

УДК 543.866

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО АНТИГЕНА  
*KLEBSIELLA PNEUMONIAE* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО  
СЕНСОРА НА ОСНОВЕ SCREEN-PRINTED ЭЛЕКТРОДА**

*Г.Р. Сафина, Э.П. Медянцева, О.Н. Базарнова, Г.К. Будников,  
Н.И. Глушко*

**Аннотация**

Предложен способ определения антигена микроорганизма *Klebsiella pneumoniae* с использованием амперометрического иммуноферментного сенсора на основе платинового печатного электрода. Биочувствительная часть сенсора включала холинэстеразу и антитела против исследуемого антигена, совместно иммобилизованные в матрицу из бычьего сывороточного альбумина. Наилучшими свойствами обладал сенсор с антителами в разведении 1:100. Интервал рабочих концентраций аналитического устройства составлял  $1 \times 10^{-3}$  –  $1 \times 10^{-11}$  мг/мл; нижняя граница определяемых концентраций –  $5 \times 10^{-12}$  мг/мл. Рассчитаны константы связывания иммунного комплекса [антиген-антитело]. Предложенный сенсор апробирован при определении бактериального антигена в сыворотках крови пациентов, страдающих воспалительными заболеваниями почек.

**Введение**

Точная и экспрессная идентификация инфекционных возбудителей является одной из основных проблем медицинской практики, поскольку своевременное определенное возбудитель, а, следовательно, правильно поставленный диагноз позволяют избежать развития различных осложнений и переход заболевания в хроническую форму. Основными требованиями, предъявляемыми к методам анализа, являются селективность, чувствительность, простота и невысокая стоимость определений. В связи с этим, разработка аналитических устройств, основанных на принципах иммунохимического анализа, является актуальной задачей, поскольку иммуносенсоры обладают практически всеми перечисленными выше характеристиками.

В последние годы возрастает интерес исследователей к патогенным бактериям рода *Klebsiella* (клебсиелла), вызывающим серьезные заболевания, такие, как инфекции мочевыводящих путей, поражения мозговых оболочек, суставов и позвоночника, глаз, а также бактериемии и септикопиемии, пневмонии, бронхиты и бронхопневмонии [1]. Однако, в связи с определенными трудностями обнаружения данного патогена, анализ литературных данных до сих пор свидетельствует о практически полном отсутствии публикаций по разработке методов идентификации этого микроорганизма, в отличие от близкородственного возбудителя – кишечной палочки, созданию способов определения которой

посвящен ряд работ [2–6]. Практически единственными способами лабораторной диагностики *Klebsiella pneumoniae* являются гистологическая идентификация очагов поражения и бактериологический анализ [1], по результатам которых можно создать лишь качественную картину о присутствии этого микроорганизма, тогда как количественная информация о возбудителе дает возможность выбрать длительность и интенсивность курса лечения. Помимо этого, поскольку *Klebsiella pneumoniae* является условно-патогенным микроорганизмом, наличие его в бактериологическом посеве микроорганизмов не всегда подтверждает его участие в развитии заболевания, а может говорить лишь о носительстве данного микроорганизма.

В связи с актуальностью проблемы, целью исследования являлась разработка нового амперометрического иммуноферментного сенсора (ИФС) на основе платинового печатного электрода для определения бактериального антигена (Аг) *Klebsiella pneumoniae* (клебсиелла пневмония) с целью его использования в клиническом анализе.

## 1. Экспериментальная часть

**1.1. Иммунореагенты.** В работе использовали антиген (Аг) *Klebsiella pneumoniae* и антитела (Ат) против него, полученные в лаборатории по разработке бактериальных аллергенов Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии. Антиген получали с помощью ультразвукового разрушения микробных клеток (дезинтеграции), специфической экстракции боратым буферным раствором с рН 7.2–7.4. Далее проводили отделение неразрушившихся компонентов клеточной стенки, фильтрацию, стандартизацию по белковому азоту. Поликлональные антитела получены методом ступенчатой иммунизации. Концентрации водных растворов Ат и Аг были определены спектрофотометрически при  $\lambda = 280$  и  $\lambda = 260$  нм, соответственно, при  $t = 25^\circ\text{C}$  с помощью прибора Spectrometer Lambda EZ-210 (Perkin Elmer). Для *Klebsiella pneumoniae* исходная концентрация Ат составляла 0.989 мг/мл, концентрация Аг – 1.140 мг/мл.

