

## МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И СТАНДАРТИЗАЦИИ

УДК 543.866

©Коллектив авторов

### АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ СЕНСОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО АНТИГЕНА *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Г.Р. Сафина<sup>1</sup>, Э.П. Медянцева<sup>1</sup>, О.Н. Ванягина<sup>1</sup>, Н.И. Глушко<sup>2</sup>, Г.К. Будников<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Химический факультет Казанского государственного университета, 420008  
Казань, ул. Кремлевская, 18, Казанский государственный университет,  
эл. почта: Elvina.Medyantseva@ksu.ru; тел : (8432) 315-491; факс: (8432) 315-416  
<sup>2</sup>Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии

Разработан амперометрический иммуноферментный сенсор для определения бактериального антигена *Klebsiella pneumoniae*. Биочувствительная часть аналитического устройства состоит из совместно иммобилизованных холинэстеразы и антител против *Klebsiella pneumoniae*, включенных в различных разведениях в пленку из нитрата целлюлозы. Подобраны условия для функционирования иммуносенсора (соотношение фермента и антител, концентрация субстрата, рН рабочего буферного раствора). Наилучшими аналитическими характеристиками обладал сенсор с антителами в разведении 1:20. Диапазон его рабочих концентраций составил  $1 \times 10^{-9}$  -  $1 \times 10^{-3}$  мг/мл, нижняя граница определяемых концентраций -  $5 \times 10^{-10}$  мг/мл. Оценена перекрестная реактивность используемых антител по отношению к антигенам микроорганизмов, вызывающих сходные по симптоматике заболевания. Выбраны условия многократного использования иммуносенсора с помощью регенерации его биочувствительной части. Проведена апробация разработанного аналитического устройства на сыворотках крови пациентов, страдающих заболеваниями мочеполового тракта.

**Ключевые слова:** амперометрический иммуноферментный сенсор, антиген, антитела, *Klebsiella pneumoniae*

**ВВЕДЕНИЕ.** В последние годы возрос интерес исследователей к патогенным бактериям рода *Klebsiella*, относящихся к семейству *Enterobacteriaceae* (энтеробактерий) и вызывающих такие серьезные заболевания, как инфекции мочевыводящих путей, поражения мозговых оболочек, суставов и позвоночника, глаз, а также бактериемии и септикопиемии, пневмонии, бронхиты и бронхопневмонии [1]. Практически единственными способами лабораторной диагностики данного микроорганизма являются гистологическая идентификация очагов поражения и бактериологический анализ. Недостатками последнего являются его длительность и зависимость от заданных условий - питательной среды, квалифицированности персонала [2].

Альтернативой бактериологическому анализу является количественное определение микроорганизмов с помощью различных аналитических устройств.

## СЕНСОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНА *K. PNEUMONIAE*

Описан метод прямого определения бактерии *Escherichia coli*, основанный на ее способности к флуоресценции, с использованием серебряных мембранных фильтров, с помощью которого можно определять эти микроорганизмы при концентрации  $1,7 \times 10^5$  клеток/мл и времени анализа 15 минут [3]. Чувствительный и специфический метод был разработан для определения микроорганизмов *Salmonella newport* и *E. coli*, в котором была использована способность фага разрушать бактериальные клетки, которые затем определялись с помощью биолюминесценции [4]. Пропорциональная зависимость световой эмиссии от количества бактериальных клеток в образце наблюдалась на протяжении трех порядков; удавалось определить  $10^3$  микроорганизмов в 0,1 мл образца.

