

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ STAPHYLOCOCCUS AUREUS В ВОДНЫХ
СРЕДАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕЗМЕТОЧНОГО
ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ИММУНОСЕНСОРА С КОВАЛЕНТНО
ИММОБИЛИЗОВАННЫМ РЕЦЕПТОРНЫМ СЛОЕМ**

Зайдуллина Р.А., Свалова Т.С., Малышева Н.Н., Матерн А.И.

УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия
zaidullinaregina@yandex.ru, t.s.svalova@urfu.ru

Аннотация. Целью данной работы является определение бактерий *Staphylococcus aureus* в водных средах с использованием безметочного вольтамперометрического иммуносенсора. Рецепторный слой – специфичные антитела, иммобилизованные на поверхности электрода методом карбодиимидной сшивки. В статье предложено селективное и экспрессное определение золотистого стафилококка в модельных водных суспензиях.

Ключевые слова: безметочный электрохимический иммуносенсор, вольтамперометрическое определение, ковалентная иммобилизация антител, *S. aureus*.

**DETERMINATION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN AQUEOUS MEDIA
USING A LABEL-FREE VOLTAMMETRIC IMMUNOSENSOR WITH A
COVALENTLY IMMOBILIZED RECEPTOR LAYER**

Zaidullina R., Svalova T., Malysheva N., Matern A.

Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia

Abstract. This paper aims to detect *Staphylococcus aureus* bacteria in aqueous media with using the label-free voltammetric immunosensor. The receptor layer – specific antibodies were immobilized by using the chemistry of carbodiimide crosslinking. We proposed a selective and expressive determination of *Staphylococcus aureus* in model water suspensions.

Key words: label-free electrochemical immunosensor, antibody covalent immobilization, voltammetry detection, *S. aureus*.

1. Введение

Большое количество патогенных бактерий, вызывающих пищевые инфекции у человека, находятся в окружающей его среде: воде, почве и еде [4].

Одним из таких патогенов является *S. aureus*, который может вызвать широкий спектр инфекций, от поверхностных кожных инфекций до тяжелых и потенциально смертельных инвазивных заболеваний [5]. Поэтому его обнаружение является ключевым элементом снижения рисков, связанных со здоровьем населения и безопасностью пищевых продуктов [2,9]. *S. aureus* обладает способностью продуцировать ряд токсинов, способных вызывать повреждение биологических мембран, взаимодействуя непосредственно с хозяином, что приводит к гибели клетки [4]. Бергдолл показал, что 1 мкг (или менее) энтеротоксина А может вызывать симптомы интоксикации у людей [8]. Очевидно, что в случае пищевого отравления эффективное обнаружение *S. aureus* важно для правильного лечения, но еще важнее предотвратить возникновение заболевания [10]. Поскольку даже обычная практика приготовления пищи, связанная с мытьем вареного картофеля, макарон, риса и т.д., может легко привести к инфицированию этих продуктов питания. Поэтому немаловажным является своевременное обнаружение бактерий в источниках воды, используемых для бытовых нужд (реки, озера, водохранилища) [6].

Для обнаружения *S. aureus* традиционные методы культивирования использовались в течение десятилетий, однако их использование имеет свои недостатки, поскольку для получения результатов требуется 3–5 дней. Следовательно, в последние годы были разработаны методы быстрого обнаружения, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР), иммуноферментный анализ (ИФА) и методы молекулярной биологии на основе нуклеиновых кислот. Несмотря на сокращенное время анализа, данные методы отличаются трудозатратностью, дороговизной и невозможностью проведения опытов на месте, т.к. требуют обширной подготовки образцов. [9].