**1.2. Реактивы.** Использовали бутирилхолинэстеразу (ХЭ) из сыворотки крови лошади, активностью 29 АЕ/мг (НПО «Биомед», Россия).

В качестве субстрата использовали бутирилтиохолин иодид (БТХИ), раствор которого готовили по точной навеске в рабочем буферном растворе и использовали в течение не более трех часов.

Использовали бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma, США). Применяли глутаровый альдегид фирмы ICN Biomedicals, Inc. (США).

Для изготовления буферного раствора использовали гидрофосфат и дигидрофосфат калия марок «ч» и «чда» соответственно (ЗАО «Лаверна», Россия).

**1.3. Оборудование.** Экспериментальная часть исследования выполнена с помощью портативного многоцелевого электрохимического детектора «МЕВ» с компьютеризированным управлением, разработанного в рамках совместного проекта ES INCO Corepicus (ERBIC 15-CT98-0910). Прибор предназначен для работы с одноканальными и многоканальными печатными электродами, адаптирован для использования небольших объемов пробы и позволяет измерять ток в области потенциалов от  $-1$  до  $+1$  В.

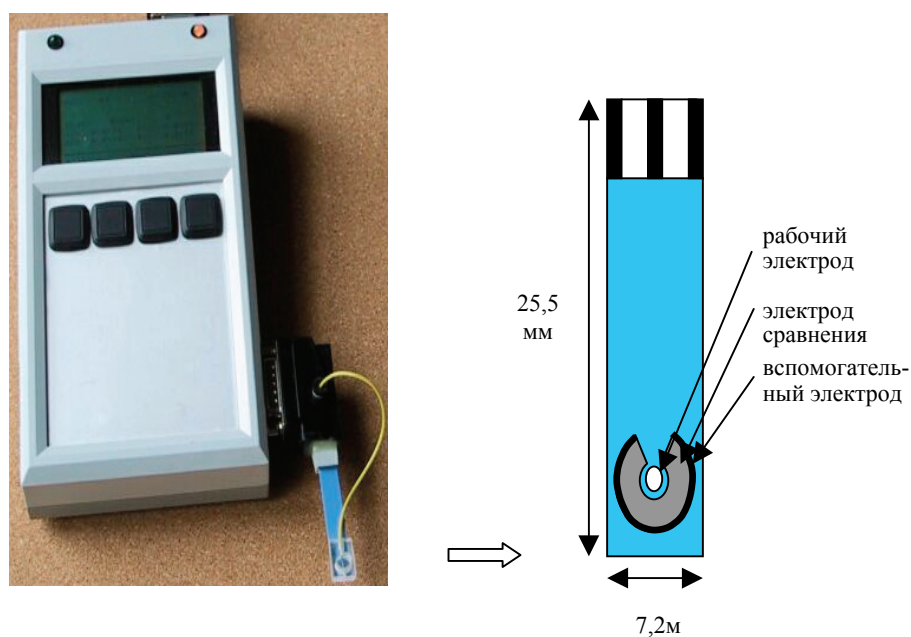
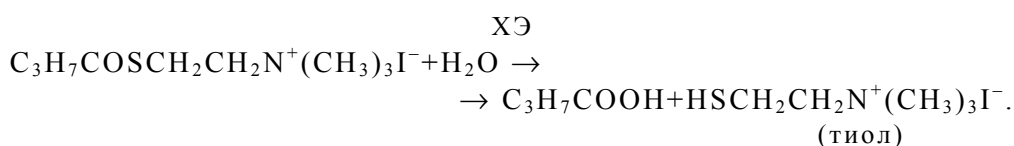