Чувствительное и селективное определение энтеробактерий возможно с помощью оптических [5, 6], пьезоэлектрических [7, 8] и электрохимических [9-12] сенсоров. Использование принципов иммунохимии позволяет разработать экспрессные, чувствительные и селективные способы определения патогенных микроорганизмов [13, 14]. Иммуносенсоры на основе пьезоэлектрических кристаллов были разработаны для определения энтеробактерий в питьевой воде с помощью антител соответствующих антигенов *E. coli* K12. Воспроизводимость измерений составляла 30% при концентрации  $10^6$  клеток/мл [2]. Разработан метод использования флуоресцентных антител, инкубированных с цианодитолилтетразолиум хлоридом (СТС), для определения дыхательной активности бактерий. Данным способом возможно определение микроорганизмов *E. coli* O157:H7 в области концентраций  $10^5$ - $10^9$  клеток/мл, при времени анализа 4 часа. Аналогично можно определить бактерии *S. typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*. Разработан способ идентификации микроорганизмов в моче с помощью электрода из пиролизного графита и нитроцеллюлозного фильтра для захвата бактерий. Высота пика тока на циклической вольтамперограмме увеличивалась с возрастанием начальной концентрации микроорганизмов *E. coli* в моче [15]. С помощью вышеописанной системы было определено, что исследуемый образец содержит  $5 \times 10^2$ - $5 \times 10^5$  бактериальных клеток в мл.

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что в настоящее время практически не существует методов количественного определения непосредственно микроорганизма *Klebsiella pneumoniae*, а имеющиеся данные относятся лишь к близкородственным бактериям. Вследствие этого, представляла интерес разработка амперометрического иммуноферментного сенсора для определения антигена данной бактерии и его использование для определения возбудителя в сыворотке крови пациентов, страдающих заболеваниями мочеполовой системы.

**МЕТОДИКА.** Оборудование. Экспериментальная часть работы выполнена на потенциостате ПИ 50-1.1., совмещенном с компьютером IBM PC-286, с ячейкой, термостатированной при  $(25 \pm 0,2)^\circ\text{C}$  с помощью термостата ТС-50.

Рабочим электродом служил иммуноферментный сенсор на основе совместно иммобилизованных холинэстеразы (ИХЭ) и антител (ИАт) против антигена (Аг) *Klebsiella pneumoniae*. В качестве трансдьюсера использовали стационарный ртутно-пленочный электрод с серебряной подложкой, представляющей собой серебряную проволоку ( $d=0,5$  мм), впаянную или вставленную в стекло с помощью эпоксидного клея марки ЭПФ. Торцы электрода шлифовали до зеркальной поверхности и для получения амальгамы погружали на 2 мин в металлическую ртуть. Электродом сравнения служил насыщенный каломельный электрод. Кислород из раствора удаляли током электролитически генерированного водорода.

**Реагенты.** В работе использовали антиген *Klebsiella pneumoniae* и антитела против него, полученные в лаборатории по разработке бактериальных аллергенов Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии. Методика получения антигенов включает в себя механическое разрушение микробных клеток (дезинтеграцию), специфическую экстракцию с помощью боратного буферного

раствора с рН 7,2-7,4, отделение неразрушившихся компонентов клеточной стенки, фильтрацию, стандартизацию по белковому азоту. Аг не токсичны, не содержат низкомолекулярных компонентов. Они используются для получения коммерческих препаратов из бактериальных клеток и применяются для тестов *in vivo* и *in vitro*. Поликлональные антитела получены методом ступенчатой иммунизации. В иммунохимии традиционно используется понятие разведения Ат, которое далее применяется в работе.

Концентрации водных растворов Ат и Аг были определены спектрофотометрически при температуре 25°C, при  $\lambda = 280$  нм и  $\lambda = 260$  нм, соответственно, с помощью прибора EZ-310 компании "Perkin Elmer" (США). Для *Klebsiella pneumoniae* исходная концентрация Ат была 0,989 мг/мл, концентрация Аг - 1,140 мг/мл.

Раствор перекристаллизованного бутирилтиохолина йодида (БТХИ) ("Fluka", Швейцария), готовили по точной навеске в боратном буферном растворе и использовали в течение не более трех часов. В работе использовали бутирилхолинэстеразу (активности 29 АЕ/мг) производства НПО "Биомед" (Россия). В качестве матрицы для иммобилизации биологически активных соединений использовали нитроцеллюлозу типа коллоксилин.

Фосфатный буферный раствор (рН 8,0±0,05), готовили из гидрофосфата и дигидрофосфата калия (ЗАО "Лаверна", Россия) марки "ч" и "чда" соответственно.