Среди различных биосенсоров большое внимание уделяется электрохимическим иммуносенсорам, поскольку они сочетают свойственную иммунореакции специфичность с очень высокой чувствительностью различных детекторов. Основными преимуществами безметочных электрохимических иммуносенсоров является простота конструкции, меньшее количество стадий иммуноанализа и, следовательно, увеличение экспрессности анализа. Также данные иммуносенсоры могут быть легко миниатюризированы и использованы в экспресс-диагностике. Ранее в наших работах была показана эффективность иммобилизация антител путем предварительной модификации поверхности электрода и последующей ковалентной иммобилизацией антител [11,12]

Таким образом, целью данной работы стало определение бактерий *S. aureus* в водной среде, с использованием безметочного

вольтамперометрического иммуносенсора с ковалентно иммобилизованным рецепторным слоем.

2. Методы

2.1. Реактивы и Оборудование

Все реактивы были предоставлены фирмой Sigma-Aldrich: 3-аминобензойная кислота (м-АБК), хлорид калия, N-гидроксисукцинимид (NHS), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC), антитела против *Staphylococcus aureus* (1 мг/мл), бактерии *Staphylococcus aureus*, фосфатные буферные растворы pH 5,0 – 7,0 (K₂HPO₄/KH₂PO₄, C=0,067 М, приготовленные по стандартной методике). Медиаторной системой для определения электрических характеристик служил раствор состава: 10·10⁻³М K₃[Fe(CN)₆], 10·10⁻³ М K₄[Fe(CN)₆]. Процедуру проводили с использованием потенциостата/гальваностата Autolab PGSTAT204. В качестве рабочего электрода использовали платиновый планарный (Metrohm, Швейцария), в качестве вспомогательного и электрода сравнения – стеклоуглеродный стержень и хлоридсеребряный электрод соответственно. Для приготовления растворов использовали деионизированную воду, полученную на комбинированной мембранной установке серии ДВС-М/1НА(18)-N («Медиана-Фильтр», г. Москва).

2.2. Карбодиимидная Иммобилизация Антител и Формирование Иммунокомплекса

Карбоксильные группы электроосажденного слоя был активированы карбодиимидной смесью EDC/NHS следующим образом: модифицированный Pt-электрод инкубировали в растворе 100 мМ NHS и 400 мМ EDC в PBS (pH=5.0) в течение 30 минут. После этого промывали буферной смесью PBS (pH=5.0) рабочую поверхность для удаления промежуточных продуктов и непрореагировавших компонентов реакции.

Следующий этап – инкубация с 50 мкл суспензии антител к *S. aureus* (концентрация 1 г/л) при комнатной температуре в течение 30 минут. Избыток адсорбированного реагента повторно удаляли с электрода промывкой раствором PBS (pH=7,4). Образование иммунокомплекса происходило путем погружения электрода с ковалентно иммобилизованным слоем антител в суспензию *S. aureus* при комнатной температуре. Реакция между анти- *S. aureus* и *S. aureus* занимает около 25 минут в PBS (pH=6,5). Блокирование непрореагировавших карбоксильных групп проводили путем инкубации электрода в 0,25% растворе бычьего сывороточного альбумина.

2.3. Приготовление стандартных суспензий бактерий *S. aureus*

Ночную культуру *Staphylococcus aureus* штамма В-1266 разводили стерильным физиологическим раствором (рН 7 – 7.2) до 10^5 - 10^6 КОЕ/мл. Далее из полученной суспензии делали пять последовательных десятикратных разведений, аликвоты (10 мкл) высевали на агаризованную среду для определения титра клеток в полученных разведениях.

2.4. Детектирование Электрохимического Сигнала

Каждый этап процедуры электрографтинга характеризовался циклической вольтамперограммой. Электрод погружали в медиаторную систему. Регистрировали ЦВА на чистом электроде и после его модификации. Циклическую вольтамперометрию проводили в диапазоне от 0 до +0,8 В при скорости сканирования 100 мВ с^{-1} .

3. Результаты

Принципиальная схема безметочного вольтамперометрического иммуносенсора для детекции *S. aureus* показана на Рис.1. Иммунокомплекс формировался путем инкубации модифицированного электрода в образце.

