розчинах і є альтернативою відомим на сьогодні лабораторним методам діагностики.

2. Найвищу чутливість, що відповідає практичним вимогам, продемонстрував оптичний імунобіосенсор на основі ЕПВВ. Імунобіосенсор на основі ІсПТ хоч і має дещо нижчу чутливість, але відрізняється стабільністю і високою відтворюваністю результатів. У свою чергу, можливість регенерації робочої поверхні значно зменшує вартість аналізу. Інші біосенсиори хоч і продемонстрували нижчу чутливість під час визначення *S. typhimurium*, та все ж вона вища за чутливість методу ТІФА. Крім того, вони здатні забезпечити швидкий аналіз у реальному часі та не потребують спеціального персоналу для проведення аналізу і тому можуть використовуватися на певних етапах діагностики, що дасть змогу значно її пришвидшити.

Список літератури

1. Зарицкий А. М. Сальмонеллезы / А. М. Зарицкий. – К.: Здоров'я, 1988. – 160с.
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. Оптичний імунний біосенсор «Plasmonotest» для визначення *Salmonellatyphimurium* / Ю. О. Огороднійчук, Т.С. Лебедева, П. Б. Шпильовий, М. Ф. Стародуб // Сенсорна електроніка і мікросистемні технології. – 2013. – Т. 10 (1). – Р. 106-113.
4. Application of Room Temperature Photoluminescence from ZnO Nanorods for Salmonella Detection / Viter R., Khranovsky V, Starodub N. [et al.] // IEEE Sensors Journal. – V. 14 (6). – 2014. – P. 2028 – 2034.
5. Barakat S. M. Mahmoud. Salmonella – A Dangerous Foodborne Pathogen. / S. M. Barakat / Mahmoud. – InTech. – 2012. – 238 p.
6. Development of indirect competitive ELISA for the detection of *Salmonella typhimurium* / J. Bang, S. Shukla, Y. Kim, M. Kim // Romanian Biotechnological Letters. – 2012. – V.17 (2). – P. 7194-7204.
7. Biosensors for detection of pathogenic bacteria / D. Ivnitski, I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, E. Wilkins // J.Biosensors&Bioelectronics. – 1999. – Vol. 14. – P. 599-624.
8. Nanoparticles formation by combustion techniques: Gaseous dispersed synthesis of refractory oxides / A. N. Zolotko, N. I. Poletaev, J. I. Vovchuk, A. V. Floriko // Gas Phase Nanoparticle Synthesis. – 2005. – P. 123–156.
9. PCR-Genosensor Rapid Test for Detecting *Salmonella* / I. Pividori, A. Merkoci, J. Barbe, S. Alegret // J Electroanalysis. – 2003. – №15. – P. 23–24.
10. Prusak-Sochaczewski E., An improved ELISA method for the detection of *Salmonella typhimurium* / E. Prusak-Sochaczewski, J. H. T. Luong // J.Appl. Microbiology. – 1989. – V. 66 (12). – P. 127–135.

Предложено несколько типов биосенсоров на основе оптических (ППР, ЭПВО) и потенциометрических (ИсПТ) трансдюсеров, а также биосенсор на основе наностержней ZnO для определения *S. typhimurium*. Проанализировано влияние предварительной подготовки трансдюсеров на чувствительность анализа. Установлено, что все предложенные биосенсоры эффективны при определении *S. typhimurium* в модельных растворах и могут использоваться в практике на разных уровнях диагностики. Наивысшую чувствительность получили при использовании биосенсора на основе ЭПВО, составлявшую несколько клеток (меньше 5) в 10 мл.

Иммунный биосенсор, реакция антиген-антитело, наностержни ZnO, *Salmonella typhimurium*.

Several types of biosensors based on optical (SPR, TIRE), potentiometric (ISFET) transducers and one based on ZnO nanorods are proposed for *S. typhimurium* detection. An effect of preliminary preparation of transducers to the sensitivity of analysis was analyzed. It was found that all proposed biosensors were effective for *S. typhimurium* detection in model solutions and can be used in practice at different levels of diagnostics. The highest sensitivity was obtained using TIRE based biosensor that was several cells (less than 5) in 10 ml.

Immune biosensor, antigen-antibody reaction, ZnO nanorods, *Salmonella typhimurium*.