

На правах рукописи

САФИНА Гульнара Рустамовна

**АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ ОДНО- И МНОГОЭЛЕКТРОДНЫЕ
ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ СЕНСОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ АНТИГЕНОВ И
АЛЛЕРГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ**

02.00.02 – аналитическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань –2005

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования “Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина” Министерства образования и науки Российской Федерации

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
МЕДЯНЦЕВА Эльвина Павловна

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
ГАРМОНОВ Сергей Юрьевич

кандидат химических наук,
ст. преподаватель
КРЕМЛЕВА Наталья Викторовна

Ведущая организация: Кубанский государственный
технологический университет

Защита диссертации состоится «10» ноября 2005 г. в 14.00 на заседании диссертационного Совета К 212.081.04 по химическим наукам Казанского государственного университета по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, Химический институт им. А.М. Бутлерова, Бутлеровская аудитория

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета

Отзывы на автореферат просим присылать по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, КГУ, Научная часть

Автореферат разослан «_____» октября 2005 г.

Ученый секретарь диссертационного Совета,
кандидат химических наук

Шайдарова Л.Г.

Актуальность темы. Разработка чувствительных и селективных способов определения патогенных микроорганизмов - задача, решение которой требует специальных аналитических подходов. Создание простых и надежных методов анализа болезнетворных бактерий представляет значимость для клинической медицины, пищевой промышленности, ветеринарии, контроля объектов окружающей среды, что особенно актуально в связи с возросшей в последнее время вероятностью угрозы террористических актов. Важная проблема клинической медицины, препятствующая правильной постановке диагноза, - сложность определения причины болезни при смешанных инфекциях, обусловленных действием нескольких бактерий различной природы, способных вызывать одинаковые заболевания. Большинство из наиболее часто используемых традиционных способов определения микроорганизмов, вследствие их длительности, трудоемкости не всегда позволяют провести определения в желаемом масштабе времени, кроме того, обладают недостаточной чувствительностью. Это обуславливает интерес исследователей к разработке новых вариантов анализа, основанных на сочетании принципов биокаталитических и иммунохимических взаимодействий, позволяющих определять патогенные бактерии с высокой чувствительностью, селективностью и проводить дифференцированную и комплексную диагностику инфекционных заболеваний.

Цель исследования: разработка новых амперометрических иммуноферментных сенсоров (ИФС) на основе одно- и многоэлектродных систем для экспрессного и чувствительного определения антигенов микроорганизмов *Streptococcus pyogenes* (пиогенного стрептококка), *Staphylococcus aureus* (золотистого стафилококка), *Klebsiella pneumoniae* (клебсиелла пневмония) и антител к *Staphylococcus aureus* с оценкой специфичности иммунохимических взаимодействий.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- Разработать лабораторные модели амперометрических иммуноферментных сенсоров, различающихся по принципу регистрации аналитического сигнала, для определения бактериальных антигенов *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumoniae* и аллергенспецифических антител к *Staphylococcus aureus*.
- Разработать способ получения биочувствительной части иммуноферментных сенсоров с использованием совместной иммобилизации фермента и соответствующих иммунореагентов. Подобрать условия функционирования иммуноферментных сенсоров – pH буферных растворов, концентрацию субстрата, разведение антител, диапазоны рабочих концентраций для определения изучаемых соединений.
- Оценить влияние иммунных комплексов [антиген-антитело] на каталитическую активность иммобилизованного фермента. Определить константы связывания иммунных комплексов. Исследовать перекрестную реактивность антител к антигенам некоторых близкородственных микроорганизмов.
- Найти возможность одновременного определения различных бактериальных антигенов при их совместном присутствии с применением иммуноферментных сенсоров на основе многоэлектродных печатных систем.

- Показать возможность использования предлагаемых амперометрических иммуноферментных сенсоров для проведения диагностики инфекционных заболеваний.

Научная новизна: Разработаны новые амперометрические одно- и многоэлектродные иммуноферментные сенсоры на основе первичных преобразователей различного типа и совместно иммобилизованных иммунореагентов и фермента холинэстеразы для определения бактериальных антигенов (Аг) и аллергенспецифических антител (Ат).

Подобраны соотношения биоконпонентов, входящих в биочувствительную часть аналитических устройств, выбраны рабочие условия функционирования ИФС (матричные материалы, рН буферных растворов, концентрации реагентов биоспецифических взаимодействий). Установлено влияние иммунных комплексов на каталитическую активность иммобилизованного фермента. Рассчитаны константы связывания иммунных комплексов в условиях иммобилизации одного из компонентов биоспецифического взаимодействия. Отсутствие перекрестной реактивности используемых антител против *Streptococcus pyogenes* и *Klebsiella pneumoniae* к антигенам других бактерий, в том числе, близкородственных микроорганизмов, позволяет проводить одновременное определение различных бактериальных антигенов при их совместном присутствии в пробе с использованием многоэлектродных печатных систем в различных концентрационных диапазонах, даже при многократном превышении одного определяемого компонента по отношению к другому. Проведено сопоставление результатов определения бактериальных антигенов, полученных с применением различных типов амперометрических иммуноферментных сенсоров.

Практическая значимость: Предложены методики определения бактериальных антигенов *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и аллергенспецифических антител к *Staphylococcus aureus* в биологических жидкостях (сыворотках крови) с использованием разработанных амперометрических ИФС. Показана возможность использования аналитических устройств для проведения комплексной и дифференцированной экспресс-диагностики инфекционных заболеваний, в том числе, на ранних стадиях развития.

На защиту выносятся:

- Лабораторные модели амперометрических иммуноферментных сенсоров на основе различных физических преобразователей – стационарного ртутно-пленочного электрода и одно- и многоэлектродных платиновых печатных систем - для определения бактериальных антигенов *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumoniae* и аллергенспецифических антител к *Staphylococcus aureus*.
- Способ получения биочувствительной части иммуноферментных сенсоров с помощью совместной иммобилизации холинэстеразы, соответствующих иммунореагентов и применением различных матричных компонентов. Выбор условий для функционирования иммуноферментных сенсоров – рН буферных растворов, концентрации субстрата, разведения антител, интервалы рабочих концентраций бактериальных антигенов и антител.
- Результаты исследования влияния иммунных комплексов [антиген-антитело] на каталитическую активность иммобилизованной холинэстеразы.

- Значения констант образования иммунных комплексов и сопоставление данных, полученных с использованием различных типов сенсоров. Определение перекрестной реактивности используемых антител к антигенам близкородственных микроорганизмов.

- Результаты определения различных бактериальных антигенов при их совместном присутствии из одного образца с использованием иммуноферментных сенсоров на основе многоэлектродных печатных систем.

- Новые способы иммуноферментного определения бактериальных антигенов *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и аллергенспецифических антител к *Staphylococcus aureus* в биологических жидкостях с использованием различных типов амперометрических иммуноферментных сенсоров.

Апробация работы: Материалы диссертации докладывались и обсуждались на Всероссийской конференции "Актуальные проблемы аналитической химии" (Москва, 2002), III, V Научных конференциях молодых ученых, аспирантов и студентов Научно-образовательного центра Казанского государственного университета "Материалы и технологии XXI века" (Казань, 2003, 2005), XVII Менделеевском конгрессе по общей и прикладной химии (Казань, 2003), IV и V Всероссийских конференциях молодых ученых "Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии" (Саратов, 2003, 2005), V Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды с международным участием "Экоаналитика-2003" (С.-Петербург, 2003), Международном форуме "Аналитика и аналитики" (Воронеж, 2003), III междисциплинарной конференции с международным участием "Новые биокибернетические и телемедицинские технологии 21 века для диагностики и лечения заболеваний человека" (НБИТТ-21) (Петрозаводск, 2003), Итоговой научной конференции Казанского государственного университета (2004), VI Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа "ЭМА-2004" с международным участием (Уфа, 2004), II Всероссийском симпозиуме "Тест-методы химического анализа" (Саратов, 2004), X Всероссийской научно-практической конференции "Молодые ученые в медицине" (Казань, 2005), Всероссийской научной конференции с международным участием "Электроаналитика-2005" (Екатеринбург, 2005), 2 Всероссийской конференции «Аналитические приборы» (С.-Петербург, 2005).

Работа проводилась при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 03-03-33116) и Министерства образования РФ (проект А04-2.11-797, грант для поддержки научно-исследовательской работы аспирантов высших учебных заведений).