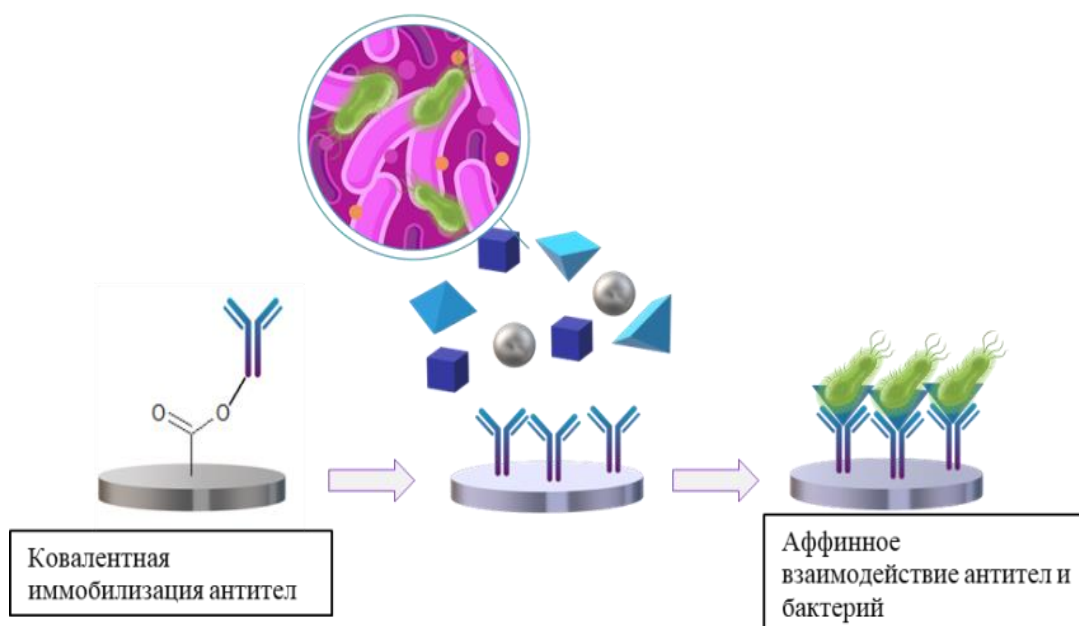


Рисунок 1. – Схема безметочного электрохимического иммуносенсора с ковалентно иммобилизованным рецепторным слоем.

Эффективность каждого этапа модификации поверхности электрода определялась разностью токов пиков окисления (Рис.2) – степенью блокирования, I^* – определенной по формуле 1.

$$\frac{I_0 - I_x}{I_0} \times 100\% = I^* \quad (1)$$

где, I_0 – ток пика окисления не модифицированного P_t электрода; I_x – ток пика окисления модифицированного P_t электрода.

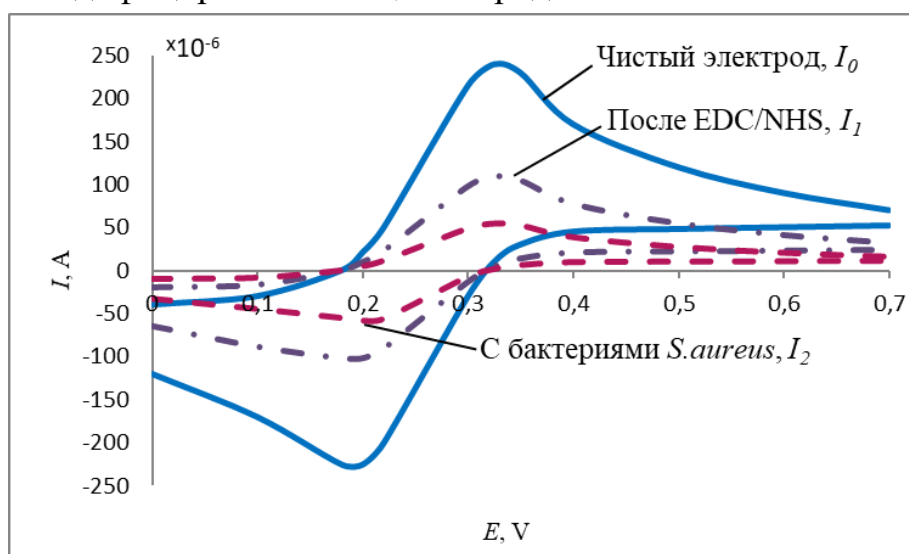


Рисунок 2. – ЦВА каждого этапа модификации электрода.

Как показано на Рис. 2, каждый этап модификации электрода сопровождается постепенным увеличением степени блокирования поверхности, что свидетельствует о формировании слоев, препятствующих свободному переносу электронов.

В выбранных условиях (см. раздел 2.2) была получена калибровочная зависимость, представленная на Рис. 3. Предел обнаружения достиг 8.5 КОЕ/мл, линейный диапазон – 10^2 - 10^5 КОЕ/мл.

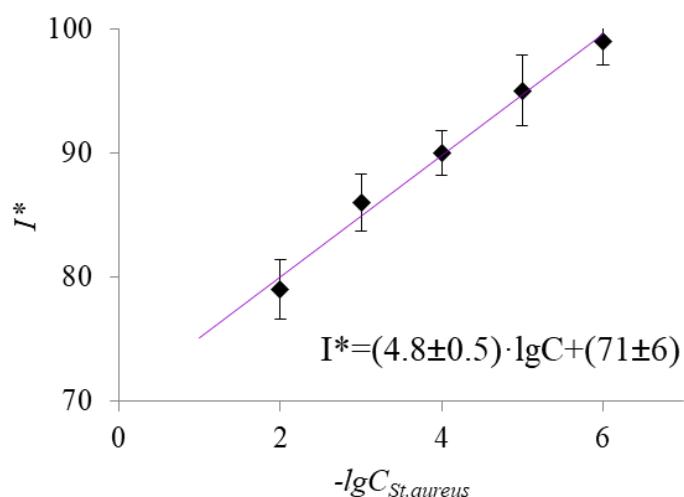


Рисунок 3. – Калибровочная зависимость степени блокирования (I^*) концентрации бактерий *S.Aureus* в модельных суспензиях ($n=5$, $R=0,95$).

Согласно литературным данным, аналитические характеристики данного иммуносенсора не уступают аналогам (Табл. 1).

Таблица 1 – Электрохимические иммуносенсоры для определения бактерий.

Бактерия/объект анализа	Структура рецепторного слоя	Предел обнаружения, линейный диапазон	Ссылка
<i>S.aureus</i> /вода (модельные суспензии)	Pt/карбоксильные группы+EDC, NHS/антитело	8.5 КОЕ/мл 10 ² -10 ⁵ КОЕ/мл	Данная работа
<i>S.aureus</i> /молоко	Углерод/ SWCNT/ антитело	15 КОЕ/мл 10-10 ⁷ КОЕ/мл	[1]
<i>S.aureus</i> /пищевые образцы	Pt/PEI-GA/антитело	10 КОЕ/мл 10 ¹ -10 ⁸ КОЕ/мл	[7]
<i>S.aureus</i> /культура	Нанопористая Al мембрана/GPMS/антитело	100 КОЕ/мл 10 ² -10 ⁷ КОЕ/мл	[13]
<i>S.aureus</i> /культура, молоко	Au/MPA/антитело	1.7 × 10 ⁵ КОЕ/мл 10 ⁵ -10 ⁷ КОЕ/мл	[3]
<i>S.aureus</i> /культура	GC/карбоксил графен/антитело	3.1 × 10 ² КОЕ/мл 10 ³ -10 ⁹ КОЕ/мл	[14]

Кроме того, мы сравнили точность вольтамперометрических иммуносенсоров с различными методами иммобилизации антител (ковалентным и капельным) с использованием модельных суспензий бактерий (Табл.2). Как показано в таблице, метод ковалентной иммобилизации имеет наилучшие аналитические характеристики в основном за счет структурированного рецепторного слоя.