Органические растворители толуол, бутилацетат, гексан марок "хч" и "ч" и 25%-ный раствор глутарового альдегида были получены от фирмы "ICN Biomedicals, Inc." (США).

Для получения биочувствительной части ИФС проводили совместную иммобилизацию холинэстеразы и антител против соответствующих антигенов в различных разведениях в матрицу из нитроцеллюлозы [16]. Мембрану перед использованием в процессе иммуноферментного анализа предварительно помещали при комнатной температуре на 30 мин в 1%-ный водный раствор бычьего сывороточного альбумина для предотвращения неспецифического связывания и блокирования активных центров глутарового альдегида. В работе использовали пленку площадью  $7,95 \pm 0,05$  см<sup>2</sup>.

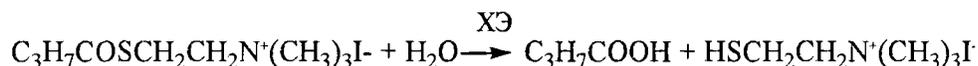
Биочувствительную часть закрепляли на поверхности корпуса электрода с помощью прижимных колец. Такая конструкция ИФС позволяет легко заменить биочувствительную часть, потерявшую каталитическую активность, на новую, что делает ИФС удобным в работе [17].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Антиген изменяет активность иммобилизованной холинэстеразы (ИХЭ) в зависимости от состава и рН буферных растворов. Вследствие того, что в некоторых буферных средах (боратный буферный раствор, рН=9,05 ± 0,05) антиген оказывает неспецифическое действие на активность иммобилизованной холинэстеразы, и величина эффекта пропорциональна концентрации вводимого раствора антигена, возможно проведение непосредственного определения патогена в широком диапазоне концентраций ( $1 \times 10^{-8}$  -  $1 \times 10^1$  мг/мл). Однако в этом случае трудно ожидать селективности определения. При использовании фосфатного буферного раствора с рН 8,0 ± 0,05 не наблюдается неспецифического действия антигена на активность иммобилизованной холинэстеразы, что дало возможность совместной иммобилизации антител и холинэстеразы для определения *Klebsiella pneumoniae*. Вследствие этого, именно данное значение рН и было выбрано для последующих определений.

Можно предположить, что влияние рН в основном проявляется в изменении конформации фермента за счет протонирования или депротонирования групп, входящих в состав активного центра, что приводит к изменению способности фермента связываться с субстратом [18].

Холинэстераза катализирует реакцию гидролиза БТХИ, который является для нее специфическим субстратом, и позволяет изучать свойства как нативной, так и иммобилизованной ХЭ

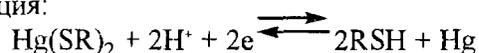
## СЕНСОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНА *K. PNEUMONIAE*



Продукт реакции – тиол, содержащий SH-группу, в соответствующих условиях электрохимически активен.

На вольтамперограмме с быстрым изменением потенциала раствора БТХИ на стационарном ртутно-пленочном электроде с серебряной подложкой наблюдается пара катодно-анодных пиков при потенциале -0,55 В [19], относящиеся к обратимому восстановлению меркаптида ртути, который может образовываться в этих условиях в результате взаимодействия тиола с материалом электрода ртутью [20].

В основе получения аналитического сигнала лежит следующая электрохимическая реакция:



В присутствии ХЭ на вольтамперограмме буферного раствора БТХИ наблюдаются пики при тех же потенциалах, что и в случае одного БТХИ. Величина тока при потенциале  $E = -0,55$  В значительно превосходит величину тока при восстановлении продукта спонтанного гидролиза БТХИ в отсутствие ХЭ. Пик имеет адсорбционную природу. На это указывает значение отношения изменения тока к изменению скорости наложения потенциала ( $\Delta i/\Delta V$ ), равное 0,8, зависимость высоты пика от начального потенциала и треугольная форма пика. На обратимость процесса указывает приблизительно одинаковая высота анодного и катодного пиков для небольших концентраций БТХИ и разность потенциалов, не превышающая 60 мВ.