Публикации: По теме диссертации опубликовано 26 работ. Из них 9 статей и 17 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях.

Структура и объем работы: Диссертация изложена на 178 страницах машинописного текста, содержит 45 таблиц и 14 рисунков. Работа состоит из введения, шести глав, выводов, списка литературы, включающего 189 ссылок.

В первой главе представлен обзор литературы, посвященный проблеме определения патогенных микроорганизмов с использованием различных био- и иммуносенсоров. Вторая глава содержит постановку задачи, методы и условия эксперимента. В третьей главе рассмотрены возможности определения бактериальных Аг и аллергенспецифических Ат с помощью одноэлектродных амперометрических иммуноферментных сенсоров различных типов. Уделено внимание объяснению механизма влияния иммунных комплексов на

активность иммобилизованной холинэстеразы. В четвертой главе представлены расчет констант связывания иммунных комплексов и оценка специфичности иммунохимических взаимодействий. Проведено сопоставление величин констант связывания иммунных комплексов, полученных с использованием различных типов иммуноферментных сенсоров. В пятой главе представлены результаты одновременного определения бактериальных антигенов в различных комбинациях и соотношениях с использованием ИФС на основе многоэлектродных печатных систем. В шестой главе предложены способы определения бактериальных антигенов *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и аллергенспецифических антител к *Staphylococcus aureus* в биологических жидкостях с помощью разработанных одно- и многоэлектродных иммуноферментных сенсоров.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования: Антигены *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и поликлональные антитела против них. Применяли бутирилхолинэстеразу (ХЭ) из сыворотки крови лошади, активностью 110 и 30 АЕ/мг, и щелочную фосфатазу (ЩФ), активностью 1000 АЕ/мг. В качестве субстратов использовали бутирилтиохолин иодид (БТХИ) и 1-нафтил фосфата моноватриевую соль (1-НФ). Для изготовления биочувствительной части ИФС в качестве матричных компонентов использовали нитрат целлюлозу типа коллоксилин со средним содержанием азота 11.5–12 % и бычий сывороточный альбумин (БСА). Для определения антигена *Staphylococcus aureus* также использовали агглютинационную тест-систему Pastorex® Staph-Plus.

Методы исследования: Электрохимические измерения проводили с использованием потенциостата ПИ 50-1.1, совмещенного с компьютером IBM PC-286, с ячейкой, термостатированной при $(25 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$ с помощью термостата ТС-50; многоцелевого электрохимического детектора "МЕВ" с компьютеризированным управлением.

Рабочими электродами служили ИФС, состоящие из биочувствительной части на основе совместно иммобилизованных ХЭ и соответствующих иммунореагентов и первичных преобразователей, в качестве которых использовали стационарный ртутно-пленочный электрод с серебряной подложкой и одно- и многоэлектродные системы, изготовленные по screen-printed технологии (фирма BVT Technologies, Чехия) (рис. 1).

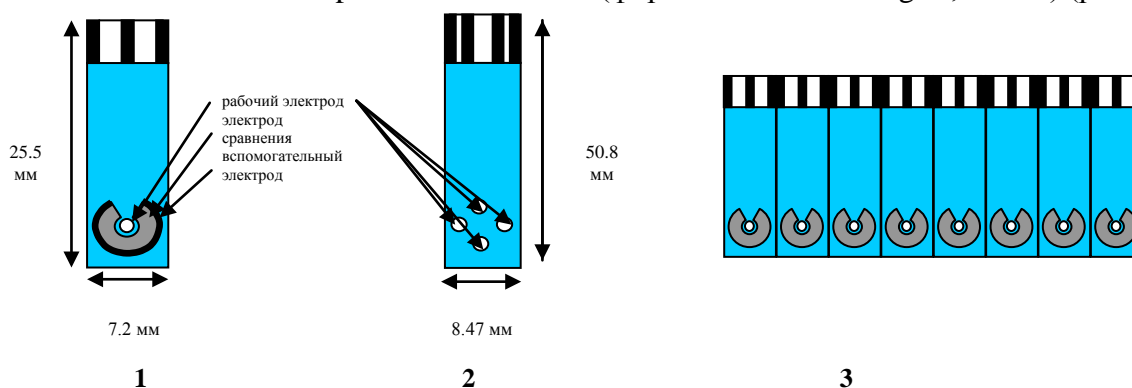


Рис.1. Одноэлектродные (1 и 3) и многоэлектродные (с четырьмя рабочими поверхностями) (2) печатные системы

ОДНОЭЛЕКТРОДНЫЕ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ СЕНСОРЫ

Иммуноферментные сенсоры первого типа разработаны на основе стационарного ртутно-пленочного электрода с серебряной подложкой. Биочувствительная часть включает холинэстеразу и соответствующие антитела в различных разведениях, совместно иммобилизованные в матрицу из нитрата целлюлозы.

ИФС второго типа представляли собой платиновые печатные системы, на поверхность которых проводили со-иммобилизацию ХЭ и иммунореагентов.

При выборе условий функционирования аналитических устройств варьировали состав матричного компонента, рН буферных растворов, разведение антител. В качестве матричного компонента для иммобилизации при разработке сенсоров второго типа использовали бычий сывороточный альбумин (БСА), хитозан и нитрат целлюлозы. Наилучшими аналитическими характеристиками обладали ИФС на основе БСА.

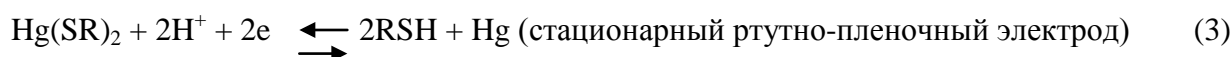
Установлено, что со-иммобилизация Ат не снижает каталитической активности иммобилизованного фермента как в сенсорах первого, так и в сенсорах второго типа. Это следует из сопоставления величин удельной активности иммобилизованной холинэстеразы (ИХЭ) в отсутствие и присутствии иммобилизованных антител против изучаемых бактериальных антигенов (табл.1).

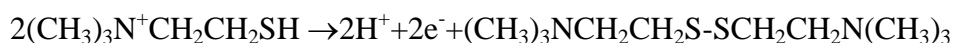
Таблица 1.

Влияние иммунореагента на удельную каталитическую активность холинэстеразы при совместной иммобилизации (n = 5; P = 0.95)

Со-иммобилизованный реагент	Матричный компонент					
	Нитрат целлюлозы			Бычий сывороточный альбумин		
	Разведение Ат (Аг)	Удельная каталитическая активность ИХЭ, мкмоль/мин×см ²		Разведение Ат (Аг)	Удельная каталитическая активность ИХЭ, мкмоль/мин×см ²	
		В отсутствие Ат (Аг)	В присутствии Ат (Аг)		В отсутствие Ат (Аг)	В присутствии Ат (Аг)
Ат к <i>Streptococcus pyogenes</i>	1:100	7.8±0.2	8.1±0.2	1:20	0.64±0.02	0.62±0.03
Ат к <i>Staphylococcus aureus</i>			8.8±0.4			0.68±0.01
Ат к <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1:20	10.1±0.2	10.5±0.1	1:100	1.2±0.1	1.3±0.2
Аг <i>Staphylococcus aureus</i>	–	–	–	1:20	1.01±0.02	0.99±0.02

В основе формирования аналитического сигнала лежит сочетание иммунологической (1), биокаталитической (2) и электрохимической реакций (3):





(платиновый печатный электрод)

Установлено, что введение в исследуемый раствор антигена микроорганизмов в присутствии иммобилизованных антител, вызывало изменение величины аналитического сигнала при использовании как сенсоров первого, так и сенсоров второго типа (увеличение аналитического сигнала). Можно предположить, что отрицательно заряженный иммунный комплекс ($pI_{\text{Ag}} \approx 3-4$), образующийся на поверхности биочувствительной части иммуноферментного сенсора, является эффектором иммобилизованного фермента, способствуя привлечению дополнительных количеств положительно заряженного субстрата.

Аналитические возможности разработанных ИФС представлены в табл. 2.

Таблица 2.