Рис. 1. Электрохимический детектор «МЕВ» и печатный электрод

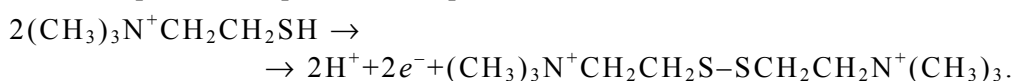
Основой разрабатываемых ИФС для определения бактериального антигена служила система, состоящая из рабочего, вспомогательного электродов и электрода сравнения (BVT Technologies, Брно, Чехия) (рис. 1). Материалом поверхности рабочего электрода, на который проводили иммобилизацию биореагентов, служила платиносодержащая паста. Из платины изготовлен вспомогательный электрод, из серебра – электрод сравнения.

## 2. Результаты и обсуждение

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



Тиолы, являющиеся одними из продуктов реакции ферментативного гидролиза серосодержащих субстратов холинэстеразы, при определенных условиях способны участвовать как в реакциях электровосстановления [7], так и в реакциях электроокисления [8]. На печатных платиносодержащих электродах тиол, образующийся при гидролизе иодида бутирилтиохолина в присутствии холинэстеразы, подвергается электроокислению:



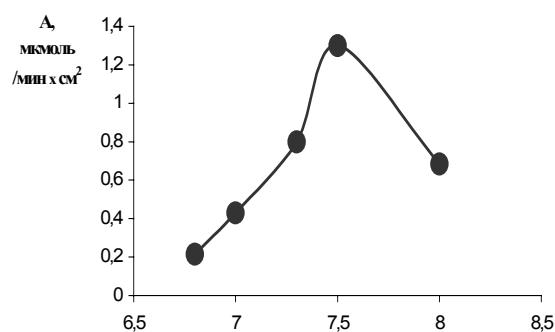


Рис. 2. Зависимость удельной каталитической активности ХЭ при ее совместной иммобилизации с Ат против *Klebsiella pneumoniae* в разведении 1:100 от pH фосфатного буферного раствора

В качестве аналитического сигнала использовали ток окисления тиола при потенциале  $E = +0.6$  В, который измеряли в потенциостатическом режиме. Установлено, что для достижения постоянного значения тока необходимо 2–3 мин, в дальнейшем значения токов остаются постоянными [8]. Величину этого стабилизировавшегося отклика биосенсора можно использовать в качестве аналитического сигнала. Таким образом, система ХЭ – БТХИ может служить в качестве индикаторной для амперометрической регистрации эффективности других биоспецифических взаимодействий.

Для получения биочувствительной части иммуноферментных сенсоров проводили совместную иммобилизацию холинэстеразы и антител против антигена *Klebsiella pneumoniae* на рабочую поверхность печатного электрода. В качестве матричного компонента для иммобилизации был выбран бычий сывороточный альбумин, поскольку в ранее проведенных работах было установлено, что он обладает лучшими характеристиками матричного компонента. Смесь для иммобилизации фермента и антител готовили по методике, описанной в [9].

С целью выбора условий функционирования иммуносенсора проводили изучение зависимости каталитической активности фермента при его совместной иммобилизации с антителами от pH буферного раствора (рис. 2). Установлено, что иммобилизованная ХЭ проявляет максимальную каталитическую активность в среде фосфатного буферного раствора при pH 7.5. Это значение pH было использовано в работе.

При получении биочувствительной части иммуноферментного сенсора варьировали концентрации вводимых в нее антител. Включение в состав биочувствительной части сенсора Ат против соответствующих антигенов совместно с ХЭ, практически не влияет на ее каталитическую активность. Это следует из сопоставления каталитической активности иммобилизованного фермента в отсутствие иммобилизованных Ат против *Klebsiella pneumoniae* (табл. 1).

Установлено, что в исследуемых условиях введение антигена *Klebsiella pneumoniae* в изучаемый раствор вызывает изменение величины аналитического сигнала по сравнению с контрольным опытом в отсутствие Ат. Можно предположить, что на поверхности биочувствительной части ИФС происходит образование иммунного комплекса антиген-антитело, который, являясь эффек-

Табл. 1

Каталитическая активность ХЭ в отсутствие и в присутствии со-иммобилизованных Ат (1:100) против *Klebsiella pneumoniae*. Фосфатный буфер (pH 7.5) ( $n = 5$ ;  $P = 0.95$ )

Удельная каталитическая активность ИХЭ, мкмоль/мин×см <sup>2</sup>	
в отсутствие Ат	в присутствии Ат
1.2±0.1	1.3±0.2

тором иммобилизованного фермента, вызывает увеличение активности холинэстеразы.