Ток пика пропорционален концентрации продукта ферментативного гидролиза БТХИ, а количество образовавшегося тиола в единицу времени зависит и от каталитической активности ИХЭ [19].

Иммобилизованные антитела прочно удерживаются матрицей, на что указывает отсутствие каталитических токов водорода, которые наблюдаются в растворах, содержащих  $\text{Co}(\text{II})$  и соединения белковой природы [21].

При введении в исследуемый раствор  $\text{Ag}$  в присутствии иммобилизованных антител наблюдалось изменение высоты аналитического сигнала. Можно предположить, что происходит связывание  $\text{Ag}$  со специфичными  $\text{At}$  с образованием иммунного комплекса  $[\text{Ag}-\text{At}]$ . Образующийся на поверхности биочувствительной части ИФС иммунный комплекс и выступает в роли фактора ИХЭ. В изученных нами условиях иммунный комплекс оказывал активирующее действие на активность ИХЭ, что отражалось в увеличении величины аналитического сигнала. В определенных интервалах концентраций наблюдается линейная зависимость между величиной  $(I_p/I_0) \times 100\%$  (где  $I_p$  – ток пика в присутствии  $\text{Ag}$ ,  $I_0$  – ток пика холостого опыта в мкА) и отрицательным значением логарифма концентрации исследуемого раствора  $\text{Ag}$  *Klebsiella pneumoniae*. Градуировочная зависимость связывает безразмерные величины (отношение токов и логарифм концентраций) и позволяет легче интерпретировать наблюдаемые эффекты [22]. Аналитические характеристики разработанных иммуноферментных сенсоров представлены в таблице 1.

Основной причиной активирующего действия иммунного комплекса на активность ИХЭ, возможно, является преобладание электростатического взаимодействия молекул субстрата БТХИ с компонентами биоспецифического взаимодействия. Это может быть объяснено тем, что в условиях эксперимента ( $\text{pH} = 8,05$ )  $\text{Ag}$  *Klebsiella pneumoniae* имеет общий отрицательный заряд, перекрывающий общие заряды фермента и  $\text{At}$  при образовании иммунного комплекса, а субстрат имеет положительно заряженную катионную головку. Это может вызвать участие дополнительных молекул субстрата в ферментативном процессе.

Использование разведения антител 1:20 дает возможность проводить определение бактериального антигена в более широком диапазоне концентраций и позволяет достичь меньшего значения нижней границы определяемых

Таблица 1. Аналитические характеристики амперометрических иммуноферментных сенсоров для определения антигена *Klebsiella pneumoniae*

Разведение Ат	Интервал рабочих концентраций мг/мл	Нижняя граница определяемых концентраций мг/мл	Уравнение градуировочного графика $(I_p/I_0) \cdot 100\% = a(-\lg c) + b, r^2$		
			a	b	r
1:10	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-8}$	$-(12,5 \pm 0,5)$	$191 \pm 3$	0,9982
1:20	$1 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-10}$	$-(6,7 \pm 0,3)$	$162 \pm 2$	0,9958
1:40	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-8}$	$-(0,36 \pm 0,01)$	$19,7 \pm 0,1$	0,9992

Примечание: a – тангенс угла наклона градуировочной кривой (коэффициент чувствительности), b – отсечение на оси ординат, r – коэффициент корреляции

концентраций. Это может быть связано с реализацией более удобного подхода субстрата к активным центрам фермента, вследствие чего именно это разведение Ат было выбрано для проведения иммуноопределений

Правильность результатов подтверждена методом "введено-найдено" (табл. 2).

