

УДК 616.98:578.825

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ КОРИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТЕКЛОУГЛЕРОДНОГО ЭЛЕКТРОДА, МОДИФИЦИРОВАННОГО 2-ПРОПАРГИЛТИО-6-НИТРО-7-ГИДРОКСИ-4Н-1,2,4-ТРИАЗОЛО-4,7-ДИГИДРО[5,1-С]-1,2,4-ТРИАЗИНОМ

© 2024 г. М. В. Медведева^{а, *}, А. В. Мазур^а, Т. С. Свалова^{а, **}, И. А. Балин^а, В. Л. Русинов^{а, b},
А. И. Матерн^а, А. Н. Козицина^а

^а Уральский федеральный университет имени первого Президента России

Б. Н. Ельцина

ул. Мира, 19, Екатеринбург, 620002 Россия

^б Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук
ул. Софьи Ковалевской, 22/20, Екатеринбург, 620108 Россия

* e-mail: medv-margarita@yandex.ru

** e-mail: t.s.svalova@urfu.ru

Поступила в редакцию 15.05.2023 г.

После доработки 19.06.2023 г.

Принята к публикации 20.06.2023 г.

Предложен способ вольтамперометрического определения антител к вирусу кори с использованием стеклоуглеродного электрода, модифицированного 2-пропаргилтио-6-нитро-7-гидрокси-4Н-1,2,4-триазоло-4,7-дигидро[5,1-с]-1,2,4-триазином. Синтезированное оригинальное соединение, иммобилизованное на поверхности карбоксилированных углеродных нанотрубок с использованием тиолиновой реакции обеспечивало образование аналитического сигнала и одновременно служило в качестве кросс-линкера для иммобилизации биорецептора — антигена вируса кори. Выбраны рабочие условия определения антител к вирусу кори (режим регистрации сигнала, время инкубации, температура, pH проведения измерений, концентрация иммобилизуемого антигена). Получена линейная градуировочная зависимость $I^*(\%) = -(1.5 \pm 0.7) \lg c(\text{МЕ/мл}) + (29 \pm 2)$ ($R^2 = 0.9653$) в диапазоне концентраций антител к вирусу кори 0.1–5.0 МЕ/мл. Рассчитанный по 3σ-критерию предел обнаружения 0.17 МЕ/мл позволяет использовать предложенный способ для экспресс-анализа биологических жидкостей.

Ключевые слова: вольтамперометрия, азиолоазин, электрохимическое определение, антитела вируса кори, иммуноанализ.

DOI: 10.31857/S0044450224010056, **EDN:** lewmtw

Возбудитель кори относится к числу наиболее контагиозных РНК-вирусов, а также остается одной из основных причин детской заболеваемости и смертности во всем мире [1]. Инфекция быстро распространяется воздушно-капельным путем и вызывает тяжелые осложнения со стороны центральной нервной системы, органов дыхания и желудочно-кишечного тракта. Помимо этого, большая часть смертей от кори связана с вторичными инфекциями, возникающими в результате вызванного корью подавления иммунных реакций. Для предотвращения распространения кори необходимо определять быстро не только антигены, но и антитела, по наличию и уровню которых

можно выявить бессимптомное течение болезни и эффективность вакцинации [2].

В стационарных медицинских лабораториях антитела к вирусу кори определяют методом иммуноферментного анализа со спектрофотометрическим детектированием. Положительными считаются пробы с содержанием антител выше 0.18 МЕ/мл, 0.18–0.12 МЕ/мл — сомнительный результат, рекомендуется повторить тест, до 0.12 МЕ/мл — отрицательный [3].

Несмотря на актуальность проблемы, описаны лишь единичные подходы к созданию биосенсоров для внелабораторной экспресс-диагностики кори [4, 5]. Так, авторами работы [4] предложен импедиметрический иммуносенсор для

определения антител к вирусу кори, рецепторный слой которого структурирован посредством модификации поверхности рабочего электрода 4-(2-аминоэтил)бензолдиазонием и иммобилизации биорецептора с использованием глутарового альдегида.

Линейный диапазон определяемых концентраций составил 3×10^{-5} – 0.3 МЕ/мл, предел обнаружения (ПО) – 9.6×10^{-6} МЕ/мл. Ранее нами разработан способ определения антител к вирусу кори на модифицированном аминобензойной кислотой углеродсодержащем электроде с последующей иммобилизацией антигена вируса кори по реакции с глутаровым альдегидом [5]. Предложенный сенсор позволяет определять антитела в диапазоне концентраций 10 – $1\,000$ нг/мл.

В конструкциях электрохимических биосенсорных систем в качестве распознающего агента, как и в традиционных методах, используют биорецепторы, применение которых сопряжено с такими трудностями, как высокая стоимость, ограниченный срок хранения реагентов и необходимость соблюдения физиологических условий как на стадии анализа, так и при иммобилизации рецептора на сенсорной поверхности.

Применение малых органических молекул в конструкциях портативных электрохимических устройств в качестве полифункциональных материалов – электроактивных меток, кросс-линкеров и элементов молекулярного распознавания – сегодня особенно перспективно, поскольку позволяет расширить аналитические и операционные возможности таких систем.

Как правило, иммобилизация биорецептора обеспечивается за счет взаимодействия карбоксильных, amino- и/или сульфгидрильных функциональных групп с предварительно функционализированной поверхностью рабочего электрода. Наиболее распространенным способом иммобилизации биомолекул является карбодимидная сшивка.

Так, в работе [6] авторы показали эффективность применения данной реакции при разработке импедиметрического сенсора для определения вируса денге. Планарный электрод, изготовленный методом трафаретной печати, модифицировали антителами, после чего инкубировали в суспензии аналита. Разработанный сенсор успешно апробирован на белке вируса денге с ПО 0.3 нг/мл и линейным диапазоном определяемых концентраций 1 – 200 нг/мл, что превосходит многие аналоги [7, 8].

Другим подходом к иммобилизации биорецептора на поверхности электрода является применение реакции клик-химии. В частности, ранее мы показали [9, 10] возможность применения реакции катализируемого медью азид-алкинового циклоприсоединения для иммобилизации антител *E. coli* и *S. aureus* на предварительно функционализированную электропроводящим полимером поверхность стеклоуглеродного электрода.

Такой подход реализован в импедиметрическом и вольтамперометрическом сенсорах для определения соответствующих бактерий. Иммуносенсоры имеют хорошие аналитические характеристики (ПО 7.2 КОЕ/мл и 15.9 КОЕ/мл соответственно, линейный диапазон 10^2 – 10^6 КОЕ/мл), просты в изготовлении, стабильны при хранении и превосходят по аналитическим характеристикам разработанные ранее аналоги.

Не менее актуальной задачей является структурирование поверхности биосенсора, например за счет избирательного взаимодействия линкера с биорецептором. В работе [11] показано влияние способа иммобилизации рецепторного слоя на аналитические характеристики иммуносенсора путем сравнения иммобилизации антител на золотых наночастицах, модифицированных L-аспаргином, и на золотом рабочем электроде с нанесенными золотыми наночастицами, активированными карбодиимидами. В случае с иммобилизацией на наночастицах, модифицированных L-аспарагином, сенсор показал больший линейный диапазон, что предположительно обусловлено большей доступностью вариабельных участков антител по сравнению со стандартным методом карбодиимидной сшивки.

Особенно перспективным является использование в качестве кросс-линкеров органических молекул, способных к избирательному взаимодействию с определенными участками биорецептора. Так, соединения класса азолоазинов, к которым относится зарегистрированное лекарственное средство “Триазарин”, демонстрируют высокую активность в отношении широкого круга РНК-вирусов, таких как возбудители гриппа, коксаки, клещевого энцефалита и др., обусловленную мультитаргетным взаимодействием, в том числе с вирусным белком гематоглутином [12, 13].

В ходе ранее проведенных исследований с применением комплексного подхода и комбинированных методов анализа нами предложены вероятные механизмы электрохимических

превращений нитроазолоазинов с образованием интермедиатов радикальной природы и показана их взаимосвязь с биологической активностью ряда оригинальных противовирусных соединений азолоазинового и азолопиримидинового рядов [14, 15].

С учетом выраженных электрохимических свойств, доказанной биологической активности и эффективности в отношении ряда РНК-вирусов соединения класса триазолотриазин могут являться перспективными функциональными материалами в конструкциях электрохимических сенсорных устройств и тест-систем. Наибольший интерес для использования в электрохимических сенсорах представляют производные азолоазинов, содержащие в своей структуре электрохимическую метку (в данном случае нитрогруппу) и функциональную группу для иммобилизации молекулы на поверхность рабочего электрода — ацетиленовый фрагмент.

В нашей работе предложен вольтамперометрический способ определения антител к вирусу кори с использованием оригинального соединения азолоазинового ряда — 2-пропаргилтио-6-нитро-7-гидрокси-4Н-1,2,4-триазоло-4,7-дигидро[5,1-с]-1,2,4-триазина (Аза1) (схема 1), обеспечивающего возникновение аналитического сигнала и одновременно являющегося кросс-линкером для иммобилизации биорецепторного слоя.

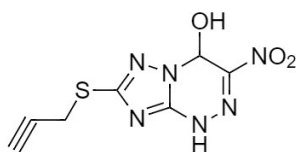


Схема 1. Структурная формула 2-пропаргилтио-6-нитро-7-гидрокси-4Н-1,2,4-триазоло-4,7-дигидро[5,1-с]-1,2,4-триазина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (ЭДК) ($\geq 97\%$), N-гидроксисукцинимид (НГС) ($\geq 97\%$), аминоксантиол (99%), диметилсульфоксид (ДМСО) (99.5%), азобисизобутиронитрил (АИБН) (99%), карбоксилированные многостенные углеродные нанотрубки (УНТ) ($\geq 98\%$), хлорид калия ($\geq 99\%$), гексацианоферрат калия(II) и гексацианоферрат калия (III) ($\geq 99\%$) приобретали у фирмы Sigma-Aldrich (США). Использовали следующие коммерческие реактивы: фосфорную кислоту (85%) (Prayon, Бельгия), борную кислоту (99.9%)

(“Реахим”, Россия), ледяную уксусную кислоту (99.8%) (завод ПКС, Россия), коревой антиген NovO/96 в концентрации 2,33 мг/мл (“Вектор”, Россия) и антитела к кори (“Вектор”, Россия).

Все растворы готовили с использованием деионизованной воды, произведенной на деионизаторе Barnstead Pacific TII (Thermo Scientific, США). Буферный раствор Бриттона–Робинсона (ББР) готовили смешиванием 0.04 М борной кислоты, 0.04 М фосфорной кислоты и 0.04 М уксусной кислоты для получения необходимого значения pH [16]. 2-Пропаргилтио-6-нитро-7-гидрокси-4Н-1,2,4-триазоло-4,7-дигидро[5,1-с]-1,2,4-триазин (Аза1) синтезировали по методике [14].

Электрохимические исследования проводили с использованием потенциостата/гальваностата Autolab PGSTAT 204 (Metrohm-Autolab, Нидерланды). В работе применяли трехэлектродную ячейку, включающую рабочий электрод — стеклоуглеродный электрод (СУЭ) ($d = 2$ мм) (Metrohm, Швейцария), электрод сравнения — хлоридсеребряный (Ag/AgCl, KCl 3 М) и противозлектрод — стеклоуглеродный стержень.

Для полировки поверхности стеклоуглеродного электрода применяли набор kit 6.2802.010 (Metrohm, Швейцария), включающий оксид алюминия с дисперсностью частиц 0.3 мкм и тканевую подложку. Перед каждым электрохимическим измерением в течение 10 мин. растворы продували аргоном (чистота 99.9%).

Модифицирование углеродных нанотрубок 2-пропаргилтио-6-нитро-7-гидрокси-4Н-1,2,4-триазоло-4,7-дигидро[5,1-с]-1,2,4-триазином. Синтезированное производное азолоазина иммобилизовали по реакции карбодимодной сшивки с аминоксантиолом с последующей тиолиновой реакцией (рис. 1).

Карбоксилированные многостенные углеродные нанотрубки ($c = 1$ мг/мл) диспергировали в 1 мл ББР (pH 5.0) в ультразвуковой ванне в течение 10 мин. Далее карбоксильные группы активировали добавлением НГС и ЭДК в молярном соотношении 1:4 (0.1 М : 0.4 М) и перемешиванием смеси в течение 30 мин. После этого в реакционную смесь добавляли 0.1 М аминоксантиол.

Реакцию проводили при перемешивании в течение двух часов. На последней стадии добавляли 0.1 М раствор Аза1 в ДМСО и 1×10^{-3} М раствор радикального инициатора АИБН. Реакцию проводили в течение двух часов при 60°C. Во избежание агрегации УНТ-пробирку с реакционной

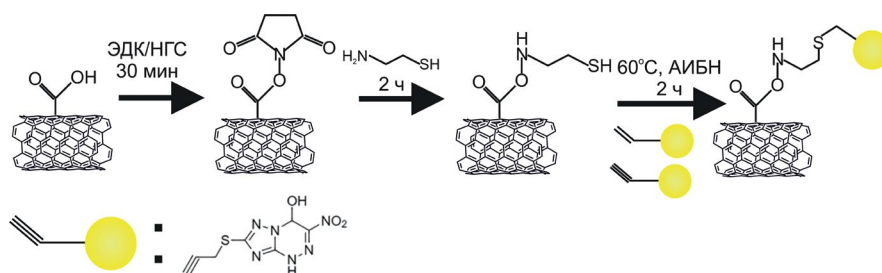


Рис. 1. Схема получения модифицированных производными азолазинов углеродных нанотрубок.

массой помещали ультразвуковую ванну. Непрореагировавшие компоненты удаляли путем центрифугирования и многократной промывки ББР (рН 5.0).

ИК-спектроскопия. Исследования проводили после каждого этапа модификации углеродных наноматериалов в диапазоне волновых чисел от 4 000 до 400 см^{-1} . Полученные нанокомпозитные материалы измельчали в ступке и смешивали с KBr для формирования таблетки под прессом. Для проведения измерений, преобразований и оценки полученных спектральных данных использовали программное обеспечение Opus.

В ИК-спектрах, зарегистрированных для УНТ-Аза1, присутствуют характерные полосы поглощения в области 1 290–1 280 см^{-1} , соответствующие валентным колебаниям нитрогруппы, что свидетельствует об успешной модификации поверхности нанотрубок.

Вольтамперометрическое определение антител вируса кори с использованием УНТ-Аза1. Предлагаемый алгоритм вольтамперометрического определения антител к вирусу кори включает ряд последовательных стадий (рис. 2). На первом этапе на поверхность стеклоуглеродного рабочего электрода наносили модифицированные Аза1 наноматериалы и высушивали при комнатной температуре. После этого рабочий электрод в течение 20 мин. инкубировали в суспензии антигена. Полученный таким образом модифицированный электрод далее инкубировали в анализируемой суспензии, после чего регистрировали вольтамперометрический отклик — ток пика электровосстановления иммобилизованного на электроде Аза1, величина которого обратно пропорциональна содержанию анализата (антител

к вирусу кори) в пробе. Аналитическим сигналом служила разность токов пика до и после инкубирования I^* :

$$I^* = \frac{I^0 - I}{I^0} \cdot 100\% \quad (1)$$

где I^0 — ток пика электровосстановления Аза1, зарегистрированный на электроде до инкубации в анализируемой пробе; I — ток пика электровосстановления Аза1, зарегистрированный на модифицированном электроде после инкубации в анализируемой пробе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика модифицированного стеклоуглеродного электрода, оптимизация условий анализа. Электрохимическое поведение ряда производных азолазинов, и, в частности, 2-пропаргилтио-6-нитро-7-гидрокси-4Н-1,2,4-триазоло-4,7-дигидро[5,1-с]-1,2,4-триазина (Аза1), подробно изучено нами ранее [17]. Электрохимическая активность данных соединений обусловлена электровосстановлением нитрогруппы в диапазоне от -0.4 до -0.6 В. Электрохимическое восстановление протекает с участием трех электронов и трех протонов с образованием соответствующего димера. Выраженный электрохимический отклик линейен в широком диапазоне концентраций и потому может быть использован в качестве аналитического сигнала при разработке электрохимических способов анализа и сенсоров на их основе табл. 1.

В выбранных условиях величина тока пика восстановления при переходе от ЛВА к ДИВ

Таблица 1. Данные для исследования

Параметр	Начальный потенциал	Конечный потенциал	Шаг потенциала	Амплитуда модуляции	Частота
Значение	0 В	–1 В	–0.005 В	0.1 В	20 Гц

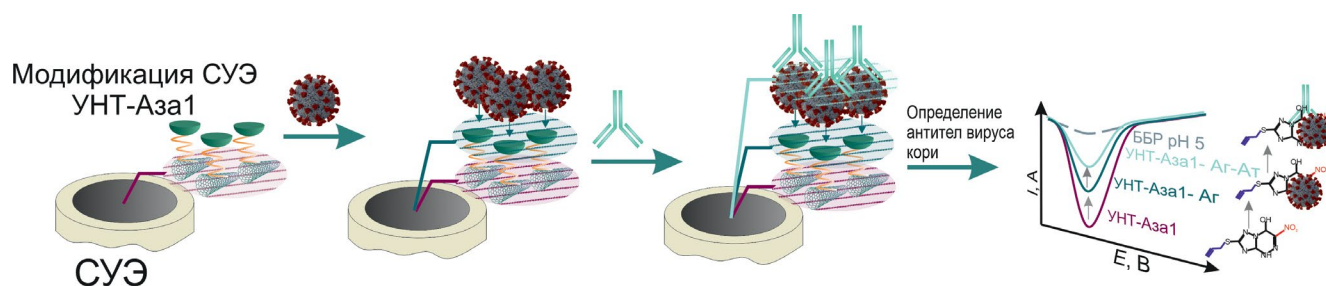


Рис. 2. Предлагаемый алгоритм вольтамперометрического определения антител к вирусу кори.

увеличивается в 1.15 раза, при переходе от ЛВА к КВВ – в 3.3 раза. Для дальнейшей регистрации электрохимического отклика Аза1 выбрали режим КВВ (рис. 3).

В рамках нашего исследования получили гибридный наноразмерный модификатор состава – многостенные углеродные нанотрубки-Аза1 для последующей иммобилизации на его поверхности антигена вируса кори. На КВВ, зарегистрированных с использованием модифицированного полученным гибридным наноматериалом СУЭ (рис. 4), присутствует выраженный катодный пик в области потенциалов электровосстановления нитрогруппы, что указывает на эффективность проведенной иммобилизации.

Поверхность модифицированных электродов характеризовали методом циклической вольтамперометрии (ЦВА) (рис. 5). Критерий Семерано, рассчитанный из логарифмической зависимости величины тока, зарегистрированного в системе ферри/ферроцианид-ионов, от скорости наложения потенциала ($\lg \alpha = \lg I / \lg v$) для СУЭ, СУЭ-УНТ, СУЭ-УНТ-Аза1 составил

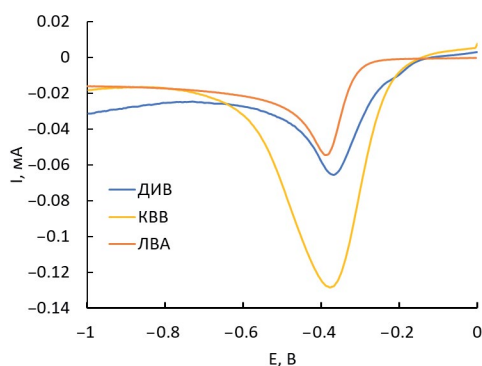


Рис. 3. Вольтамперограммы, зарегистрированные в различных режимах регистрации сигнала (линейная, квадратно-волновая, дифференциально-импульсная вольтамперометрия) на стеклоуглеродном электроде в присутствии 1 мМ Аза1 в водно-органическом растворе буферный раствор Бриттона–Робинсона–диметилсульфоксид (9:1), pH 5.

соответственно 0.47, 0.49, 0.47, что свидетельствует о диффузионной природе тока [12].

Линейная зависимость тока пика от квадратного корня из скорости изменения потенциала (рис. 5б) типична для электрохимических процессов с диффузионным контролем переноса электрона [18], поэтому эффективную площадь поверхности модифицированного СУЭ оценивали с использованием $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ в качестве окислительно-восстановительного индикатора и уравнение Рендлса–Шевчика для процессов, контролируемых диффузией [19]:

$$I_p = \frac{1}{\pi^{1/2}} \chi_p n^2 F^2 A c D^{1/2} (RT)^{-1/2} v^{1/2}, \quad (2)$$

где I_p – ток пика окисления, А; R – универсальная газовая постоянная, Дж/моль·К; T – температура, К; v – скорость сканирования потенциала, В/с; n – число электронов; F – константа Фарадея 96485 Кл/моль; A – эффективная площадь поверхности электрода, см²; c – концентрация, мМ; D – коэффициент диффузии, см²/с с учетом того, что для 1.0 мМ $K_4[Fe(CN)_6]$ в 0.1 М KCl $n = 1$ и $D = 7.6 \times 10^{-6}$ см²/с при $T = 298$ К.

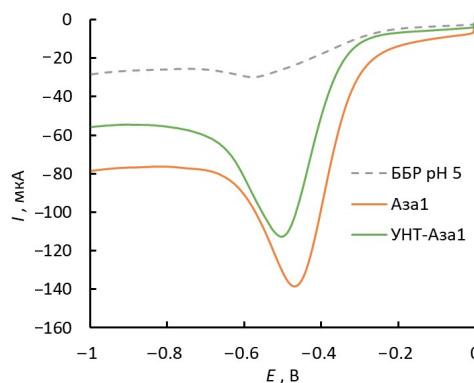


Рис. 4. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные на стеклоуглеродном электроде после модификации электрода УНТ-Аза1, фоновый электролит – буферный раствор Бриттона–Робинсона, pH 5.

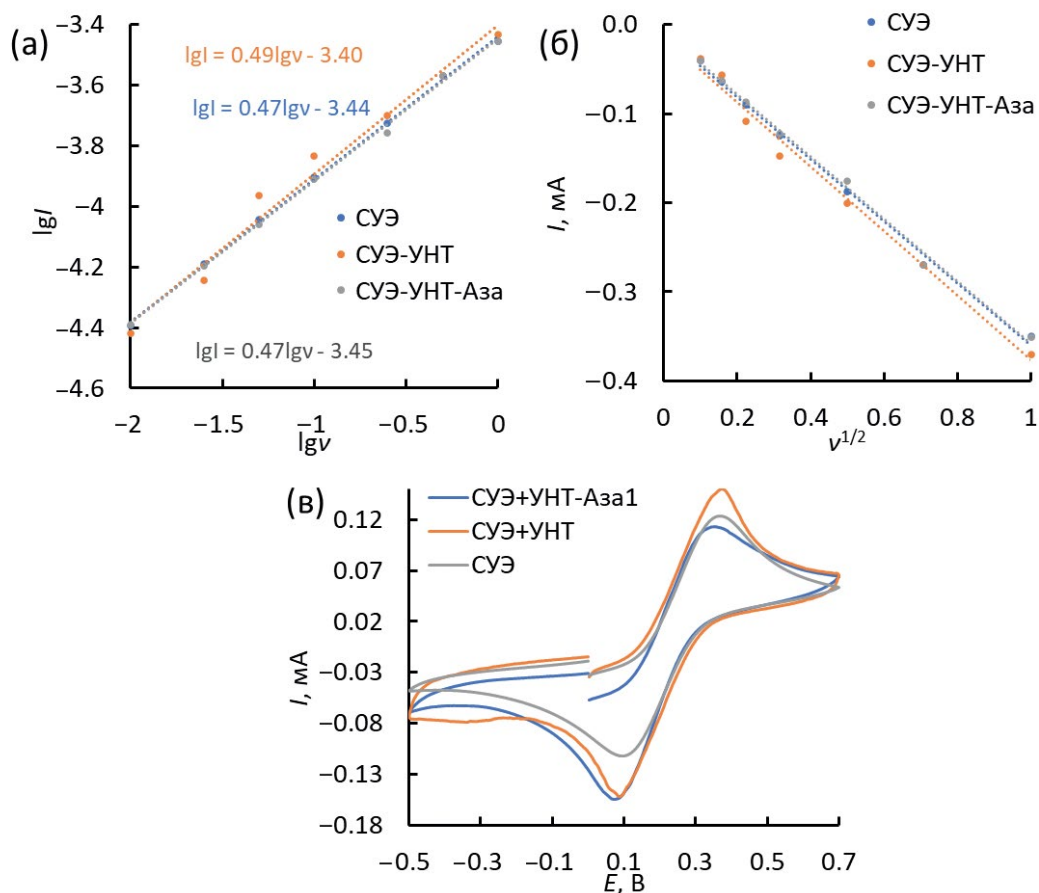


Рис. 5. Зависимости $\lg(I) = f(\lg v)$ (а), $I = f(v^{1/2})$ (б), циклические вольтамперограммы (в), зарегистрированные на стеклоглеродном электроде, модифицированном УНТ и УНТ-Аза1, в растворе 10 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, 0.1M KCl.

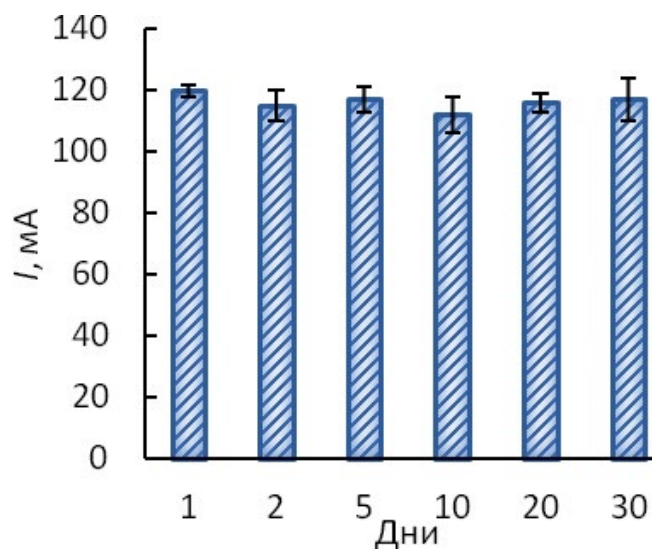


Рис. 6. Диаграммы стабильности стеклоглеродного электрода, модифицированного УНТ-Аза1 в течение 30 дней. Квадратно-волновой режим, фоновый электролит – буферный раствор Бриттона–Робинсона, pH 5.

Модифицирование СУЭ УНТ приводит к увеличению эффективной площади электрода на 16.5% (5.33 и 6.39 mm^2), что обусловлено высокой удельной поверхностью наноматериала. После иммобилизации Аза1 эффективная площадь поверхности уменьшилась на 25% (5.11 mm^2), что свидетельствует о частичном блокировании поверхности электрода азолазином.

Полученные модифицированные наноматериалы характеризуются стабильностью в течение 30 дней с изменением величины электрохимического отклика в период хранения не более чем на 10% (рис. 6).

На рис. 7 приведены КВВ, зарегистрированные до и после инкубации модифицированного электрода в модельной суспензии антигена и антител вируса кори. Закономерное снижение токов катодных пиков указывает на эффективную иммобилизацию биорецептора, которая, вероятно, обусловлена формированием супрамолекулярного комплекса между иммобилизованным на

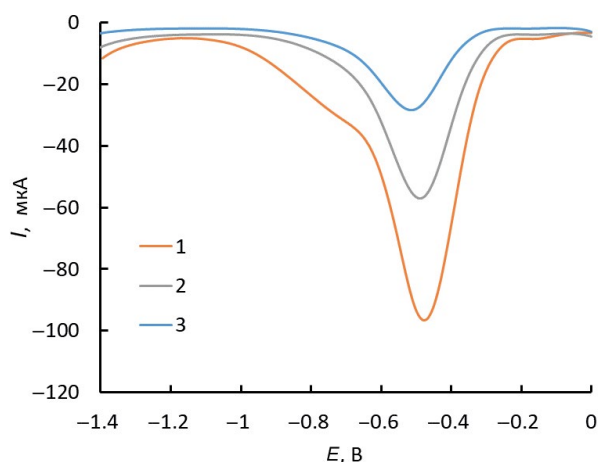


Рис. 7. Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные на СУЭ-УНТ-Аза1 до (1) и после инкубации в модельной суспензии антигена (10^{-3} г/л) (2); антигена и антител к вирусу кори (5 МЕ/мл) (3), фоновый электролит буферный раствор Бриттона–Робинсона, pH 5.

электроде азолазином и поверхностным белком антигена вируса кори гемагглютинином [17].

При выборе рабочих условий варьировали время инкубации модифицированного электрода в суспензии, температуру и pH рабочего раствора. Эффективность оценивали по степени связывания 0.1 мг/л антигена вируса кори.

Установили, что насыщение поверхности происходит при 15-минутном выдерживании модифицированного электрода в суспензии; при увеличении продолжительности контакта значительных изменений сигнала не наблюдали (рис. 8а), поэтому это время выбрали для дальнейших исследований. Варьирование температуры и pH среды показало, что наиболее эффективно реакция протекает при 36°C и pH 5 (рис. 8б, в).

При выборе концентрации антигена (рис. 8г) установили, что I^* линейно зависит от концентрации в диапазоне $1 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-4}$ г/л, после чего происходит значительное увеличение степени

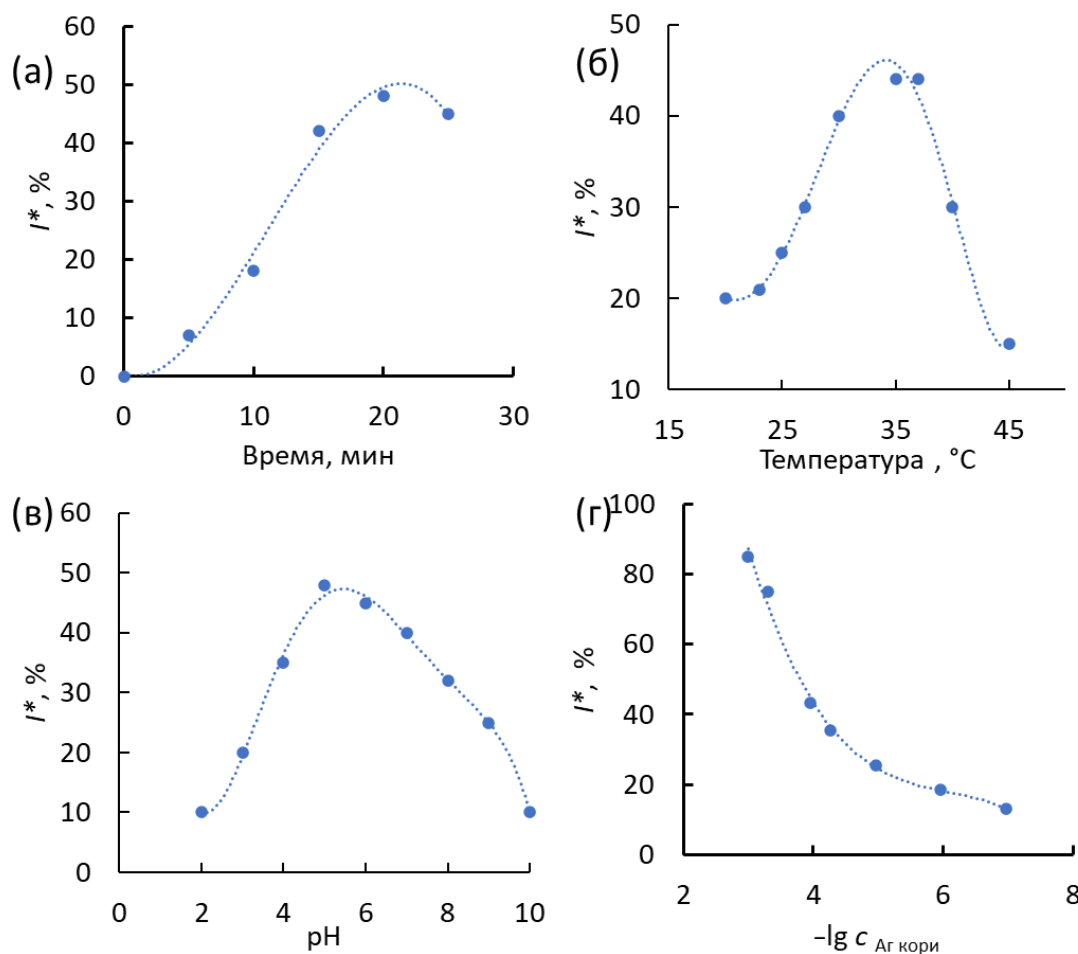


Рис. 8. Выбор рабочих условий: времени инкубации СУЭ-УНТ-Аза1 в суспензии $\text{Ag}_{\text{кори}}$ (а), температуры (б), pH буферного раствора (в), концентрации $\text{Ag}_{\text{кори}}$ (г).

блокирования поверхности. Для дальнейших исследований выбрали концентрацию 5×10^{-4} г/л.

Вольтамперометрическое определение антител вируса кори в модельных суспензиях. В выбранных условиях получили градуировочные зависимости $I^* = f(-\lg c_{\text{АТ}} \text{ кори})$ с использованием модифицированного УНТ-Аза1 электрода и тока пика электровосстановления нитрогруппы в качестве аналитического сигнала, а также модифицированного УНТ электрода с капельно нанесенным рецепторным слоем и детектированием аналитического сигнала по величине тока пика внешнего (диффузионно свободного) окислительно-восстановительно-го индикатора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

В первом случае градуировочная зависимость линейна в диапазоне концентраций антител к вирусу кори 0.1–5.0 МЕ/мл ($I^* (\%) = (17.4 \pm 0.7) \lg c (\text{МЕ/мл}) + (29 \pm 2)$, $R^2 = 0.9653$, $n = 5$, $P = 0.95$), ПО = 0.17 МЕ/мл. Во втором случае линейный диапазон составляет 1.0–5.0 МЕ/мл, ($I^* (\%) = (50 \pm 4) \lg c (\text{МЕ/мл}) + (16 \pm 7)$, $R^2 = 0.951$, $n = 5$, $P = 0.95$), ПО = 0.30 МЕ/мл.

* * *

Таким образом, предложенный способ вольтамперометрического определения антител к вирусу кори с использованием оригинального производного азола позволяет расширить диапазон определяемых концентраций и снизить предел обнаружения по отношению к безметочному иммуносенсору с внешним редокс-индикатором.

Аналитические характеристики предложенного способа не уступают возможностям иммуноферментного анализа и позволяют определять антитела к вирусу кори в клинически значимом диапазоне 0.15–5.0 МЕ/мл.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 20-13-00142-П.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Griffin D.E., Lin W.-H., Pan C.-H. Measles virus, immune control, and persistence // *FEMS Microbiol Rev.* 2012. V. 36. № 3. P. 649.
2. Ratnam S., Gadag V., West R., Burris J., Oates E., Stead F., Bouillianne N. Comparison of commercial enzyme immunoassay kits with plaque reduction neutralization test for detection of measles virus antibody // *J. Clin. Microbiol.* 1995. V. 33. № 4. P. 811.
3. Костинов М. П., Филатов Н. Н., Журавлев П. И., Гладкова Л. С., Полищук В. Б., Шматько А. Д., Пахомов Д. В., Хромова Е. А., Васильева Г. В., Тихонова И. А., Рыжов А. А., Благовидов Д. А., Костинова А. М. Возрастные особенности иммунитета к вирусу кори у работников крупного промышленного комплекса мегаполиса // *Инфекция и иммунитет.* 2020. Т. 10. № 1. С. 129.
4. Mashazi P., Tetyana P., Vilakazi S., Nyokong T. Electrochemical impedimetric immunosensor for the detection of measles-specific IgG antibodies after measles infections // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 49. P. 32.
5. Свалова Т.С., Малышева Н.Н., Бубекова А.К., Сайгушкина А.А., Медведева М.В., Козицина А.Н. Влияние способа иммобилизации рецепторного слоя на аналитические характеристики безметочного электрохимического иммуносенсора для определения антител к вирусу кори // *Журн. аналит. химии.* 2020. Т. 75. № 2. С. 162.
6. Nawaz M.H., Hayat A., Catanante G., Latif U., Marty J.L. Development of a portable and disposable NS1 based electrochemical immunosensor for early diagnosis of dengue virus // *Anal. Chim. Acta.* 2018. V. 1026. P. 1.
7. Parkash O., Yean C., Shueb R. Screen printed carbon electrode based electrochemical immunosensor for the detection of dengue NS1 antigen // *Diagnostics.* 2014. V. 4. P. 165.
8. Dias A.C.M.S., Gomes-Filho S.L.R., Silva M.M.S., Dutra R.F. A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 44. P. 216.
9. Svalova T.S., Medvedeva M.V., Kozitsina A.N. A "Clickable" electrodeposited polymer films based on 3-ethynylthiophene for the covalent immobilization of proteins. Application to a label-free electrochemical immunosensor for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* determination // *Electroanalysis.* 2021. V. 33. P. 2469.
10. Svalova T.S., Medvedeva M.V., Saigushkina A.A., Kozitsin I.V., Malysheva N.N., Zhdanovskikh V.O., Okhokhonin A.V., Kozitsina A.N. 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. V. 412. P. 5077.
11. Raghav R., Srivastava S. Immobilization strategy for enhancing sensitivity of immunosensors: L-Asparagine–AuNPs as a promising alternative of EDC–NHS activated citrate–AuNPs for antibody immobilization // *Biosens. Bioelectron.* 2016. V. 78 P. 396.
12. Charushin V.N., Rusinov V.L., Varaksin M.V., Chupakhin O.N., Kovtun O.P., Spasov A.A. Development of drugs with direct antiviral action based on azaheterocyclic systems // *Her. Russ. Acad. Sci.* 2022. V. 92. № 4. P. 505.
13. Сапожникова И.М., Уломский Е.Н., Русинев В.Л., Чупахин О.Н., Степанов А.В., Саватеева-Любимова Т.Н., Сивак К.В. 3-Цианоазоло[5,1-с][1,2,4]-триазины: синтез и противовирусная активность // *Химия гетероцикл. соед.* 2021. Т. 57. № 4. С. 467. (Sapozhnikova I.M., Ulomsky E.N., Rusinov V.L., Chupakhin O.N., Stepanov A.V., Savateeva-Lyubimova T.N., Sivak K.V. 3-Cyanoazolo[5,1-c][1,2,4] triazines: synthesis and antiviral

- activity // Chem. Heterocycl. Compd. 2021. V. 57. № 4. P. 467.)
14. Ивойлова А.В., Михальченко Л.В., Цмокалюк А.Н., Козицина А.Н., Иванова А.В., Русинов В.Л. Окислительно-восстановительные превращения нового противовирусного препарата Триазавирин®: электрохимическое исследование и ЭПР-спектроскопия* // Изв. АН. Сер. хим. 2021. Т. 70. № 6. С. 1099. (Ivailova A.V., Mikhal'chenko L.V., Tsmokalyuk A.N., Kozitsina A.N., Ivanova A.V., Rusinov V.L. Redox conversions of new antiviral drug Triazavirin®: electrochemical study and ESR spectroscopy* // Russ. Chem. Bull. 2021. V. 70. № 6. P. 1099.)
15. Ivailova A., Mikhalchenko L.V., Tsmokalyuk A., Leonova M., Lalov A., Mozharovskaia P., Kozitsina A.N., Ivanova A.V., Rusinov V.L. Redox Conversions of 5-Methyl-6-nitro-7-oxo-4,7-dihydro-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidinide L-Arginine Monohydrate as a Promising Antiviral Drug // Molecules. 2021. V.26. № 16. P. 5087.
16. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. М.: Химия, 1971. 456 с.
17. Дрокин Р.А., Фесенко Е.А., Можаровская П.Н., Медведева М.В., Свалова Т.С., Козицина А.Н., Есаулкова Ю.Л., Волобуева А.С., Зарубаев В.В., Русинов В.Л. 4-Гидрокси-3-нитро-1,4-дигидротриазоло[5,1-с][1,2,4]-триазины: синтез, противовирусная активность и электрохимические характеристики // Изв. АН. Сер. хим. 2022. Т. 71. № 11. С. 2460. (Drokin R.A., Fesenko E.A., Mozharovskaia P.N., Medvedeva M.V., Svalova T.S., Kozitsina A.N., Esaulkova Y.L., Volobueva A.S., Zarubaev V.V., Rusinov V.L. 4-Hydroxy-3-nitro-1,4-dihydrotriazolo[5,1-c][1,2,4]-triazines: Synthesis, antiviral activity, and electrochemical characteristics // Russ. Chem. Bull. 2022. V. 71. № 11. P. 2460.)
18. Будников Г.К., Майстренко В.Н., Вяселев М.Р. Основы современного электрохимического анализа. М.: Мир: Бином ЛЗ, 2003. 592 с.
19. Bard A.J., Faulkner L.R. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications. N. Y.: John Wiley & Sons, 2001. 864 p.