В определенных интервалах концентраций наблюдается линейная зависимость между величиной  $(I_p/I_0) \times 100\%$  (где  $I_p$  – ток пика в присутствии Ат,  $I_0$  – ток пика холостого опыта) и отрицательным значением логарифма концентрации  $(-\lg C_{\text{Ат}})$  введенного раствора Ат *Klebsiella pneumoniae*. Градуировочная зависимость связывает безразмерные величины (отношение токов и логарифм концентраций) и позволяет интерпретировать наблюдаемые эффекты [10].

Аналитические характеристики разработанных сенсоров – интервалы рабочих концентраций и нижние границы определенных концентраций – представлены в табл. 2.

Табл. 2

Аналитические характеристики амперометрического ИФС для определения Ат *Klebsiella pneumoniae*

Разведение Ат	Интервал рабочих концентраций мг/мл	$c_{\text{н}} \times 10^{12}$ , мг/мл	Уравнение градуировочного графика $(I_p/I_0) \times 100\% = a(-\lg c) + b, r$		
			$a$	$b$	$r$
1:10	$1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-11}$	7	-2.5±0.1	129±1	-0.9901
1:20		7	-1.43±0.05	123.7±0.4	-0.9946
1:50		5	-1.72±0.04	120.6±0.3	-0.9977
1:100		5	-2.13±0.04	127.5±0.3	-0.9989

Правильность метода подтверждена способом «введено – найдено» (табл. 3). Наилучшими характеристиками обладал сенсор с антителами в разведении 1:100, вследствие чего он был использован для последующих определений.

Степень сродства Ат к Ат (специфичность) количественно выражается константой связывания ( $K_a$ ), которая является основным параметром, определяющим чувствительность иммунохимической реакции.

Существуют различные способы расчета констант связывания компонентов иммунохимической реакции, однако чаще всего для оценки прочности связывания иммунореагентов используют метод Скэтчарда, основанный на исследовании зависимости отношения равновесной концентрации комплекса [Аг-Ат] к концентрации свободного Ат от концентрации комплекса [11].

Оценку констант связывания иммунного комплекса проводили, используя иммобилизованные Ат против Ат *Klebsiella pneumoniae* в разведении 1:100. Равновесную концентрацию иммунного комплекса [Аг-Ат] находили по разности между общей концентрацией Ат и оставшейся в растворе после образования иммунного комплекса.

Табл. 3

Определение антигена *Klebsiella pneumoniae* с помощью амперометрического иммуноферментного сенсора на основе печатного электрода ( $n = 5$ ;  $P = 0.95$ )

Разведение Аг	Концентрация антигена, мг/мл		S <sub>r</sub>
	Введено	Найдено	
1:10	$5 \times 10^{-6}$	$(4.7 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	0.04
	$5 \times 10^{-8}$	$(5.1 \pm 0.3) \times 10^{-8}$	0.08
1:20	$4 \times 10^{-5}$	$(4.3 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	0.06
	$8 \times 10^{-7}$	$(7.8 \pm 0.4) \times 10^{-7}$	0.07
1:50	$5 \times 10^{-5}$	$(5.2 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	0.04
	$7 \times 10^{-7}$	$(6.7 \pm 0.4) \times 10^{-7}$	0.07
1:100	$6 \times 10^{-9}$	$(5.3 \pm 0.4) \times 10^{-9}$	0.09
	$5 \times 10^{-10}$	$(5.1 \pm 0.5) \times 10^{-10}$	0.1

Чаще всего, Ат, вырабатываемые организмом против Аг, представляют собой неоднородную популяцию, поэтому графики, построенные в координатах Скэтчарда, отображают криволинейную зависимость, которую можно аппроксимировать чаще двумя прямыми, выделив из гетерогенной смеси Ат несколько популяций, значения констант связывания которых отличаются (рис. 3).