В настоящей работе были исследованы возможности перекрестной реактивности Ат против *Klebsiella pneumoniae* к антигенам *Escherichia coli* (кишечной палочки), *Streptococcus pneumoniae* (пневмококка) и *Staphylococcus aureus* (золотистого стафилококка). Выбор антигенов был связан с тем, что, во-первых, представляло интерес оценить возможность взаимодействия используемых Ат с близкородственным антигеном (*Escherichia coli*), вследствие того, что кишечная палочка, также как и *Klebsiella*, является грамотрицательной палочкой и относится к микроорганизмам семейства энтеробактерий. Во-вторых, пневмококк и золотистый стафилококк, хотя и принадлежат к другому виду бактерий, могут являться причиной заболеваний дыхательных путей, в частности, пневмонии, сходных по симптоматике с болезнями, вызываемыми *Klebsiella pneumoniae*

Таблица 2. Определение Аг *Klebsiella pneumoniae* с помощью амперометрических иммуноферментных сенсоров

Разведение Ат	Концентрация Аг, мг/мл		$S_p \times 10^2$
	Введено	Найдено	
1:10	$1 \times 10^{-4}$	$(1,1 \pm 0,1)^{-4}$	5,2
	$5 \times 10^{-5}$	$(4,7 \pm 0,4)^{-5}$	6,5
	$5 \times 10^{-6}$	$(5,2 \pm 0,3)^{-6}$	8,0
1:20	$5 \times 10^{-5}$	$(4,8 \pm 0,2)^{-5}$	6,2
	$5 \times 10^{-7}$	$(5,3 \pm 0,4)^{-7}$	7,5
	$5 \times 10^{-9}$	$(4,9 \pm 0,5)^{-9}$	10,2
1:40	$5 \times 10^{-5}$	$(4,7 \pm 0,3)^{-5}$	6,4
	$5 \times 10^{-6}$	$(5,5 \pm 0,4)^{-6}$	7,3
	$5 \times 10^{-7}$	$(4,8 \pm 0,4)^{-7}$	8,3

Примечание: приведены средние величины ( $\pm$  ошибка средней) пяти измерений.

Оказалось, что введение в раствор перечисленных антигенов не оказывает влияния на каталитическую активность ИХЭ даже при концентрациях, в 10-1000 раз превосходящих концентрацию Аг *Klebsiella pneumoniae*, при которой наблюдается максимальный активирующий эффект. Таким образом, установлено, что используемые антитела не обладают перекрестной реактивностью ни к одному из исследуемых антигенов.

Для изучения возможности многократного использования ИФС была предпринята попытка подобрать условия регенерации его биочувствительной части. После однократного использования ИФС обрабатывали растворами 3 М и 5 М мочевины в течение 10 мин, способными разрушить иммунный комплекс, и не оказывающими ингибирующего действия на иммобилизованную ХЭ [23].

### СЕНСОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНА *K. PNEUMONIAE*

Некоторые из полученных результатов приведены в таблице 3. Достаточно простая процедура регенерации биочувствительной части сенсора позволяет избежать дополнительных затрат реагентов для изготовления новых биосенсоров и тем самым снизить стоимость анализа и сделать его более экспрессным.

Диагностика клебсиеллеза часто затруднена из-за наличия близкородственных возбудителей, например, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, способных вызывать заболевания, характеризующиеся проявлением похожих симптомов. Традиционные методы бактериальной диагностики достаточно длительны. Кроме этого, трудность в проведении бактериологического анализа состоит в том, что с его помощью удается выделить смешанную микрофлору, которая может быть представлена такими распространенными возбудителями, как *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. В связи с этим достаточно трудно точно определить ведущий этиологический агент заболевания. Учитывая трудность диагностики заболеваний, вызываемых *Klebsiella pneumoniae*, представляло интерес апробировать предлагаемый вариант иммунохимического анализа с помощью разработанного для выявления возбудителя в сыворотках крови больных пиелонефритом

Таблица 3. Результаты регенерации биочувствительной части ИФС с помощью растворов

Концентрация $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ , моль/л	Время инкубации, мин	Наблюдаемый эффект, %	Количество повторного использования
3,0	10	86	3
5,0	10	100	5

**Выполнение определения.** В мерную колбу на 5 мл вводили 0,5 мл стандартного раствора БТХИ концентрацией  $2 \times 10^{-2}$  моль/л, затем 0,05 мл сыворотки больного, доводили до метки боратным буферным раствором с  $\text{pH} = 8,05$ . Полученный раствор переносили в электрохимическую ячейку и помещали в него ИФС. Инкубировали при перемешивании в течение 15 мин. Кислород удаляли током электролитически генерированного водорода. Снимали вольтамперограмму в интервале потенциалов от  $-0,1$  до  $-0,9$  В ( $V = 1$  В/с;  $E_0 = -0,1$  В). Измеряли высоту катодного пика при потенциале  $E = -0,55$  В. Для проведения контрольного опыта в качестве стандарта использовали смесь сывороток крови 20 здоровых людей. Сыворотки крови хранили в замороженном состоянии при температуре  $-18^\circ\text{C}$ .