Аналитические характеристики амперометрических одноэлектродных ИФС для определения бактериальных антигенов и аллергенспецифических Ат

Исследуемое соединение	Разведение Ат (*C _{Аг} , мг/мл)	Интервалы рабочих концентраций, мг/мл	C _n , мг/мл
Первичный преобразователь – стационарный ртутно-пленочный электрод			
Аг <i>Streptococcus pyogenes</i>	1:100	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	7×10^{-12}
Аг <i>Staphylococcus aureus</i>	1:100	$1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-4}$	5×10^{-9}
Аг <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1:20	$1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-3}$	5×10^{-10}
Первичный преобразователь – платиновый печатный электрод			
Аг <i>Streptococcus pyogenes</i>	1:20	$1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-2}$	5×10^{-9}
Аг <i>Staphylococcus aureus</i>	1:20	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-8}$	5×10^{-9}
Аг <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1:100	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	5×10^{-12}
Ат к <i>Staphylococcus aureus</i>	*0.05	$1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-11}$	8×10^{-12}

Правильность результатов проверена методом “введено-найдено”. Некоторые из полученных результатов представлены в табл. 3.

Таблица 3.

Определение бактериальных Аг и аллергенспецифических Ат с помощью амперометрических одноэлектродных ИФС (n = 5; P = 0.95)

Определяемое соединение	Разведение Ат (C _{Аг} , мг/мл)	Концентрация Аг, мг/мл		S _r
		Введено	Найдено	
Первичный преобразователь – стационарный ртутно-пленочный электрод				
Аг <i>Streptococcus pyogenes</i>	1:100	5×10^{-5}	$(5.2 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	0.05
		5×10^{-7}	$(4.7 \pm 0.4) \times 10^{-7}$	0.08
		5×10^{-8}	$(5.2 \pm 0.5) \times 10^{-8}$	0.09
Первичный преобразователь – платиновый печатный электрод				
Ат к <i>Staphylococcus aureus</i>	0.5	4×10^{-5}	$(3.8 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	0.05
		3×10^{-7}	$(2.6 \pm 0.2) \times 10^{-7}$	0.07
		6×10^{-9}	$(6.3 \pm 0.5) \times 10^{-9}$	0.08
		5×10^{-11}	$(4.9 \pm 0.5) \times 10^{-11}$	0.10

В подтверждении предположения активирующего действия иммунных комплексов на активность иммобилизованного фермента было изучено поведение другой фермент-субстратной пары - щелочная фосфатаза – 1-нафтил фосфат. Для создания биочувствительной части сенсора проводили совместную иммобилизацию щелочной фосфатазы и Ат против *Staphylococcus aureus* в разведении 1:20 на поверхность одноэлектродной печатной системы. Пик окисления 1-нафтил фосфата представлен на рис. 2 (кривая 1). Введение Аг *Staphylococcus aureus* в изучаемый раствор вызывает уменьшение величины аналитического сигнала по сравнению с контрольным опытом в отсутствие Аг (рис. 2, кривая 2), снижающееся по мере уменьшения концентрации вводимого раствора антигена. Возможно, это связано с тем, что образующийся на поверхности биочувствительной части ИФС иммунный комплекс затрудняет подход молекул субстрата к активному центру фермента. Условия функционирования и аналитические возможности ИФС на основе щелочной фосфатазы и иммобилизованных Ат представлены в табл. 4.

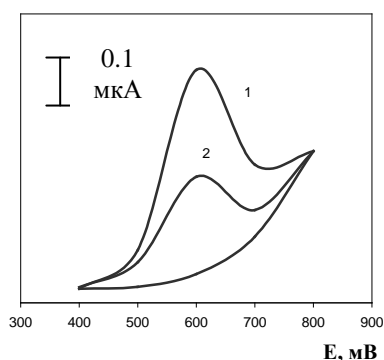


Рис. 2. Вольтамперограммы окисления 1-нафтола на платиновом электроде (кривая 1) на фоне трис-НСI буферного раствора (рН 7.6) в присутствии иммобилизованной ЩФ ($C_s = 1 \times 10^{-3}$ моль/л); в присутствии иммобилизованных ЩФ, Ат к *Staphylococcus aureus* (1:20) и Аг *Staphylococcus aureus* ($c = 1 \times 10^{-5}$ мг/мл) (кривая 2).

Таблица 4.

Условия функционирования и аналитические характеристики ИФС на основе щелочной фосфатазы и иммобилизованных Ат к *Staphylococcus aureus*

Первичный преобразователь	Матричный компонент	Буферный раствор	Разведение Ат	Диапазон определяемых концентраций, мг/мл	C_H , мг/мл
Платиновый печатный электрод	Бычий сывороточный альбумин	Трис-НСI рН 7.6	1:20	$1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-8}$	7×10^{-9}

ОЦЕНКА КОНСТАНТ СВЯЗЫВАНИЯ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Константа образования иммунного комплекса (константа связывания) является одной из важнейших физико-химических характеристик иммунологической реакции, на основании которой можно оценить качество антител и антигенов, активность антисывороток, а также сделать вывод о возможности использования данной реакции в аналитических целях.

Оценка констант связывания проведена с использованием ИФС, обладающих наилучшими аналитическими характеристиками и позволяющих определять бактериальные антигены в более широком диапазоне концентраций, с большей чувствительностью. Условия для определения констант связывания с помощью разработанных ИФС представлены в табл. 5.

Таблица 5.

**Рабочие условия определения констант образования
иммунных комплексов с помощью различных типов ИФС**

Определяемое соединение	Физический преобразователь	Разведение Ат (*C _{Аг} , мг/мл)	Рабочая область концентраций, мг/мл
Аг <i>Streptococcus pyogenes</i> Аг <i>Staphylococcus aureus</i>	Стационарный ртутно-пленочный электрод	1:100 1:100	$1 \times 10^{-8} - 7 \times 10^{-7}$ $1 \times 10^{-8} - 5 \times 10^{-6}$
Аг <i>Klebsiella pneumoniae</i> Ат к <i>Staphylococcus aureus</i>	Печатный платиновый электрод	1:100 *0.05	$5 \times 10^{-10} - 2 \times 10^{-9}$ $4 \times 10^{-11} - 4 \times 10^{-9}$

Графическая обработка экспериментальных данных в координатах Скэтчарда позволяет не только определять константы образования иммунных комплексов, но и рассчитать концентрацию активных антител (антигенов) в системе. Результаты определения констант связывания и концентраций активных Ат и Аг представлены в табл. 6.

Найденные значения констант образования иммунных комплексов на уровне $n \times 10^9 - n \times 10^{10}$ (мг/мл)⁻¹ указывают на достаточно прочное связывание Аг с соответствующими Ат и позволяют сделать вывод о возможности использования иммунологических реакций в аналитических целях для определения бактериальных антигенов. В связи с этим можно отметить, что возможность определения низких концентраций Аг также обусловлена высокой аффинностью Ат, входящих в состав биочувствительной части иммуноферментных сенсоров. Проведено сопоставление значений констант образования иммунного комплекса Аг *Staphylococcus aureus* – Ат с использованием ИФС, в основу действия которых положены различные принципы функционирования (поз. 2, 3). Близость рассчитанных величин констант связывания, полученных с помощью двух различных типов сенсоров, свидетельствует о правильности результатов, что позволяет сделать вывод о возможности использования разработанной методики для проведения определения прочности иммунологического взаимодействия, и, следовательно, оценить чувствительность иммуноанализа.

Таблица 6.

**Значения констант связывания иммунных комплексов, определенные с
использованием различных типов иммуносенсоров (n = 5; P = 0.95)**

№ п/п	Физический преобразователь	Матричный компонент	Разведение Ат (*C _{Аг} , мг/мл)	Константа связывания иммунного комплекса, мг/мл			Сактивных Ат (*Аг, мг/мл)
				Ка ₁	Ка ₂	Ка ₃	
Аг <i>Streptococcus pyogenes</i> - Ат Аг							
1	Стационарный ртутно-пленочный электрод	Нитрат целлюлозы	1:100	$(5.7 \pm 0.9) \times 10^9$	$(7.4 \pm 0.4) \times 10^8$	—	$(7.3 \pm 0.2) \times 10^{-7}$
<i>Staphylococcus aureus</i> - Ат							
2	Стационарный ртутно-пленочный электрод	Нитрат целлюлозы	1:100	$(2.8 \pm 0.2) \times 10^9$	$(6.0 \pm 0.7) \times 10^7$	$(4.7 \pm 0.5) \times 10^6$	$(6.2 \pm 0.3) \times 10^{-6}$
3	Платиновый печатный электрод	БСА	*0.05	$(3.6 \pm 0.4) \times 10^9$	$(8.7 \pm 0.7) \times 10^7$	$(6.7 \pm 0.6) \times 10^6$	* $(7.8 \pm 0.1) \times 10^{-8}$
Аг <i>Klebsiella pneumoniae</i> - Ат							
4	Платиновый печатный электрод	БСА	1:100	$(6.9 \pm 0.2) \times 10^{10}$	$(2.7 \pm 0.1) \times 10^9$	—	$(1.8 \pm 0.2) \times 10^{-9}$

ИФС с высокоспецифичными антителами могут выступать в качестве инструмента для извлечения и последующего определения соответствующих бактериальных антигенов. Степени концентрирования Аг *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumoniae* с помощью соответствующих иммобилизованных Ат составляют 98 - 99 %, 91.6 - 99.3% и 73 – 94%, соответственно.