Таблица 2 – Результаты определения бактерий *S. aureus* в модельных суспензиях с помощью иммуносенсоров с ковалентно и капельно иммобилизованными антителами.

Добавлено бактерий, КОЕ/мл	Определено бактерий, КОЕ/мл	
	Ковалентная иммобилизация	Капельная иммобилизация
100	112±12	68±9
1000	985±76	770±25
10 000	9 457±123	6 953±321

4. Заключение

В данной работе мы определили *S.aureus* в водных суспензиях с помощью безметочного электрохимического иммуносенсора с ковалентно иммобилизованным рецепторным слоем. Аналитические характеристики не уступают аналогам (предел обнаружения – 8.5 КОЕ/мл, линейный диапазон –

10²-10⁵ КОЕ/мл). Вольтамперометрический бесферментный иммуносенсор перспективен к применению в реальном анализе проб.

Работа выполнена при поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (грант МК – 567.2020.3)

Библиографический список

1. Bhardwaj J. и др. Development of a paper-based electrochemical immunosensor using an antibody-single walled carbon nanotubes bio-conjugate modified electrode for label-free detection of foodborne pathogens // *Sensors Actuators, B Chem.* 2017. Т. 253. С. 115–123.
2. Chaibenjawong P., Foster S.J. Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus* // *Arch. Microbiol.* 2011. Т. 193. № 2. С. 125–135.
3. Escamilla-Gómez V. и др. Immunosensor for the determination of *Staphylococcus aureus* using a tyrosinase-mercaptopropionic acid modified electrode as an amperometric transducer // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. Т. 391. № 3. С. 837–845.
4. Fleurot I. и др. Following pathogen development and gene expression in a food ecosystem: The case of a *Staphylococcus aureus* isolate in cheese // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. Т. 80. № 16. С. 5106–5115.
5. Kadariya J., Smith T.C., Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health // *Biomed Res. Int.* 2014. Т. 2014.
6. LeChevallier M.W., Seidler R.J. *Staphylococcus aureus* in rural drinking water // *Appl. Environ. Microbiol.* 1980. Т. 39. № 4. С. 739–742.
7. Majumdar T., Chakraborty R., Raychaudhuri U. Development of PEI-GA modified antibody based sensor for the detection of *S. aureus* in food samples // *Food Biosci.* 2013. Т. 4. С. 38–45.
8. Merlin S. Bergdoll. *Staphylococcus aureus* // *Anal. Chem.* 1991. Т. 74. № 4. С. 706–710.
9. Rubab M. и др. Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food // *Biosens. Bioelectron.* 2018. Т. 105. С. 49–57.
10. Suaifan G.A.R.Y., Alhogail S., Zourob M. Rapid and low-cost biosensor for the detection of *Staphylococcus aureus* // *Biosens. Bioelectron.* 2017. Т. 90. С. 230–237.
11. Svalova T.S. и др. Modification of Gold Electrode via Electrografting of the in situ Generated 3-Carboxy-1,2,4-triazoldiazonium Salt for Label-free Determination of Carcinoembryonic Antigen // *Electroanalysis.* 2019. С. 1–9.

12. Svalova T.S. и др. A label-free impedimetric immunosensor based on covalent immobilization of anti-E. Coli antibody via a copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. Т. 412. № 21. С. 5077–5087.

13. Tan F. и др. A PDMS microfluidic impedance immunosensor for E. coli O157:H7 and Staphylococcus aureus detection via antibody-immobilized nanoporous membrane // *Sensors Actuators, B Chem.* 2011. Т. 159. № 1. С. 328–335.

14. Yue H. и др. A facile label-free electrochemiluminescent biosensor for specific detection of Staphylococcus aureus utilizing the binding between immunoglobulin G and protein A // *Talanta.* 2016. Т. 153. С. 401–406.