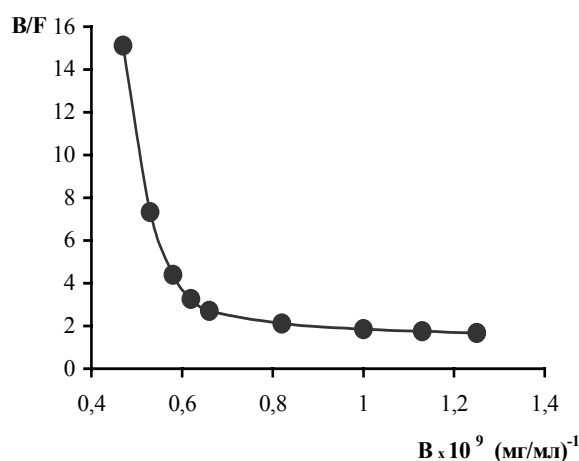


Рис. 3. График для определения констант связывания иммунного комплекса Аг *Klebsiella pneumoniae* – Ат при использовании иммобилизованных Ат разведении 1:100

Рассчитанные значения констант связывания иммунного комплекса [Аг-Ат] представлены в табл. 4.

Найденные значения констант образования иммунных комплексов указывают на достаточно прочное связывание антигенов с соответствующими антителами [11]. Это свидетельствует о возможности использования иммунологической реакции в аналитических целях для определения Аг *Klebsiella pneumoniae*. Рассчитанное количество активных антител составляет  $(2.2 \pm 0.2) \times 10^{-9}$  мг/мл.

Табл. 4

Значения констант связывания иммунных комплексов [Аг-Ат]  
для Аг *Klebsiella pneumoniae*

Разведение со-иммобилизованных антител	Константа связывания, $K_a$ , (мг/мл) <sup>-1</sup>	
	$K_{a1}$	$K_{a2}$
1:100	$(9.7 \pm 1.1) \times 10^{10}$	$(1.7 \pm 0.3) \times 10^9$

Зачастую диагностика заболеваний, вызванных микроорганизмом *Klebsiella pneumoniae*, затруднена вследствие присутствия наряду с определяемым возбудителем близкородственных бактерий либо микроорганизмов, способных вызывать заболевания с похожей клинической картиной. Бактериологический анализ, являющийся практически единственным методом определения возбудителя, достаточно длителен, кроме того, его точность зависит от соблюдения ряда условий и квалификации специалиста.

Вследствие этого применение разработанного ИФС позволяет значительно упростить проведение анализа, повысить чувствительность, специфичность и экспрессность определений, снизить их стоимость.

Разработанный амперометрический иммуноферментный сенсор был апробирован при определении антигена *Klebsiella pneumoniae* в сыворотках крови больных, страдающих заболеваниями почек, для уточнения диагнозов, поставленных в результате медицинского осмотра. Полученные данные представлены в табл. 5.

#### Методика определения антигена *Klebsiella pneumoniae* в сыворотке крови с помощью амперометрического ИФС на основе печатного электрода

В электрохимическую ячейку емкостью 200 мкл вводили 178 мкл фосфатного буферного раствора (рН  $7.5 \pm 0.05$ ), 20 мкл стандартного раствора БТХИ концентрацией  $1 \times 10^{-2}$  М, затем 2 мкл сыворотки больного. Помещали в ячейку иммуноферментный сенсор. Смесь инкубировали в течение 10 мин. Сигнал окисления БТХИ снимали при потенциале  $E = +0.6$  В. Для проведения контрольного опыта использовали смесь сывороток крови 20 здоровых людей. (Сыворотки крови хранились в замороженном состоянии при  $t = -18^\circ\text{C}$ ).