С целью оценки селективности иммуноанализа была исследована возможность перекрестной реактивности Ат против *Streptococcus pyogenes* и *Klebsiella pneumoniae* к антигенам различных бактерий (табл. 7). Выбор антигенов был связан с тем, что представляло интерес оценить возможность взаимодействия используемых Ат с близкородственными антигенами и антигенами бактерий, вызывающих сходные по симптоматике заболевания. Введение в раствор Аг, при концентрациях даже в 10-1000 раз превосходящих концентрации антигенов *Streptococcus pyogenes* и *Klebsiella pneumoniae*, при которых наблюдается максимальный активирующий эффект, не изменяет каталитическую активность иммобилизованной холинэстеразы. Таким образом, показано, что используемые антитела не обладают перекрестной реактивностью ни к одному из исследуемых антигенов. Это подтверждает специфичность используемых Ат лишь к соответствующим Аг и служит предпосылкой для селективного определения Аг *Streptococcus pyogenes* и *Klebsiella pneumoniae* независимо от присутствия антигенов других близкородственных микроорганизмов.

Таблица 7.

Оценка перекрестной реактивности Ат к Аг различных микроорганизмов

Исследуемое соединение	Разведение Ат	Исследуемый антиген	Перекрестная реактивность
Ат к <i>Streptococcus pyogenes</i>	1:100	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	отсутствует
Ат к <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1:20	<i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	отсутствует

**МНОГОЭЛЕКТРОДНЫЕ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ
СЕНСОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ АНТИГЕНОВ
ПРИ ИХ СОВМЕСТНОМ ПРИСУТСТВИИ**

Исследована возможность одновременного определения различных комбинаций и соотношений бактериальных антигенов при их совместном присутствии с помощью многоэлектродного амперометрического ИФС. Биочувствительная часть аналитического устройства включала ХЭ и Ат против исследуемых Аг, со-иммобилизованные на рабочие поверхности многоэлектродной печатной системы. Совместная иммобилизация Аг не снижает активность иммобилизованного фермента.

Условия функционирования многоэлектродного ИФС представлены в табл. 8.

Таблица 8.

Многоэлектродный ИФС и условия его функционирования (n=5; P=0.95)

Со-иммобилизованные Ат	Преобразователь	Матричный компонент	Буферный раствор	Разведение Ат
<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Многоэлектродная печатная система	Бычий сывороточный альбумин	Фосфатный рН 7.5	1:20 1:20 1:100

Аналитические характеристики разработанного ИФС представлены в табл. 9. Совместное присутствие Ат против различных антигенов в составе одного сенсора не ухудшило его аналитические характеристики, по сравнению с аналитическими характеристиками ИФС на основе одноэлектродных печатных систем для определения соответствующих Аг.

Таблица 9.

Аналитические характеристики многоэлектродного амперометрического ИФС для определения бактериальных антигенов

Исследуемый Аг	Уравнение градуировочного графика, $(I_p/I_0) \times 100\% = a(-\lg C) + b$, г			Интервал определяемых концентраций, мг/мл	C_n , мг/мл
	a	b	г		
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-26±1	299±6	-0.9949	$1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-2}$	5×10^{-9}
<i>Staphylococcus aureus</i>	-21.2±0.2	275±1	-0.9998	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-8}$	5×10^{-9}
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-2.70±0.07	131.5±0.5	-0.9980	$1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-11}$	5×10^{-12}

Показана возможность использования разработанных многоэлектродных иммуноферментных сенсоров для одновременной идентификации следующих комбинаций антигенов - *Streptococcus pyogenes:Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes:Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus:Klebsiella pneumoniae* не только при их сопоставимых содержаниях в пробе (1:1 в диапазонах концентраций от $n \times 10^{-7}$ до $n \times 10^{-3}$ мг/мл), но и в случаях соотношения антигенов 1:10, 1:100, и даже определения одного Аг при многократном избытке другого (1:1000, 1:10000). Sr определений не превышает 0.12. Результаты определения трех различных бактериальных Аг с помощью соответствующего многоэлектродного ИФС приведены в табл. 10.

Таблица 10.

Результаты определения бактериальных Аг *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumoniae* с помощью многоэлектродного ИФС

Определяемый Аг	Соотношение Аг	Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	Sr
<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1:1:1	3×10^{-3}	$(2.9 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	0.07
<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>		2×10^{-6}	$(1.9 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	0.1
<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>		2×10^{-6}	$(1.7 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	0.11
<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10000:6700:1	3×10^{-3}	$(3.4 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	0.06
<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10000:1:10000	2×10^{-3}	$(1.9 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	0.05
<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>		2×10^{-7}	$(1.7 \pm 0.2) \times 10^{-7}$	0.11
<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>		2×10^{-3}	$(2.2 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	0.05
<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1:10000:1000	3×10^{-7}	$(3.0 \pm 0.3) \times 10^{-7}$	0.10
<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>		3×10^{-3}	$(2.4 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	0.07
<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>		3×10^{-4}	$(3.1 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	0.08

Как следует из полученных результатов, наличие нескольких антигенов в одной пробе не мешает определению друг друга.

Использование предложенных способов иммобилизации фермента с применением определенных матричных материалов позволяет сохранить каталитическую активность холинэстеразы и иммунологические свойства антител в течение не менее 30 дней со дня изготовления ИФС. Погрешность изменения аналитического сигнала от электрода к электроду не превышает 6-10%, что указывает на достаточно хорошую воспроизводимость биочувствительной части предлагаемых сенсоров.

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ СЕНСОРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ АНТИГЕНОВ И АЛЛЕРГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Разработанные иммуноферментные сенсоры использованы для определения бактериальных антигенов в сыворотках крови пациентов, страдающих воспалительными и аллергическими заболеваниями с целью подтверждения и уточнения поставленного диагноза.

Определение Аг *Streptococcus pyogenes*: Результаты определений Аг пиогенного стрептококка с использованием разработанных иммуноферментных сенсоров представлены в табл. 11. Данные, полученные с помощью разработанных ИФС, достаточно хорошо сопоставимы с результатами медицинского осмотра.

Таблица 11.

Результаты определения Аг *Streptococcus pyogenes* в сыворотках крови, полученные с использованием различных типов ИФС (n =5, P = 0.95)

№ п/п	Бактериологический анализ	Данные физического осмотра	Определения с помощью амперметрических ИФС						
			Интенсивность заболевания	платиновый планарный электрод		стационарный ртутно-плёночный электрод		$F_{\text{расч}}$ $F_{\text{табл}}=6.39$	$t_{\text{расч}}$ $t_{\text{табл}}=2.78$
				$c_{\text{Аг}}$, МГ/МЛ	S_{Γ}	$c_{\text{Аг}}$, МГ/МЛ	S_{Γ}		
1	<i>Streptococcus pyogenes</i>	xxx	$(1.3 \pm 0.1) \times 10^{-4}$	0.06	$(0.9 \pm 0.06) \times 10^{-4}$	0.07	4.0	1.9	
2		xxx	$(8.7 \pm 0.4) \times 10^{-5}$	0.06	$(7.4 \pm 0.4) \times 10^{-5}$	0.05	2.5	2.2	
3		xx	–		–				
4		xx	–			–			
5		x	$(2.3 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	0.08	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^{-5}$	0.07	4.3	2.5	
6		x	$(3.3 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	0.06	$(4.4 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	0.06	2.3	2.3	
7	–	xxx	$(9.3 \pm 0.6) \times 10^{-5}$	0.06	$(6.5 \pm 0.5) \times 10^{-5}$	0.07	6.2	2.75	
8		xx	$(5.1 \pm 0.4) \times 10^{-5}$	0.07	$(7.4 \pm 0.4) \times 10^{-5}$	0.05	6.1	2.6	
9		xx	–		–				
10	*	–	–		–				
11	Сыворотка крови, содержащая пенициллин, без стрептококка	–	–		–				

xxx - тяжелая форма инфекционного заболевания; xx - средняя тяжесть заболевания; x - легкая форма инфекционного заболевания; * - пациенты, прошедшие курс лечения антибиотиками; - - бактериальный антиген не обнаружен

При тяжелых формах заболеваний наблюдается повышенное содержание антигена в крови (поз. 1, 2), в то время как при более легких формах болезни концентрация Аг несколько ниже (поз. 5). Определение бактериального Аг с использованием разработанных ИФС при отрицательных результатах бактериологического анализа (позиции 7-9), объясняется тем, что используемый для бактериологического анализа материал был взят с поверхности тканей, подвергшихся воздействию антисептиков или антибиотиков, вследствие чего выявить наличие микроорганизма не представляется возможным, в то время как разработанные ИФС способны определить общее количество бактериального Аг в сыворотке крови, вне зависимости от локализации возбудителя. Отсутствие бактериального антигена в сыворотке крови при положительных результатах бактериологического анализа (позиции 3, 4) объясняется тем, что в этих случаях вероятной причиной заболевания, является не *Streptococcus pyogenes*, а другой микроорганизм.

О равноточности результатов, полученных с использованием различных типов сенсоров, свидетельствуют величины F-критерия, не превышающие табличные данные; систематическая погрешность в эксперименте не значима и ею можно пренебречь ($t_{расч} < t_{табл}$).

Определение Аг *Staphylococcus aureus*: Результаты определения антигена *Staphylococcus aureus* с использованием различных типов ИФС представлены в табл. 12. Разработанные ИФС позволяет проводить дифференцированную диагностику стафилококковой инфекции, что продемонстрировано на конкретных примерах (поз. 1, 3, 8). В этих случаях бактериологический анализ наряду со *Staphylococcus aureus* выявил присутствие грибкового возбудителя *Candida albicans* (поз. 1, 8) и бактериального патогена *Streptococcus pyogenes* (поз. 3).

Таблица 12.

Результаты определения Аг *Staphylococcus aureus* в сыворотках крови, полученные с помощью различных амперометрических ИФС (n =5, P = 0.95)

№	Бактериологический анализ	Результаты медицинского осмотра		Амперометрические ИФС				$F_{расч}; F_{табл} = 6.39$	$t_{расч}; t_{табл} = 2.78$
				стационарный ртутно-пленочный электрод		платиновый планарный электрод			
				С _{Аг} , мг/мл	S _r	С _{Аг} , мг/мл	S _r		
Диагноз	Тяжесть заболевания								
1	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i>	Хронический тонзиллит	xx	$(8.4 \pm 0.5) \times 10^{-5}$	0.05	$(9.5 \pm 0.4) \times 10^{-5}$	0.04	4.3	2.6
2	<i>Staphylococcus aureus</i>		xx	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^{-5}$	0.07	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-5}$	0.07	2.0	1.1
3	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>		xx	$(8.1 \pm 0.5) \times 10^{-7}$	0.07	$(9.4 \pm 0.7) \times 10^{-7}$	0.08	2.5	2.7
4	<i>Streptococcus pyogenes</i>		xx	-					
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	Дерматит	xxx	$(0.8 \pm 0.06) \times 10^{-5}$	0.07	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^{-5}$	0.09	3.2	1.5
6			xx	$(8.2 \pm 0.4) \times 10^{-6}$	0.06	$(8.3 \pm 0.5) \times 10^{-6}$	0.06	1.1	0.7
7	<i>Staphylococcus aureus</i>	Атопический дерматит	xx	$(7.6 \pm 0.5) \times 10^{-6}$	0.07	$(7.9 \pm 0.4) \times 10^{-6}$	0.05	1.7	1.2
8	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i>		xx	$(2.3 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	0.08	$(2.2 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	0.09	1.2	0.9
9	<i>Candida albicans</i>		xxx	-					

Однако наличие достаточно высоких концентраций Аг *Staphylococcus aureus* в сыворотках крови, обнаруженное с помощью разработанного ИФС, позволяет предположить, что причиной развития инфекционного заболевания является именно золотистый стафилококк.

В то же время, в случаях, когда выделенная бактериальная микрофлора представлена только *Streptococcus pyogenes* или *Candida albicans* (поз. 4, 9) отсутствие Аг *Staphylococcus aureus* в анализируемых образцах подтверждает основной вклад пиогенного стрептококка и грибкового патогена в процесс возникновения заболевания. Результаты, полученные с использованием различных типов разработанных ИФС, сопоставлены между собой. Рассчитанные величины F- и t- критериев не превышают табличные значения, что подтверждает равнозначность полученных данных и незначимость систематической ошибки.

Определение Аг *Staphylococcus aureus* проводили также с использованием коммерческих лабораторных тест-систем Pastorex® Staph-Plus, действие которых основано на проведении реакции агглютинации на частицах латекса и исследовании ее результатов. Из представленных в табл. 13. данных следует, что достаточно хорошо выраженная агглютинация наблюдается только при наличии бактериального антигена на уровне $n \times 10^4$ ($\sim 1 \times 10^{-3}$) мг/мл (поз. 1), причем при содержании Аг в сыворотке крови в области концентраций $n \times 10^{-5}$ мг/мл агглютинация выражена слабее (поз. 2).

Таблица 13.
Сопоставления результатов определений Аг *Staphylococcus aureus*, полученных различными методами

Сыворотка крови			
№	Бактериологический анализ	Тест-система Pastorex® Staph-Plus	ИФС, мг/мл (n=5; P=0.95)
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	++	$(9.6 \pm 0.2) \times 10^{-4}$
2		+	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^{-5}$
3		–	$(9.6 \pm 0.1) \times 10^{-6}$
4		–	$(2.3 \pm 0.3) \times 10^{-6}$
Растворы бактериального антигена <i>Staphylococcus aureus</i>			
№	Концентрация Аг, мг/мл	Тест-система Pastorex® Staph-Plu	ИФС, мг/мл (n=5; P=0.95)
5	1.1	++	*
6	0.055	++	*
7	1×10^{-6}	–	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^{-6}$
Бактериальная клеточная культура			
№	Бактериологический анализ	Тест-система Pastorex® Staph-Plus	ИФС, мг/мл (n=5; P=0.95)
8	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	*

+++ - ярко выраженная агглютинация; ++ - выраженная агглютинация; + - слабо выраженная агглютинация; – - агглютинация не наблюдается; * - высокие концентрации Аг не позволяют использовать ИФС

Проведенные исследования показали, что концентрации Аг на уровне $n \times 10^{-6}$ мг/мл и менее - не могут быть обнаружены с использованием латексной тест-системы (поз. 3, 4). Процесс образования иммунного комплекса ярче выражен при введении в реагент не сыворотки крови, а в результате внесения цельных клеток специально выращенной

микробной культуры (поз. 8), концентрация Аг в которой намного превышает количество антигена в биологических жидкостях, что говорит о применимости данной тест-системы для проведения лишь качественного экспресс-анализа наличия либо отсутствия бактериальных клеток *Staphylococcus aureus*, а не соответствующего циркулирующего в крови Аг.

Определение специфических Ат к *Staphylococcus aureus*: Соответствующий разработанный ИФС на основе печатной одноэлектродной системы использовали для идентификации аллергенспецифических антител к золотистому стафилококку. Концентрацию Ат (иммуноглобулинов класса Е) определяли как разность общего содержания иммуноглобулинов и иммуноглобулина класса G, соответственно до и после тепловой обработки сывороток крови. Результаты определений Аг и Ат к золотистому стафилококку с использованием соответствующих иммуноферментных сенсоров представлены в табл. 14. Показано, что при тяжелой форме заболевания наблюдаются более высокие концентрации (в 10-200 раз) антигена и антител в крови (поз. 1, 2), по сравнению со среднетяжелой формой болезни (поз. 5, 6). Отрицательные результаты анализа бактериального Аг и присутствия Ат при легких формах заболевания (поз. 7) объясняются присутствием циркулирующих в крови антител в течение определенного интервала времени по прошествии курса лечения. В данном случае концентрация антител значительно ниже (в 1000-10000 раз), чем в сыворотках крови пациентов, страдающих среднетяжелыми формами заболевания.

Таблица 14.

Результаты определения Аг *Staphylococcus aureus* и Ат против *Staphylococcus aureus* в сыворотках крови с помощью ИФС на основе одно- и многоэлектродных печатных систем (n = 6; P = 0.95)

№	Данные медицинского осмотра	Определения с помощью ИФС			
		ИФС на основе одноэлектродных печатных систем		ИФС на основе многоэлектродных печатных систем	
		С Аг <i>Staphylococcus aureus</i> , мг/мл	С Ат <i>Staphylococcus aureus</i> , мг/мл	С Аг <i>Staphylococcus aureus</i> , мг/мл	С Ат <i>Staphylococcus aureus</i> , мг/мл
1	×××	$(7.5 \pm 0.1) \times 10^{-4}$	$(6.7 \pm 0.4) \times 10^{-4}$	$(5.6 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	$(7.0 \pm 0.4) \times 10^{-4}$
2	×××	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	$(8.9 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-5}$	$(8.1 \pm 0.3) \times 10^{-5}$
3	××	$(2.3 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	$(7.1 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	$(2.6 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	$(7.9 \pm 0.5) \times 10^{-6}$
4	××	$(3.5 \pm 0.4) \times 10^{-6}$	$(6.0 \pm 0.4) \times 10^{-5}$	$(3.7 \pm 0.5) \times 10^{-6}$	$(5.6 \pm 0.4) \times 10^{-5}$
5	××	$(4.5 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	$(3.2 \pm 0.5) \times 10^{-6}$	$(5.0 \pm 0.5) \times 10^{-6}$	$(3.3 \pm 0.4) \times 10^{-6}$
6	××	$(5.9 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-7}$	$(5.8 \pm 0.1) \times 10^{-6}$	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-7}$
7	×	–	$(5.9 \pm 0.2) \times 10^{-9}$	–	$(6.9 \pm 0.5) \times 10^{-9}$

××× - тяжелая форма инфекционного заболевания; ×× - средняя тяжесть заболевания; × - легкая форма заболевания; – бактериальный антиген не обнаружен

Определение Аг *Klebsiella pneumoniae*: С целью выявления соответствующего возбудителя и диагностирования заболеваний почек проведено определение Аг *Klebsiella pneumoniae* с помощью ИФС и сопоставление полученных данных с результатами

медицинского осмотра. Некоторые данные представлены в табл. 15. Высокие концентрации антигена соответствуют тяжелой форме заболевания (поз. 1, 2, 6, 7), в то время как при среднетяжелых и легких формах заболевания концентрация Аг в 100-10000 раз ниже (поз. 3, 10, 12).

Таблица 15.

Результаты определения Аг *Klebsiella pneumoniae* в сыворотках крови с использованием ИФС (n=5; P=0.95)

№	Данные медицинского осмотра	Определения с помощью ИФС	
	Тяжесть заболевания	Концентрация Аг, мг/мл	S _r
Преобразователь – стационарный ртутно-пленочный электрод			
1	xxx	$(4.3 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	0.05
2	xxx	$(9.5 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	0.05
3	xx	$(3.6 \pm 0.3) \times 10^{-7}$	0.08
4	xx	$(1.8 \pm 0.2) \times 10^{-7}$	0.11
5	xx	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-7}$	0.12
Преобразователь – платиновый печатный электрод			
6	xxx	$(6.6 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	0.04
7	xxx	$(4.2 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	0.04
8	xx	$(7.6 \pm 0.4) \times 10^{-7}$	0.05
9	xx	$(2.4 \pm 0.2) \times 10^{-7}$	0.08
10	xx	$(3.7 \pm 0.4) \times 10^{-8}$	0.08
11	x	$(7.4 \pm 0.7) \times 10^{-9}$	0.10
12	x	$(3.8 \pm 0.4) \times 10^{-9}$	0.10

Разработанные амперометрические многоэлектродные ИФС использованы для одновременного определения бактериальных Аг *Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus aureus* в сыворотках крови с целью определения причины заболевания и проведения дифференцированной диагностики (табл. 16).

Таблица 16.

Результаты определения Аг *Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus aureus* в сыворотках крови с помощью одно- и многоэлектродных ИФС (n = 6; P = 0.95)

№	Наличие по результатам бактериологического анализа	Определения с помощью амперометрических ИФС, мг/мл			
		ИФС на основе одноканальных печатных электродов		Многоканальный ИФС на основе печатного электрода	
		С Аг <i>Streptococcus pyogenes</i> , мг/мл	С Аг <i>Staphylococcus aureus</i> , мг/мл	С Аг <i>Streptococcus pyogenes</i> , мг/мл	С Аг <i>Staphylococcus aureus</i> , мг/мл
1	<i>Streptococcus pyogenes</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>	$(2.9 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	$(7.5 \pm 0.6) \times 10^{-4}$	$(2.9 \pm 0.1) \times 10^{-5}$	$(8.9 \pm 0.5) \times 10^{-4}$
2		$(4.0 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	$(1.7 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	$(3.8 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	$(1.5 \pm 0.3) \times 10^{-6}$
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	$(9.2 \pm 0.4) \times 10^{-5}$	–	$(9.8 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	–
4		$(3.1 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	–	$(3.5 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	–
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	–	$(3.3 \pm 0.1) \times 10^{-6}$	–	$(2.9 \pm 0.3) \times 10^{-6}$
6		–	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	–	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^{-5}$
7	Смешанная микрофлора	$(4.9 \pm 0.4) \times 10^{-5}$	–	$(5.3 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	–
8	<i>Candida albicans</i>	–	–	–	–

– – бактериальный антиген не обнаружен

Определение в некоторых случаях антигена одного из возбудителей подтверждено и бактериологическим анализом (табл. 16 поз. 3, 4 и 5, 6). Отсутствие бактериальных Аг в

сыворотках крови свидетельствовало о том, что, возможно, заболевания вызваны возбудителями другой природы, например, грибковой (*Candida albicans*). Это подтверждено и результатами бактериологического анализа (поз. 8).

Результаты определения трех исследуемых бактериальных антигенов *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* с использованием ИФС на основе многоэлектродной печатной системы представлены в табл. 17.

Показано, что высокие концентрации Аг, определенных с помощью иммуноферментного сенсора, характерны для тяжелых случаев заболевания (поз. 1, 3), тогда как при легких формах болезни содержание Аг на несколько порядков ниже (поз. 4, 6).

Таблица 17.

Результаты определения бактериальных Аг в сыворотках крови с помощью ИФС на основе одно- и многоэлектродных печатных систем (n = 6; P = 0.95)

№	ИФС на основе многоэлектродных печатных систем			ИФС на основе одноэлектродных печатных систем		
	С Аг <i>Streptococcus pyogenes</i> , мг/мл	С Аг <i>Staphylococcus aureus</i> , мг/мл	С Аг <i>Klebsiella pneumoniae</i> , мг/мл	С Аг <i>Streptococcus pyogenes</i> , мг/мл	С Аг <i>Staphylococcus aureus</i> , мг/мл	С Аг <i>Klebsiella pneumoniae</i> , мг/мл
1	$(5.0 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	$(3.2 \pm 0.3) \times 10^{-6}$	$(4.7 \pm 0.5) \times 10^{-6}$	$(4.2 \pm 0.5) \times 10^{-5}$	$(3.4 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	$(5.5 \pm 0.6) \times 10^{-6}$
2	$(3.8 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	$(1.5 \pm 0.4) \times 10^{-6}$	–	$(4.0 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	$(1.7 \pm 0.1) \times 10^{-5}$	–
3	$(5.2 \pm 0.6) \times 10^{-5}$	–	$(3.1 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	$(5.8 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	–	$(3.0 \pm 0.1) \times 10^{-4}$
4	–	$(2.8 \pm 0.5) \times 10^{-6}$	$(1.7 \pm 0.5) \times 10^{-9}$	–	$(3.1 \pm 0.3) \times 10^{-6}$	$(1.2 \pm 0.3) \times 10^{-9}$
5	–	$(1.4 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	–	–	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	–
6	–	$(6.0 \pm 0.6) \times 10^{-8}$	–	–	–	$(5.2 \pm 0.4) \times 10^{-8}$

– – бактериальный антиген не обнаружен

Таким образом, предложенные амперометрических одно- и многоэлектродных ИФС для определения бактериальных Аг и специфических Ат к ним обладают высокой чувствительностью и селективностью, что позволяет использовать их для количественной оценки содержания антигенов в организме и проведения дифференцированной и комплексной диагностики инфекционных заболеваний, в том числе, и на ранних стадиях развития. Несомненными достоинствами предлагаемых амперометрических ИФС на основе печатных электродов являются использование минимального количества пробы (0.5-2 мкл сыворотки крови), экономия реагентов (объем электрохимической ячейки не превышает 200 мкл). Использование предложенных амперометрических иммуноферментных сенсоров на основе многоэлектродных печатных систем, значительно увеличивает экспрессность анализа (время определения трех компонентов не превышает 15 мин), позволяя проводить одновременное определение нескольких возбудителей различной природы из одной пробы, вне условий стационарных лабораторий, в режиме on-line.