Корреляция результатов медицинского осмотра и определений с помощью разработанного ИФС представлены в таблице 4.

Обнаружение Аг свидетельствует о том, что именно микроорганизм *Klebsiella pneumoniae* является главным этиологическим фактором возникновения пиелонефрита, так как наличие антигена говорит об инвазии бактерии в кровь и начале воспалительного процесса в организме. Как было обнаружено ранее, используемые антитела не обладают перекрестной реактивностью к антигенам бактерий, которые способны вызывать воспалительные заболевания почек. Это подтверждает то, что причиной заболевания является именно *Klebsiella pneumoniae*. Результаты определений, полученных с помощью ИФС, показывают, что концентрация антигена в сыворотке крови пациентов с тяжелой формой заболевания в 500-1000 раз превышает количество патогена в организме больных со средней степенью заболевания, что хорошо коррелирует с результатами медицинского осмотра (табл. 4, п. 1-5).

Отрицательные результаты, свидетельствующие об отсутствии *Klebsiella*, говорят о том, что основным этиологическим агентом заболевания, возможно, является кишечная палочка, которая чаще других возбудителей является причиной возникновения патологий, характеризующихся проявлением подобных симптомов (табл. 4, п. 6-12).

Таблица 4. Сравнительная оценка бактериальных исследований и аналитических определений антигена *Klebsiella pneumoniae* с помощью ИФС.

№	Данные медицинского осмотра	Определения с помощью ИФС	
	Интенсивность заболевания	Концентрация Аг, мг/мл	$S_r \cdot 10^2$
1	xxx	$(4,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	4,7
2	xxx	$(9,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	3,2
3	xx	$(3,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-7}$	8,3
4	xx	$(1,8 \pm 0,1) \cdot 10^{-7}$	5,6
5	xx	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^{-7}$	6,7
6	xx	-	
7	xx	-	
8	xx	-	
9	xx	-	
10		-	
11		-	
12		-	

Примечание: xxx - тяжелое течение заболевания, xx - средняя тяжесть заболевания, - - отсутствие определяемого возбудителя.

Преимущество использования ИФС состоит в том, что данный вариант анализа позволяет проводить диагностику заболевания на ранних стадиях и в тех случаях, когда бактериологический анализ не способен точно выявить вид микроорганизма. Предлагаемый вариант ИФА с помощью ИФС экспрессен (время единичного определения не превышает 30 минут), отличается простотой, чувствительностью, селективностью, т.е. позволяет проводить дифференцированную диагностику инфекционных заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 03-03-33116).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Покровский В.И., Поддеев О.К. (1999) Медицинская микробиология. М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА.
2. Ivnitski D., Abdel-Hamid I., Atanasov P., Wilkins E. (1999) Biosens Bioelectron., **14**, 599-624.
3. Glazier S.A., Weetall H.H. (1994) J. Microbiol. Methods, **20**, 23-27.
4. Blasco R., Murphy M.J., Sanders M.F., Squirrell D.J. (1998) J. Appl. Microbiol., **84**, 661-666
5. Schneider B.H., Edwards J.G., Hartman N.F. (1997) Clin. Chem., **43**, 1757-1763.
6. Vernozy-Rozand C., Mazuy C., Ray-Gueniot S., Boutrand-Loei S., Mayrand A., Richard Y. (1997) Lett. Appl. Microbiol., **25**, 442-446.
7. Koenig B., Gratzel M. (1993) Anal. Lett., **26**, 1567-1585.
8. Pathirana S.T., Barbaree J., Chin B.A., Hartell M.G., Neely W.C., Vodyanoy V. (2000) Biosens Bioelectron., **15**, 135-141.
9. Abdel-Hamid I., Ivnitski D., Atanasov P., Wilkins E. (1999) Anal. Chim. Acta, **399** (1-2), 99-108.
10. Endo H., Fujisaki K., Ohkubo Y., Hayashi T., Watanabe E. (1996) Fisheries Sci., **62**, 235-239.

## СЕНСОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНА К. PNEUMONIAE

11. Ding T., Bilitewski U., Schmid R.D., Korz D.J., Sanders E.A. (1993) J. Biotechnol., **27**, 143-157.
12. Hitchens G.D., Hodko D., Miller D.R., Murphy O.J., Rogers T.D. (1993) Russian J. Electrochem., **29** (12), 1344-1349.
13. Nakamura N., Shigematsu A., Matsunaga T. (1991) Biosens & Bioelectron., **6** (7), 575-580.
14. Халдеева Е.В., Медянцева Э.П., Глушко Н.И., Будников Г.К. (2001) Аналитика и контроль, **5** (1), 47-53.
15. Ding T., Bilitewski U., Schmid R.D., Korz D.J., Sanders E.A. (1993) J. Biotechnol., **27**, 143-157.
16. Медянцева Э.П., Бабкина С.С., Вертлиб М.Г., Будников Г.К. (1993) Журн. аналит. химии, **48**, 1632-1638.
17. Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашов А.В., Мартинек К., Можжаев В.В., Хмельницкий Ю.Л. (1987) Иммуобилизованные ферменты. М.: Высшая школа.
18. Ленинджер А. (1985) Основы биохимии., М., Мир
19. Будников Г.К., Медянцева Э.П., Волков А.В., Аронзон С.С. (1983) Журн. аналит. химии, **38**, 1283.
20. Плембек Дж. (1985) Электрохимические методы анализа: Основы теории и применение. М.: Мир.
21. Кузнецов Б.А., Шумакович Г.П. (1975) Полярографический анализ микроколичеств белков. Методы современной биохимии. М.: Наука, с.102-106.
22. Fernandez-Sanchez C., Gonzalez-Garcia M.B., Costa-Garcia A. (2000) Biosens Bioelectron., **14**, 917-924.
23. Medyantseva E.P., Khaldeeva E.V., Glushko N.I., Budnikov H.C. (2000) Anal. Chim. Acta, **411**, 13-18.

Поступила: 24.12.2003

### AMPEROMETRIC ENZYME IMMUNOSENSOR FOR DETERMINATION OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ANTIGEN

G.R. Safina<sup>1</sup>, E.P. Medyantseva<sup>1</sup>, O.N. Vanyagina<sup>1</sup>, N.I. Glushko<sup>2</sup>, H.C. Budnikov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Chemistry Kazan State University  
Kremlevskaya str., 18, Kazan, 420008 Russia; tel: (8432) 315-491, fax: (8432) 315-416  
e-mail: Elvina.Medyantseva@ksu.ru,

<sup>2</sup> Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russia

An amperometric enzyme immunosensor for detecting the bacterial antigen *Klebsiella pneumoniae* has been developed. The biosensing part of this analytical device consists of cholinesterase and antibodies to *Klebsiella pneumoniae* co-immobilized into the cellulose nitrate membrane. The conditions of immunosensor functioning (ratio of enzyme and antibodies, substrate concentration, pH of working buffer solution) were chosen. The sensor with antibodies in dilution 1:20 demonstrated the best analytical characteristics. Working concentrations were ranged from  $1 \times 10^{-9}$  to  $1 \times 10^{-1}$  mg/ml, the detection limit was  $5 \times 10^{-10}$  mg/ml. The cross-reactivity of used antibodies to antigens of bacteria, causing similar diseases was evaluated. The conditions of immunosensor reuse by regeneration of its biosensing part were chosen. The developed immunosensor was probed on blood sera of patients suffering from urea tract diseases.

**Key words:** amperometric, enzyme immunosensor, antigen, antibodies, *Klebsiella pneumoniae*