Ранее на кафедре аналитической химии Казанского государственного университета был разработан амперометрический ИФС для определения Аг *Klebsiella pneumoniae* на основе стационарного ртутно-пленочного электрода и биочувствительной части, состоящей из холинэстеразы и антител против исследуемого антигена, совместно иммобилизованных в матрицу из нитрата целлюлозы [12]. Вследствие этого представляло интерес сопоставить результаты определения бактериального антигена, полученные с использованием различных типов сенсоров (табл. 5).

ИФС на основе печатного электрода позволяет обнаружить бактериальный антиген в более широком диапазоне концентраций ( $1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-11}$  мг/мл), чем иммуноферментный сенсор на основе стационарного ртутно-пленочного элек-

Табл. 5

Сравнительная оценка данных медицинского осмотра и определений антигена *Klebsiella pneumoniae* с помощью разных типов амперометрических ИФС ( $n = 5; P = 0.95$ )

№	Данные медицинского осмотра	Определения с помощью ИФС					
		На основе платинового печатного электрода		На основе стационарного ртутно-пленочного электрода		$F_{\text{расч}}$ ( $F_{\text{табл}} = 6.39$ )	$t_{\text{расч}}$ ( $t_{\text{табл}} = 2.78$ )
		$C_{\text{Ag}}$ , мг/мл	$S_{\Gamma}$	$C_{\text{Ag}}$ , мг/мл	$S_{\Gamma}$		
1	×××	$(4.2 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	0.03	$(4.3 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	0.03	2.3	0.9
2	×××	$(6.6 \pm 0.2) \times 10^{-5}$	0.04	$(6.9 \pm 0.3) \times 10^{-5}$	0.04	3.0	1.2
3	××	$(1.3 \pm 0.2) \times 10^{-7}$	0.05	$(1.8 \pm 0.1) \times 10^{-7}$	0.06	3.2	1.7
4	××	$(8.2 \pm 0.4) \times 10^{-10}$	0.07	–			
5	××	$(1.9 \pm 0.2) \times 10^{-10}$	0.09	–			
6	××	$(5.5 \pm 0.3) \times 10^{-11}$	0.09	–			
7	××	$(4.1 \pm 0.2) \times 10^{-11}$	0.1	–			

××× – тяжелая форма заболевания

×× – средняя тяжесть заболевания

– – антиген не обнаружен

трода, диапазон рабочих концентраций которого составляет  $1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-9}$  мг/мл [12]. Соответственно, предложенное аналитическое устройство дает возможность определять более низкие значения концентраций, по сравнению с ранее разработанным ИФС (табл. 5, позиции 4–6); следовательно, проводить диагностику заболевания даже на ранних этапах развития либо осуществлять контроль остаточных количеств циркулирующего бактериального антигена. В свою очередь, правильно поставленный диагноз позволяет своевременно выбрать и назначить верный курс терапии, что способствует более быстрому излечению заболевания.

Таким образом, разработанный амперометрический иммуноферментный сенсор на основе платинового печатного электрода позволяет проводить чувствительное определение бактериального антигена *Klebsiella pneumoniae*. Существенными преимуществами являются отсутствие длительной процедуры пробоподготовки, а вследствие этого, увеличение экспрессности определений (время анализа составляет не более 20 мин). Использование микроэлектрода позволяет уменьшить расход реагентов, а также использовать минимальное количество пробы (до 0.5 мкл), соответственно, снизить стоимость анализа. Наличие портативного оборудования позволяет проводить анализ в режиме on-line, вне условий стационарной лаборатории.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 03-03-33116).



### Summary

G.R. Safina, E.P. Medyantseva, O.N. Bazarnova, H.C. Budnikov, N.I. Glushko. Determination of *Klebsiella pneumoniae* bacterial antigen using the amperometric enzyme immunosensor based on the screen-printed electrode

The approach for the determination of *Klebsiella pneumoniae* microbial antigen using the amperometric enzyme immunosensor based on the screen-printed electrode has been proposed. The biosensing part of the sensor included cholinesterase and antibodies to the investigated antigen co-immobilized into the bovine serum albumin matrix. The sensor with antibodies in dilution 1:100 showed the best properties. The interval of the working concentrations of this analytical device was  $1 \times 10^{-3}$  –  $1 \times 10^{-11}$  mg/ml, the detection limit –  $5 \times 10^{-12}$  mg/ml. The constants of binding of immune complex [antigen-antibody] were estimated. The developed sensor was probed for the determination of the bacterial antigen in the blood sera of the patients suffering from the inflammatory kidney diseases.