ВЫВОДЫ

1. Предложены модели одно- и многоэлектродных амперометрических иммуноферментных сенсоров, основанных на использовании различных физических преобразователей аналитического сигнала – стационарного ртутно-пленочного и платиновых печатных электродов - для определения бактериальных антигенов *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumoniae* и аллергенспецифических антител к *Staphylococcus aureus*.
2. Разработан способ совместной иммобилизации холинэстеразы и соответствующих антигенов и антител, позволяющий сохранить каталитическую активность фермента и способность иммунореагентов к специфическому взаимодействию. При иммобилизации фермента и иммунореагентов в иммуноферментных сенсорах на основе стационарного ртутно-пленочного электрода в качестве матричного материала предложен нитрат целлюлозы; при создании аналитических устройств на основе платиновых печатных электродов иммобилизацию био- и иммунореагентов проводили в матрицу из бычьего сывороточного альбумина.
3. Найдены рабочие условия функционирования иммуноферментных сенсоров:
 - буферные растворы: боратный с pH 9.05 ± 0.05 (определение бактериальных Аг *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*), фосфатный с pH 8.0 ± 0.05 (определение Аг *Klebsiella pneumoniae*) с использованием ИФС на основе стационарного ртутно-пленочного электрода, фосфатный с pH 7.5 ± 0.05 (определение Аг *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, Ат к *Staphylococcus aureus*) с помощью ИФС на основе платиновых печатных электродов.
 - концентрация субстрата: 2×10^{-3} моль/л (ИФС на основе стационарного ртутно-пленочного электрода), 1×10^{-3} моль/л (ИФС на основе печатных электродов).
 - разведения антител: 1:100 (определение Аг *Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus aureus*), 1:20 (Аг *Klebsiella pneumoniae*) для ИФС на основе стационарного ртутно-пленочного электрода; 1:20 (определение Аг *Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus aureus*), 1:100 (Аг *Klebsiella pneumoniae*) для ИФС на основе печатных электродов. Концентрация Аг *Staphylococcus aureus* для определения соответствующих Ат - 0.05 мг/мл
 - интервалы рабочих концентраций 1×10^{-11} - 1×10^{-6} (определение Аг *Streptococcus pyogenes*), 1×10^{-8} - 1×10^{-4} (Аг *Staphylococcus aureus*), 1×10^{-9} - 1×10^{-3} мг/мл (Аг *Klebsiella pneumoniae*) - ИФС на основе стационарного ртутно-пленочного электрода; 1×10^{-8} - 1×10^{-2} (определение Аг *Streptococcus pyogenes*), 1×10^{-8} - 1×10^{-4} (Аг *Staphylococcus aureus*), 1×10^{-11} - 1×10^{-3} мг/мл (Аг *Klebsiella pneumoniae* и Ат к *Staphylococcus aureus*) – ИФС на основе screen-printed электродов.
4. На примере фермент-субстратной пары щелочная фосфатаза-1-нафтил фосфат показано преимущество использования детектирующей системы с активирующим эффектом - ХЭ-БТХИ - для определения бактериальных антигенов. Использование щелочной фосфатазы в качестве метки позволило получить дополнительные сведения о механизме влияния иммунных комплексов на активность иммобилизованной ХЭ.

5. Константы образования иммунных комплексов для Аг *Streptococcus pyogenes* составляют $Ka_1 = (5.7 \pm 0.9) \times 10^9$ (моль/л)⁻¹ и $Ka_2 = (7.4 \pm 0.4) \times 10^8$ (моль/л)⁻¹. Для антигена *Klebsiella pneumoniae* $Ka_1 = (6.9 \pm 0.2) \times 10^{10}$ (мг/мл)⁻¹, $Ka_2 = (2.7 \pm 0.1) \times 10^9$ (мг/мл)⁻¹. Проведено сопоставление констант связывания иммунных комплексов для *Staphylococcus aureus* с использованием различных типов иммуноферментных сенсоров. Значения констант образования комплекса [Аг-Аг] для *Staphylococcus aureus* при использовании иммобилизованных Аг составляют $Ka_1 = (2.8 \pm 0.2) \times 10^9$ (мг/мл)⁻¹, $Ka_2 = (6.0 \pm 0.7) \times 10^7$ (мг/мл)⁻¹, $Ka_3 = (4.7 \pm 0.5) \times 10^6$ (мг/мл)⁻¹. Для иммобилизованного Аг *Staphylococcus aureus* $Ka_1 = (3.6 \pm 0.4) \times 10^9$ (мг/мл)⁻¹, $Ka_2 = (8.7 \pm 0.7) \times 10^7$ (мг/мл)⁻¹, $Ka_3 = (6.7 \pm 0.6) \times 10^6$ (мг/мл)⁻¹. Используемые антитела не обладают перекрестной реактивностью к антигенам близкородственных возбудителей, что позволяет применять их для проведения высокоспецифичного извлечения и определения соответствующих бактериальных Аг.
6. Показана возможность одновременного определения нескольких бактериальных Аг при их различных соотношениях в пробе. Предложен вариант иммунохимического определения антигенов при их совместном присутствии из одного образца с использованием иммуноферментных сенсоров на основе мультиэлектродных печатных систем.
7. Проведена апробация разработанных амперометрических иммуноферментных сенсоров для определения бактериальных антигенов *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и аллергенспецифических антител к *Staphylococcus aureus* в биологических жидкостях (сыворотках крови). Показана возможность проведения дифференцированной диагностики инфекционных и аллергических заболеваний, в том числе и на ранних стадиях развития.

Основное содержание диссертационной работы изложено в следующих публикациях:

Статьи:

1. Сафина Г.Р. Амперометрические иммуноферментные сенсоры для определения бактериальных антигенов и их использование в контроле здоровья населения / Г.Р. Сафина, Э.П. Медянцева, О.Г. Фомина, Н.И. Глушко, Г.К. Будников // Химико-экологические проблемы Центрального региона России: сб. ст. – Орел: ООО Издательский дом “Орлик”, 2003. - Т. 1. - С. 128-131.
2. Сафина Г.Р. Амперометрический иммуноферментный сенсор на основе платиновых планарных электродов для определения бактериального антигена *Staphylococcus aureus* / Г.Р.Сафина, Э.П. Медянцева, О.Г. Фомина, Н.И. Глушко, А.А. Вершинин, Г.К. Будников // Сенсор. - 2004. - №1. - С.14-20.
3. Медянцева Э.П. Использование амперометрических иммуноферментных сенсоров для определения бактериальных антигенов / Э.П. Медянцева, Г.Р. Сафина, Е.В. Халдеева, А.А. Вершинин, Н.И. Глушко, Г.К. Будников // Журнал аналитической химии. - 2004. - Т. 59, №2. - С. 190-197.
4. Сафина Г.Р. Определение циркулирующих антигенов условно-патогенных бактерий с помощью амперометрических иммуноферментных сенсоров / Г.Р. Сафина, Э.П. Медянцева,

О.Г. Фомина, О.Н. Ванягина, Н.И. Глушко, Е.В. Халдеева, Г.К. Будников, Т.Г. Маланичева // Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний: сб. ст. - Н.-Новгород: Изд-во Нижегородского государственного университета, 2004. - С. 184-191.

5. Сафина Г.Р. Многоканальный амперометрический иммуноферментный сенсор для определения бактериальных антигенов при их совместном присутствии / Г.Р. Сафина, Э.П. Медянцева, О.Н. Базарнова, Н.И. Глушко, Г.К. Будников // Сенсор. - 2005. - № 2. – С. 8-13.

6. Сафина Г.Р. Амперометрический иммуноферментный сенсор для определения бактериального антигена *Klebsiella pneumoniae* / Г.Р. Сафина, Э.П. Медянцева, О.Н. Ванягина, Н.И. Глушко, Г.К. Будников // Биомедицинская химия. - 2005. - Т.51, №2. – С. 212-219.

7. Сафина Г.Р. Амперометрические иммуноферментные сенсоры для диагностики некоторых инфекционных заболеваний / Г.Р. Сафина, Э.П. Медянцева, О.Г. Фомина, Н.И. Глушко, Г.К. Будников // Журнал аналитической химии. - 2005. - Т.60, №6.- С. 616-623.

8. Сафина Г.Р. Определение антигена и антител к *Staphylococcus aureus* с использованием многоканального амперометрического иммуноферментного сенсора / Г.Р. Сафина, Э.П. Медянцева, О.Н. Базарнова // Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии: сб. ст. - Саратов: Научная книга, 2005. – С. 210-212.

9. Сафина Г.Р. Определение бактериального антигена *Klebsiella pneumoniae* с использованием амперометрического иммуноферментного сенсора на основе screen-printed электрода / Г.Р. Сафина, Э.П. Медянцева, О.Н. Базарнова, Н.И. Глушко // Ученые записки Казанского государственного университета. – 2005. – Т. 147, кн.1. - С. 121-130.

Тезисы докладов:

1. Сафина Г.Р. Амперометрический иммуноферментный сенсор для определения бактериальных антигенов / Г.Р. Сафина, Э.П. Медянцева, Е.В. Халдеева, Н.И. Глушко, Г.К. Будников // Тез. докл. Всероссийской конференции “Актуальные проблемы аналитической химии”. – Москва, 11-15 марта 2002. - Т.2, О50. - С.164.

2. Сафина Г.Р. Амперометрический иммуноферментный сенсор на основе платиновых планарных электродов для определения бактериального антигена *Streptococcus pyogenes* / Г.Р. Сафина, О.Г. Фомина, Э.П. Медянцева, Г.К. Будников // Тез. докл. IV Всероссийской конференции молодых ученых “Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии”. – Саратов, 23-25 июня 2003. - С. 190.

3. Сафина Г.Р. Определение бактериального антигена *Klebsiella pneumoniae* с помощью амперометрического иммуноферментного сенсора / Г.Р. Сафина, Э.П. Медянцева, О.Н. Ванягина, Н.И. Глушко, Г.К. Будников // Материалы III междисциплинарной конференции с международным участием “Новые биокибернетические и телемедицинские технологии 21 века для диагностики и лечения заболеваний человека” (НБИТТ-21). – Петрозаводск, 23-25 июня 2003. - С.55.

4. Сафина Г.Р. Перспективы использования амперометрического иммуноферментного сенсора для определения стрептококка / Г.Р. Сафина, Е.В. Халдеева, Э.П. Медянцева, Г.К.

Будников // Тез. докл. Международного форума “Аналитика и аналитики”. – Воронеж, 2-6 июня 2003. - Т.1. - С. 247.

5. Сафина Г.Р. Иммуноферментный сенсор для определения стафилококка / Г.Р. Сафина, Е.В. Халдеева, Э.П. Медянцева, Г.К. Будников // Тез. докл. XVII Менделеевского конгресса по общей и прикладной химии. - Казань, 21-26 сентября 2003. - Т.4. - С. 296.

6. Сафина Г.Р. Амперометрические иммуноферментные сенсоры для определения некоторых антигенов / Г.Р. Сафина, Е.В. Халдеева, Э.П. Медянцева, Г.К. Будников // Тез. докл. V Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды с международным участием “Экоаналитика-2003”. - С.-Петербург, 6-10 октября 2003. - С. 326.

7. Сафина Г.Р. Возможности амперометрических иммуноферментных сенсоров для определения некоторых патогенов / Г.Р. Сафина, Э.П. Медянцева, О.Н. Ванягина, Н.И. Глушко, Г.К. Будников // Тез. докл. IV Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов Научно-образовательного центра Казанского государственного университета “Материалы и технологии XXI века”. – Казань, 16-17 марта 2004 г. - С. 72.

8. Сафина Г.Р. Амперометрические иммуноферментные сенсоры для диагностики некоторых инфекционных заболеваний / Г.Р. Сафина, Э.П. Медянцева, О.Г. Фомина, Н.И. Глушко, Г.К. Будников // Тез. докл. VI Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа “ЭМА-2004” с международным участием - Уфа, 23-27 мая 2004 г. - С. 41.

9. Кутырева М.П. Вольтамперометрическое определение констант связывания иммунных комплексов / М.П. Кутырева, Э.П. Медянцева, Е.В. Халдеева, Г.Р. Сафина, Н.И. Ильичева, Г.К. Будников // Тез. докл. VI Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа “ЭМА-2004” с международным участием. – Уфа, 23-27 мая 2004 г. - С. 196.

10. Медянцева Э.П. Амперометрические иммуносенсоры для экспресс-диагностики некоторых заболеваний / Э.П. Медянцева, Г.Р. Сафина, Г.К. Будников // Материалы II Всероссийского симпозиума “Тест-методы химического анализа”. – Саратов, 21-25 июня 2004. - С. 11.

11. Safina G.R. Amperometric enzyme immunosensor for the determination of various pathogenic microorganisms / G.R. Safina, E.P. Medyantseva, O.G. Fomina, O.N. Vanyagina, N.I. Glushko, H.C. Budnikov // Book of Abstracts of The 6th Workshop on Biosensors and Bioanalytical μ -Techniques in Environmental and Clinical Analysis. - Rome, 8-12 October 2004. - P. 95.

12. Сафина Г.Р. Возможности определения различных бактериальных антигенов при их совместном присутствии с помощью иммуноферментных сенсоров на основе многоканальных screen-printed электродов / Г.Р. Сафина, О.Н. Базарнова, Э.П. Медянцева, Г.К. Будников // Тез. докл. V Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов Научно-образовательного центра Казанского государственного университета “Материалы и технологии XXI века”. – Казань, 26-27 апреля, 2005. - С. 93.

13. Хаертдинова Л.А. Определение циркулирующего антигена золотистого стафилококка у детей при атопическом дерматите / Л.А. Хаертдинова, Г.Р. Сафина, Е.В. Халдеева // Тез.

докл. X Всероссийской научно-практической конференции “Молодые ученые в медицине”. – Казань, 26-27 апреля 2005. – С. 148.

14. Сафина Г.Р. Перспективы амперометрических иммуноферментных сенсоров на основе печатных электродов в многокомпонентном анализе биологических жидкостей / Г.Р. Сафина, Э.П. Медянцева, О.Н. Базарнова, Н.И. Глушко, Г.К. Будников // Тез. докл. Всероссийской научной конференции с международным участием “Электроаналитика-2005”. – Екатеринбург, 23-27 мая 2005. – С. 121.

15. Медянцева Э.П. Амперометрический мультиэлектродный иммуноферментный сенсор для определения бактериальных антигенов при их совместном присутствии / Э.П. Медянцева, Г.Р. Сафина, О.Н. Базарнова, Н.И. Глушко, Г.К. Будников // Тез. докл. 2 Всероссийской конференции “Аналитические приборы”. - С.-Петербург, 27 июня – 1 июля 2005. – 2-С20. – С. 189-190.

16. Safina G.R. An amperometric enzyme mmunosensor based on screen-printed electrode for the determnation of *Klebsiella pneumoniae* bacterial antigen / G.R. Safina, E.P. Medyantseva, O.N. Bazarnova, N.I. Glushko, H.C. Budnikov // Book of Abstracts of International Conference “Analytical Chemistry and Chemical Analysis (AC&CA-05)”. – Kiev, 12-18 September 2005. – P. 239.

17. Медянцева Э.П. Использование иммуноэкстракционного концентрирования в анализе биологически активных веществ / Э.П. Медянцева, Г.Р. Сафина, Н.И. Муртазина, О.Н. Базарнова, Н.И. Глушко, Г.К. Будников // Материалы II Международного симпозиума “Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии”. – Краснодар, 25-30 сентября 2005 г. – С. 212-214.

Соискатель

Сафина Г.Р.