### Литература

1. Медицинская микробиология / Гл. ред. В.И. Покровский, О.К. Поддеев. – М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1999. – 1200 с.
2. Liu Y., Li Y. An antibody-immobilized capillary of *Escherichia coli* O157:H7 with absorbance measurement // Anal. Chem. – 2001. – V. 73, No 21. – P. 5180–5183.
3. Ho J. A., Hsu H.-W., Huang M.-R. Liposome-based microcapillary immunosensor for detection of *Escherichia coli* O157:H7 // Anal. Biochem. – 2004. – V. 330, No 2. – P. 342–349.
4. Su X.-L., Li Y. A self-assembled monolayer-based piezoelectric immunosensor for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 // Biosens. and Bioelectron. – 2004. – V. 19, No 6. – P. 563–574.
5. Gehring A.G., Patteson D.I., Si T. Use of a light-addressable potentiometric sensor for the detection of *E. coli* O157:H7 // Anal. Biochem. – 1998. – V. 258. – P. 293–298.
6. Yu H., Bruno J.G. Immunomagnetic-electrochemiluminescent detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in foods and environmental water samples // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – V. 62. – P. 587–592.
7. Медянцева Э.П., Сафина Г.Р., Халдеева Е.В., Вершинин А.А., Глушко Н.И., Будников Г.К. Использование амперометрических иммуноферментных сенсоров для определения бактериальных антигенов // Журн. аналит. химии. – 2004. – Т. 59, № 2. – С. 190–197.
8. Сафина Г.Р., Медянцева Э.П., Фомина О.Г., Ванягина О.Н., Глушко Н.И., Халдеева Е.В., Будников Г.К., Маланичева Т.Г. Определение циркулирующих антигенов условно-патогенных бактерий с помощью амперометрических иммуноферментных сенсоров // В сб. Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний. – Н.-Новгород: Изд-во Нижегород. ун-та, 2004. – С. 184–191.
9. Сафина Г.Р., Медянцева Э.П., Фомина О.Г., Глушко Н.И., Вершинин А.А., Будников Г.К. Амперометрический иммуноферментный сенсор на основе платиновых планарных электродов для определения бактериального антигена *Staphylococcus aureus* // Сенсор. – 2004. – № 1. – С. 14–20.
10. Fernandez-Sanchez C., Gonzalez-Garcia M.B., Costa-Garcia A. AC voltammetric carbon paste-based enzyme immunosensors // Biosens. and Bioelectron. – 2000. – V. 14, No 12. – P. 917–924.

11. Теория и практика иммуноферментного анализа / Под ред. А.М. Егорова. – М.: Высш. шк., 1991. – 288 с.
12. Сафина Г.Р., Медянцева Э.П., Ванягина О.Н., Глушко Н.И., Будников Г.К. Определение бактериального антигена *Klebsiella pneumoniae* с помощью амперометрического иммуноферментного сенсора // Материалы III междисциплинарной конф. «Новые биокрибернетические и телемедицинские технологии 21 века для диагностики и лечения заболеваний человека» (НБИТТ–21). – Петрозаводск, 2003. – С. 55.

Поступила в редакцию  
14.06.05

---

**Сафина Гульнара Рустамовна** – аспирант кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: [gulnara207@hotmail.com](mailto:gulnara207@hotmail.com)

**Медянцева Эльвина Павловна** – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: [Elvina.Medyantseva@ksu.ru](mailto:Elvina.Medyantseva@ksu.ru)

**Базарнова Ольга Николаевна** – студент Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

**Будников Герман Константинович** – доктор химических наук, профессор, зав. кафедрой аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: [Herman.Budnikov@ksu.ru](mailto:Herman.Budnikov@ksu.ru)

**Глушко Надежда Ивановна** – зав. лабораторией по разработке бактериальных аллергенов Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии.