

## НАНОЧАСТИЦЫ ЗОЛОТА, КОНЬЮГИРОВАННЫЕ С КОМПОНЕНТАМИ КРОЛИЧЬЕЙ ПЛАЗМЫ, ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ КОАГУЛАЗОПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ШТАММОВ *Staphylococcus*

© 2023 г. А. Н. Берлина<sup>1</sup>, \*, В. Н. Копыльцов<sup>2</sup>, М. А. Корниенко<sup>3</sup>, А. В. Жердев<sup>1</sup>, Б. Б. Дзантиев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр  
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

<sup>2</sup>Головной центр гигиены и эпидемиологии Федерального медико-биологического агентства, Москва, 123182 Россия

<sup>3</sup>Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины  
Федерального медико-биологического агентства, Москва, 119435 Россия

\*e-mail: anberlina@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.11.22 г.

После доработки 17.11.22 г.

Принята к публикации 21.11.22 г.

Предложен простой и быстрый качественный метод обнаружения и дифференциации коагулазоположительных и коагулазоотрицательных стафилококков. Первые из них относятся к возбудителям тяжелых заболеваний человека, нередко заканчивающихся летально. Помимо устойчивости к антимикробным препаратам, они несут ряд факторов вирулентности, определяющих тяжелые осложнения. Предлагаемый метод основан на агрегации наночастиц золота, конъюгированных с компонентами кроличьей плазмы, в присутствии коагулазы *Staphylococcus aureus*. В анализе используют обеззараженную на бактериальных фильтрах среду, в которой культивировали *Staphylococcus* ssp. Кроме того, мы провели сравнение наночастиц различного размера — от 10 до 50 нм, — и оптимизировали концентрацию плазмы кролика для конъюгации с наночастицами. Наилучшие результаты получены на наночастицах золота диаметром 30 нм. Время анализа составляет 1 мин, результаты оценивают визуально.

**Ключевые слова:** наночастицы золота, конъюгат, плазма кролика, коагулаза, *Staphylococcus*, коагулазоположительные штаммы, экспресс-анализ

**DOI:** 10.56304/S0234275823010027

Стафилококки — группа грамположительных бактерий, которые в организме человека могут выполнять роль комменсалов или патогена. В норме стафилококки обитают на слизистых оболочках и коже [1]. В то же время золотистый стафилококк относится к основным возбудителям инфекционных заболеваний человека [2]. При снижении защитных барьеров иммунной системы развиваются инфекции различной локализации, вызванные эндогенным стафилококком: инфекционный эндокардит, остеоартрит, поражения кожи и мягких тканей, катетер-ассоциированные инфекции кровотока [2]. Особенно это характерно для иммунокомпрометированных лиц [3]. Довольно большой процент тяжелых воспалительных процессов и инфекций выявляют у пациентов после хирургического лечения, завершившегося установкой имплантата, катетера или протеза. С точки зрения течения процесса наиболее опасны внутрибольничные штаммы *Staphylococcus* spp., часто резистентные к антибиотикам [4]. Метициллин-резистентные штаммы *Staphylococcus aureus* счи-

таются наиболее адаптированными с точки зрения эволюции и выживания в неблагоприятных условиях [5]. В то же время внутрибольничные инфекции, вызванные этим возбудителем, очень трудно поддаются лечению, в том числе антибиотикотерапии.

Для определения *S. aureus* в клинической практике применяют разные методы. При подозрении на бактериальную инфекцию, вызванную золотистым стафилококком, проводят бактериологический посев с одновременным определением чувствительности к антибиотикам. Также используют такие технологии, как полимеразная цепная реакция (ПЦР) [6, 7], микробиологический анализ [8], либо их комбинацию [9]. Антибиотикорезистентность бактерий оценивают по параметру минимальной ингибирующей концентрации (МИК), который рассчитывают по результатам микробиологического метода при выращивании патогена на среде с добавлением антибиотиков [3]. В том случае, когда бактериальный изолят устойчив к традиционно используемому в клинической прак-

тике антибиотикам, очень сложно подобрать адекватную тактику лечения [10].

Еще одна характерная для *Staphylococcus* spp. особенность — образование биопленок, что иногда используют в диагностике [11, 12]. Помимо микробиологического анализа для идентификации штаммов *Staphylococcus* используют инструментальные методы (например, масс-спектрометрию), которые позволяют выявлять эти патогены по составу метаболитов и проводить эпидемиологическое исследование [13, 14].

Разнообразие геномов *Staphylococcus* spp. определяет факторы патогенности и токсины, кодируемые разными штаммами [15, 16]. Наличие геномных элементов, отвечающих за устойчивость к антибиотикам, компонентов иммунитета и фрагментов, ответственных за распространение факторов устойчивости внутри колоний, позволяет этим патогенам выживать в меняющихся условиях. В обзоре Turner и соавт. [5] суммированы основные генетические факторы вирулентности и лекарственной устойчивости *Staphylococcus* spp. Так, в *S. aureus* одним из них считается коагулаза; причем кодирующий ее ген входит в состав основного генома этой бактерии. Опасность коагулазы заключается в присущей ее способности активировать повышение свертываемости крови с развитием тромбоза. Этот фермент, не взаимодействуя напрямую с фибриногеном, индуцирует связывание тромбинподобного соединения с протромбином [17]. Определение коагулазы важно для принятия решений терапевтического характера. Crosby и др. [18] подробно обсуждали механизм взаимодействия коагулазы с протромбином. Образование фибриновых сгустков позволяет отличить патогенные штаммы *S. aureus* от менее патогенных — например, коагулазоотрицательных *Staphylococcus* spp. [19], что используется при проведении коагулазного теста. Его сочетание с маннитол-солевым агаром повышает специфичность и чувствительность идентификации *Staphylococcus* spp. [20].

Ранее A. Fisk [21] продемонстрировал возможность использования коагулазного теста для выявления патогенных стафилококков. В свое время были разработаны первые аналитические системы для детекции коагулазы *in vitro* [22]. Традиционно для проведения коагулазного теста используют кроличью или человеческую плазму, но недавно продемонстрирована возможность применения плазмы других животных для этой цели [23].

Востребованность экспресс-теста на коагулазу обусловлена большим потоком пациентов со стафилококковыми инфекциями [24]. Разработка новых диагностикумов с использованием, например наночастиц, приведет к возможности выявлять и дифференцировать возбудители с определенными свойствами.

Для разработки новых тест-систем проводят выбор специфической молекулы, которая связывается как с возбудителем, так и с носителем, например с наночастицей [25]. Для этой цели предложены магнитные [26], золотые [27], серебряные [28] наночастицы, кремнезем [29], Cu-содержащие металлоорганические каркасы (Cu-MOF) [30] и др. Применение модифицированных наночастиц позволяет определять *Staphylococcus* spp. [27, 30] и их структурные компоненты: ДНК [31], рибосомный белок L7/L12 [32], — а также продукты их жизнедеятельности: белок А [33], энтеротоксин В [34] и другие.

Ранее, при разработке агрегационных схем анализа, нами продемонстрированы преимущества использования наночастиц золота [35, 36]. В качестве молекул для селективного связывания стафилококков используют антитела [37], аптамеры [38, 39], белки и фрагменты полисахаридов. Распознавание специфических белков или секретируемых ферментов стафилококка служит основой для разработки селективных аналитических тест-систем. Так, прямое определение специфических токсинов [40], фермента бета-лактамазы [41] или коагулазы [42, 43] позволяет обнаружить стафилококк и сделать вывод о его устойчивости к антибиотикам и отнести его к определенному штамму.

Целью исследования была разработка экспресс-метода для качественного определения коагулазы патогенных штаммов *S. aureus* в фильтрованной культуральной среде. Для этого были синтезированы наночастицы золота разного размера и конъюгированы с компонентами кроличьей плазмы. Результат теста считали положительным при изменении цвета наночастиц или при их агрегации с образованием окрашенных хлопьев.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Материалы

В работе использованы следующие реагенты: гидрат хлорида золота (III) (Fluka, США); дигидрат цитрата натрия, трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich, США); сухая кроличья плазма во флаконах (ЗАО “Эколаб”, Россия); рекомбинантный белок А (“Имтек”, Россия). Вода Milli-Q с сопротивлением 18.3 МΩ·см при 22°C была получена на фильтрующем оборудовании Millipore (Millipore, США) и использована для приготовления всех растворов.

Для анализа использовали 96-луночные микропланшеты Corning Costar (#1237010; Costar, США) и пластиковые пробирки объемом 1.5 мл (Eppendorf, Германия).

Штаммы *Staphylococcus* spp. (табл. 1) были получены из коллекции лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ФНКЦ физико-хи-

**Таблица 1.** Характеристика штаммов *Staphylococcus* spp., использованных в работе  
**Table 1.** Characterization of *Staphylococcus* spp. strains used

Номер	Штамм	Источник выделения	Клинический диагноз	ТИП*
2242	<i>S. aureus</i>	Кости и суставы	Остеомиелит	MRSA
2341	<i>S. aureus</i>	Кости и суставы	Остеомиелит	MSSA
293	<i>S. aureus</i>	Кровь	Сепсис	MSSA
421	<i>S. haemolyticus</i>	Горло	Врожденная пневмония	MRCNS

*Примечание:* \*MRSA – метициллинрезистентный (коагулазоположительный) штамм; MSSA – метициллинчувствительный (коагулазоположительный) штамм; MRCNS – метициллинрезистентный (коагулазоотрицательный) штамм.  
*Note:* \*MRSA, methicillin-resistant (coagulase-positive) strain; MSSA, methicillin-sensitive (coagulase-positive) strain; MRCNS is a methicillin-resistant (coagulase-negative) strain.

мической медицины ФМБА России. Предварительно бактерии растили на триптон-соевом бульоне (TSB) (Oxoid, Австралия) и характеризовали по патогенности, как описано ранее [44]. Питательную среду, полученную в результате культивирования каждого штамма, фильтровали с использованием шприцевых фильтров Millipore с диаметром пор 0.22 мкм (Millipore).

#### Оборудование

Для синтеза конъюгатов использовали шейкер IntelliMixer (ELMI, Латвия). Спектры поглощения золотых наночастиц и их конъюгатов с компонентами кроличьей плазмы измеряли на спектрофотометре Biochrom Libra S80 (Biochrom, Великобритания). Морфологию наночастиц анализировали методом просвечивающей электронной микроскопии с использованием электронного микроскопа JEM CX-100 (JEOL, Япония). Спектры наночастиц золота и их конъюгатов с компонентами кроличьей плазмы регистрировали на спектрофотометре Shimadzu (Shimadzu, Япония) в ультрафиолетовом и видимом спектрах. Оптическую плотность в лунках микропланшета измеряли при 595 нм на приборе ZENYTH 3100 (Anthos Labtec Instruments GmbH, Австрия).

#### Получение наночастиц золота

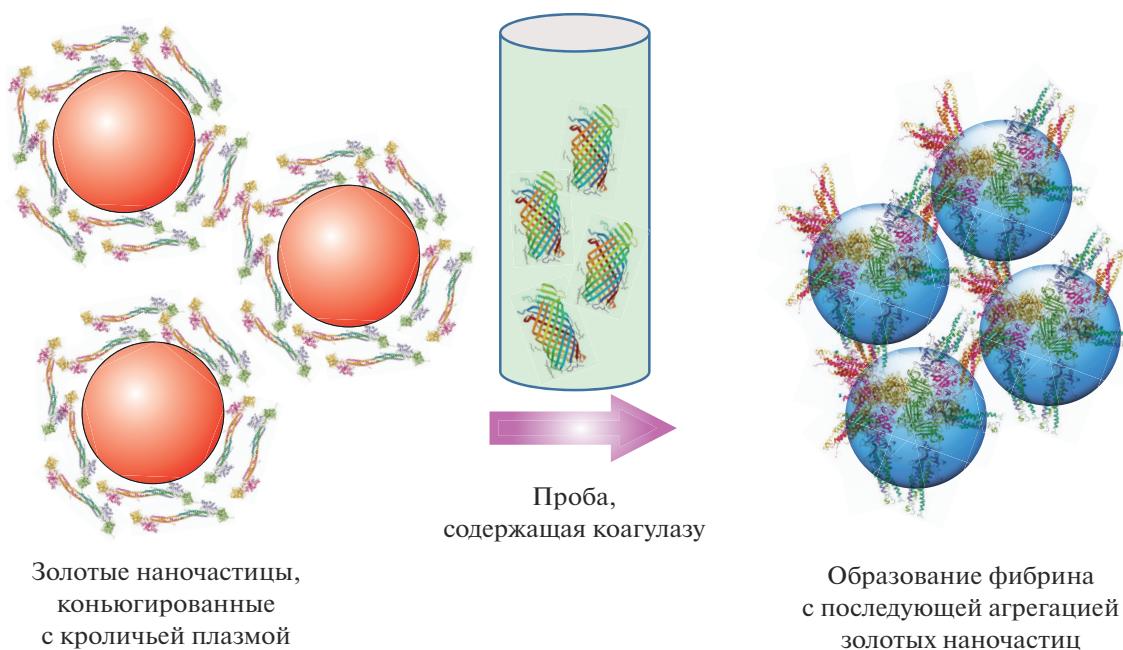
Сферические наночастицы золота размером 30 нм (НЧЗ-30) были синтезированы восстановлением раствора  $\text{HAuCl}_4$  цитратом натрия [45, 46] с модификациями. В кипящий раствор, содержащий 0.2 мл 5%-ного  $\text{HAuCl}_4$  в 97.5 мл деионизированной воды, вносили 1.5 мл 1%-ного цитрата натрия и кипятили в течение 25 мин. Для частиц размером 10, 15, 20 и 50 нм (НЧЗ-10, НЧЗ-15, НЧЗ-20 и НЧЗ-50 соответственно) использовали следующие объемы 1%-ного раствора цитрата натрия: 6, 4, 2 и 0.75 мл соответственно. Реакционную смесь охлаждали при комнатной температуре и хранили при 4–6°C.

#### Построение изотермы адсорбции

Изотерму адсорбции строят для определения оптимального количества белка, в данном случае компонентов кроличьей плазмы, способного стабилизировать наночастицы золота [47]. К 50 мкл водного раствора кроличьей плазмы, взятой в различных разведениях (от 0 до  $5 \times 10^3$ ), добавляли 500 мкл суспензии наночастиц ( $\text{OD}_{525}$  1.0), перемешивали и инкубировали 10 мин при комнатной температуре, после чего вносили 50 мкл 10%-ного раствора NaCl, перемешивали и через 10 мин измеряли оптическую плотность при длине волны 580 нм. Зависимость величины  $\text{OD}_{580}$  от разведения кроличьей плазмы отражает агрегацию полученного конъюгата при высокой ионной силе раствора. На основании полученной изотермы адсорбции выбирали разведение кроличьей плазмы, оптимальное для конъюгации с наночастицами золота.

#### Получение конъюгата наночастиц золота с компонентами кроличьей плазмы

Получение конъюгатов проводили по ранее опубликованной методике [47] с небольшими модификациями. Свежеприготовленные наночастицы золота помещали в стеклянные сосуды с выбранным на основе изотермы адсорбции разведением кроличьей плазмы. Смесь инкубировали 30 мин при 20–22°C при перемешивании, после чего добавляли 10%-ный водный раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) до конечной концентрации 0.25% и выдерживали в течение ночи при 4°C. После этого конъюгаты очищали от несвязавшихся компонентов плазмы и БСА центрифугированием при 19357 g при 4°C в течение 15 мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 10 мМ Tris-HCl (pH 9.0), содержащем 0.25% БСА, 0.1% Твин-20 и 0.05%  $\text{NaN}_3$ . Препараты конъюгатов хранили при 4–6°C.



**Рис. 1.** Схема разработанного анализа для детекции коагулазоположительных штаммов *Staphylococcus* spp. Метод основан на агрегации наночастиц золота, конъюгированных с компонентами кроличьей плазмы, в состав которой входит фибриноген, под действием коагулазы, содержащейся в культуральной жидкости коагулазоположительных штаммов *Staphylococcus*.

**Fig. 1.** The scheme of the developed analysis for the detection of coagulase-positive strains of *Staphylococcus* spp. The method is based on the aggregation of gold nanoparticles conjugated with the components of rabbit plasma, which includes fibrinogen, under the action of coagulase contained in the culture medium of coagulase-positive *Staphylococcus* spp.

#### *Электронная микроскопия наночастиц*

Для проведения измерений 5 мкл наночастиц золота или их конъюгатов наносили на сетки 300 меш (Pelco International, США), покрытые поливинилформальную пленкой, осажденной из  $\text{CHCl}_3$ , для фиксации анализируемого образца. Образцы исследовали на электронном микроскопе JEM CX-100 (JEOL) в рабочем режиме 80 кВ. Полученные микроизображения сканировали на оборудовании CanoScan 9000F MarkII (Canon, Япония) и анализировали с использованием программного обеспечения Image Tool (University of Texas Health Science Center, США).

#### *Детекция коагулазы в культуральной среде Staphylococcus spp.*

Конъюгированные с компонентами кроличьей плазмы наночастицы разводили до оптической плотности 1.0 ( $\text{OD}_{595}$ ) и вносили по 100 мкл в лунки микропланшета или в микропробирки. При комнатной температуре к суспензии добавляли 10 мкл одного из следующих компонентов: фильтрованной культуральной среды *Staphylococcus* spp., раствора белка А (500, 250, 125 или 62.5 мкг/мл), конъюгата золотых наночастиц с белком А или

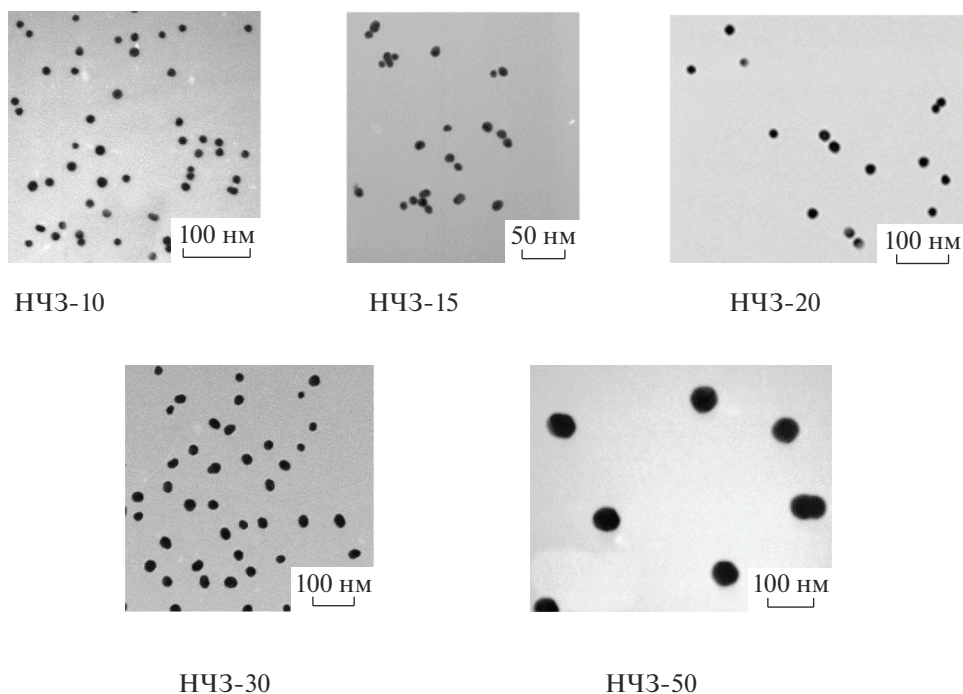
воды — и сразу измеряли оптическую плотность при длине волны 595 нм.

Положительным считали результат, при котором происходило образование хлопьев или изменение цвета реакционной смеси.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Принцип метода*

Принцип предложенного нами метода представлен на рис. 1. Наночастицы золота, конъюгированные с компонентами кроличьей плазмы, содержащей в том числе фибриноген, находятся в виде стабильной суспензии в буферном растворе. При добавлении культуральной среды, содержащей коагулазу, происходит каскадное взаимодействие фермента с фибриногеном с образованием нерастворимого фибрина. При формировании межмолекулярных связей между фибрин-мономерами, образовавшимися в результате расщепления коагулазой фибриногена, в фибриллы вовлекаются и наночастицы золота — как носители компонентов плазмы. Этот процесс сопровождается появлением окрашенных хлопьев, состоящих из конъюгата и фибрина, и изменением окраски коллоида. Эти “метаморфозы” происходят в тече-



**Рис. 2.** Просвечивающая электронная микроскопия образцов синтезированных наночастиц разного диаметра: 10 (НЧЗ-10), 15 (НЧЗ-15), 20 (НЧЗ-20), 30 (НЧЗ-30) и 50 (НЧЗ-50) нм.

**Fig. 2.** Transmission electron microscopy of the synthesized nanoparticles of different diameters: 10 (GNP-10), 15 (GNP-15), 20 (GNP-20), 30 (GNP-30) and 50 (GNP-50) nm.

ние первой минуты с момента начала взаимодействия конъюгированных с компонентами кроличьей плазмы наночастиц и коагулазы культуральной среды *Staphylococcus* spp.; причем их можно детектировать визуально.

*Синтез и характеристика наночастиц, конъюгированных с компонентами кроличьей плазмы*

Для разработки описанного выше анализа были синтезированы наночастицы, для чего использовали метод восстановления  $\text{HAuCl}_4$  цитратом натрия. При варьировании концентраций цитрата натрия получили частицы со средним диаметром 10, 15, 20, 30 и 50 нм. Эти препараты охарактеризованы методом просвечивающей электронной микроскопии (рис. 2). Средний диаметр наночастиц составил  $11.3 \pm 2.3$ ,  $15.0 \pm 3.8$ ,  $21.4 \pm 3.5$ ,  $31.4 \pm 3.9$  и  $46.7 \pm 4.9$  нм. В препаратах отсутствовали агрегаты и форма наночастиц была близка к сферической.

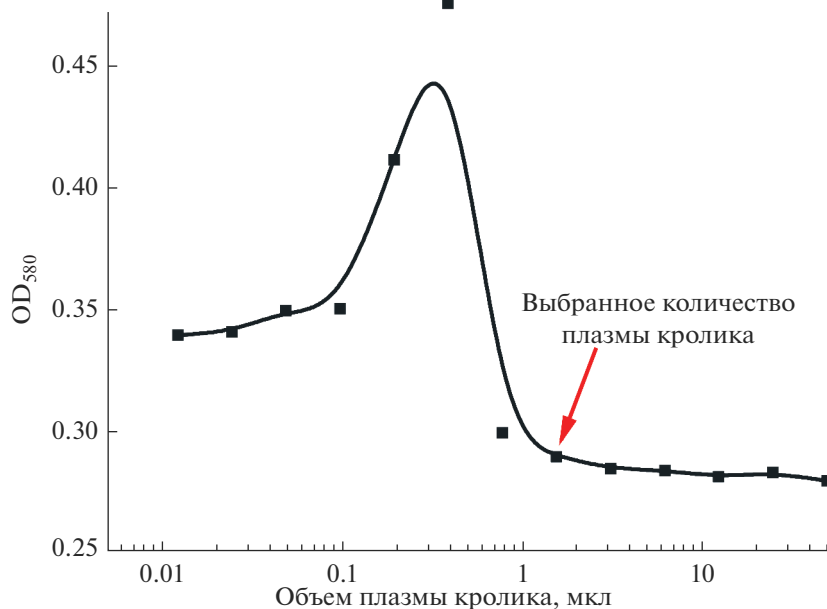
Сразу после синтеза наночастицы конъюгировали с компонентами кроличьей плазмы — во избежание потерь из-за снижения стабильности при хранении. Оптимальную концентрацию плазмы для покрытия наночастиц золота определяли по изотерме адсорбции, полученной после добавления к конъюгатам раствора соли — натрия хлорида (рис. 3). При недостаточном количестве ком-

понентов плазмы и, следовательно, низкой степени стабилизации поверхности наночастицы агрегировали в растворе соли. В этом случае значения  $\text{OD}_{580}$  были выше, чем для наночастиц, взаимодействовавших с плазмой кролика, взятой в меньших концентрациях (рис. 3: пик при разведении плазмы в интервале от 500 (0.1 мкл в 50 мкл водного образца) до 50 (1 мкл/50 мкл) раз и плато при разведении в  $\sim 33$  раза (1.5 мкл/50 мкл)). На основании анализа изотермы адсорбции для стабилизации наночастиц золота был выбран объем плазмы кролика 1.5 мкл, соответствующий разведению в буфере 1 : 150.

Все препараты наночастиц и их конъюгатов с компонентами кроличьей плазмы были охарактеризованы спектрофотометрически: определены максимумы поглощения в диапазоне длин волн 520–540 нм, а также оптическая плотность конъюгатов после очистки и концентрирования. В табл. 2 представлены данные для всех препаратов наночастиц, в том числе их конъюгатов с белком А.

*Использование золотых наночастиц, конъюгированных с компонентами кроличьей плазмы, для детекции коагулазы*

Все препараты наночастиц, конъюгированных с компонентами кроличьей плазмы, использовали для детекции коагулазы в фильтрованных



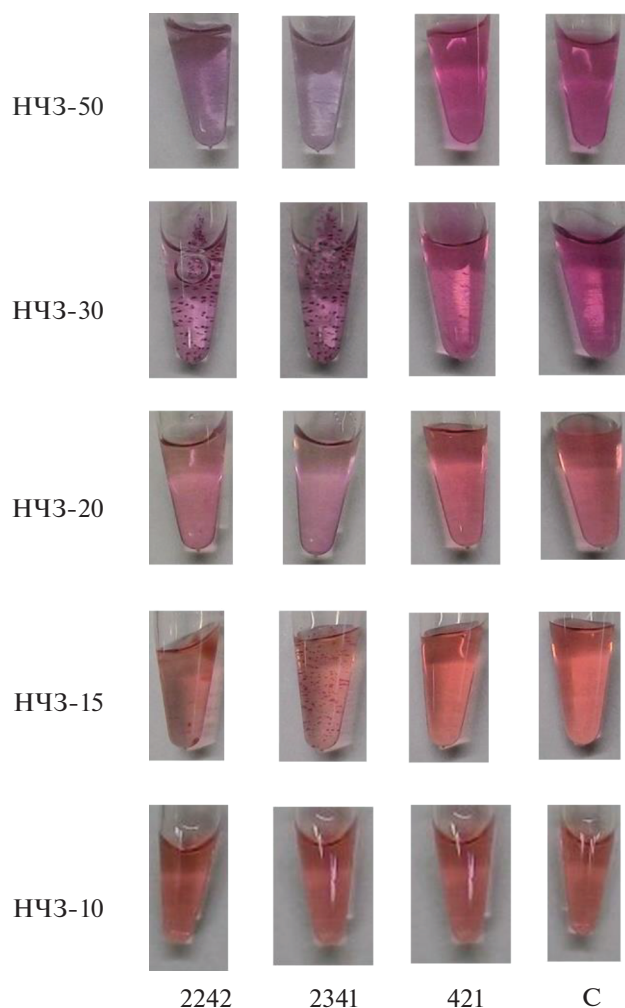
**Рис. 3.** Изотерма адсорбции, построенная для выбора оптимального разведения плазмы кролика для покрытия наночастиц золота (НЧЗ-30). Указан объем плазмы в 50 мкл водного раствора, то есть разведение по оси абсцисс в 5000, 500, 50 и 5 раз соответственно.

**Fig. 3.** Isotherm of adsorption constructed to select the optimal dilution of rabbit plasma for coating gold nanoparticles (GNP-30). The volume of plasma in 50  $\mu\text{L}$  of an aqueous solution is indicated, i.e. dilution along the abscissa axis by 5 000, 500, 50, and 5 times, respectively.

**Таблица 2.** Характеристика препаратов наночастиц золота и их конъюгатов  
**Table 2.** Characteristics of gold nanoparticles preparations and their conjugates

Наночастицы	Длина волны максимального поглощения, нм	OD*
<i>Наночастицы золота</i>		
НЧЗ-10	520–521	1.17
НЧЗ-15	518–519	1.17
НЧЗ-20	525–526	1.19
НЧЗ-30	527–528	1.32
НЧЗ-50	533–534	1.32
<i>Конъюгаты наночастиц с компонентами кроличьей плазмы</i>		
НЧЗ-10	524–525	6.68
НЧЗ-15	524–525	5.59
НЧЗ-20	525–526	3.14
НЧЗ-30	530–531	8.14
НЧЗ-50	538–540	6.8
<i>Конъюгаты наночастиц с белком А</i>		
НЧЗ-10	523–524	5.66
НЧЗ-30	529–530	8.21

*Примечание:* \*Оптическую плотность определяли при соответствующем максимуме поглощения для выбранного конъюгата.  
*Note:* \*The optical density was determined at the corresponding absorption maximum for the selected conjugate.



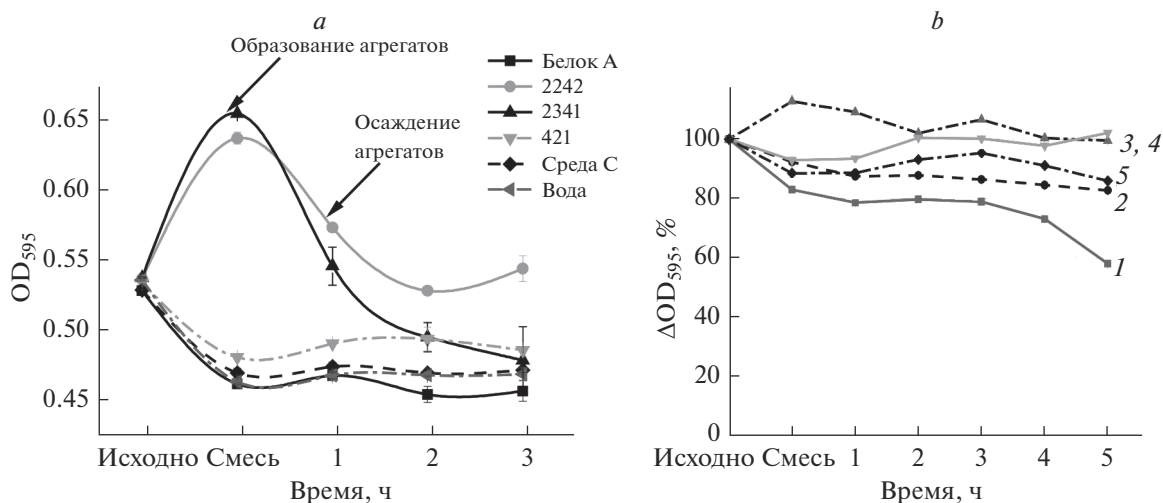
**Рис. 4.** Анализ возможности использования золотых наночастиц, конъюгированных с компонентами кроличьей плазмы, для детекции коагулазоположительных штаммов *Staphylococcus* по наличию коагулазы в культуральной среде. Обозначения штаммов см. в табл. 1: 2242 и 2241 – коагулазоположительные штаммы *Staphylococcus*, 421 – коагулазоотрицательный штамм. С – чистая культуральная среда.

**Fig. 4.** Analysis of the possibility of using gold nanoparticles conjugated with components of rabbit plasma for the detection of coagulase-positive strains of *Staphylococcus* spp. by the presence of coagulase in the culture medium. Designations of strains, see tabl. 1: 2242 and 2241 are coagulase-positive strains of *Staphylococcus*, and 421 is a coagulase-negative strain. С, pure culture medium.

культуральных средах *Staphylococcus* spp. В связи с тем, что аналогичных работ в литературе не представлено, мы проанализировали реакцию наночастиц разного размера при добавлении сред коагулазоположительных стафилококков (положительный контроль), коагулазоотрицательных стафилококков, исходной культуральной среды, а также белка А и конъюгатов наночастиц с белком А (отрицательные контроли). Отметим, что при добавлении культуральных сред штаммов 2241 и 2341 (табл. 1) к конъюгированным с кроличьей плазмой НЧЗ-50, -30 и -20 происходило незамедлительное изменение цвета реакционной среды (коллоида), наблюдаемое невооруженным глазом (рис. 4). Однако для препаратов НЧЗ-50 и -20 цвет изменялся из-за агрегации наночастиц, в то

время как с НЧЗ-30 происходило формирование крупных хлопьев. Конъюгат самых маленьких частиц в этом исследовании, НЧЗ-10, визуально не изменялся. Препарат НЧЗ-15 при добавлении сред коагулазоположительных стафилококков агрегировал в хлопья, но изменений цвета не происходило. Важно заметить, что во всех случаях внесение в препараты наночастиц, конъюгированных с кроличьей плазмой, чистой культуральной среды или коагулазоотрицательного стафилококка (421) не приводило к изменениям ни цвета, ни структуры среды.

Как видно из рис. 4, наиболее наглядное изменение реакционной среды происходит с конъюгатами НЧЗ-30 и -50. В первом случае образу-



**Рис. 5.** Кинетика изменений оптической плотности образцов при инкубации наночастиц золота, конъюгированных с кроличьей плазмой, с различными средами. *a* – К конъюгированным с кроличьей плазмой НЧЗ-30 добавляли культуральные среды штаммов *Staphylococcus*, конъюгат НЧЗ-30 с белком А, чистую среду (С) или воду. *b* – Культуральную среду коагулазоположительного штамма *S. aureus* (2242) вносили в образцы конъюгированных с кроличьей плазмой наночастиц золота разного размера: НЧЗ-50 (1), НЧЗ-30 (2), НЧЗ-20 (3), НЧЗ-15 (4), НЧЗ-10 (5).

**Fig. 5.** Kinetics of changes in the optical density of samples upon incubation of gold nanoparticles conjugated with rabbit plasma with various media. *a* – GNP-30 conjugated with rabbit plasma was supplemented with culture media of *Staphylococcus* spp., GNP-30 conjugate with protein A, pure medium (C), or water. *b* – Culture medium of the coagulase-positive strain *S. aureus* (2242) was added to samples of rabbit plasma-conjugated gold nanoparticles of different sizes: GNP-50 (1), GNP-30 (2), GNP-20 (3), GNP-15 (4), GNP-10 (5).

щиеся хлопья яркие, крупные и хорошо видны невооруженным глазом. Во втором – наблюдали быстрое изменение цвета, образование агрегатов и быстрое обесцвечивание надсадочной жидкости. Кроме того, при хранении конъюгатов с плазмой наибольшая стабильность обнаружена для наночастиц размером 30 нм (данные не представлены).

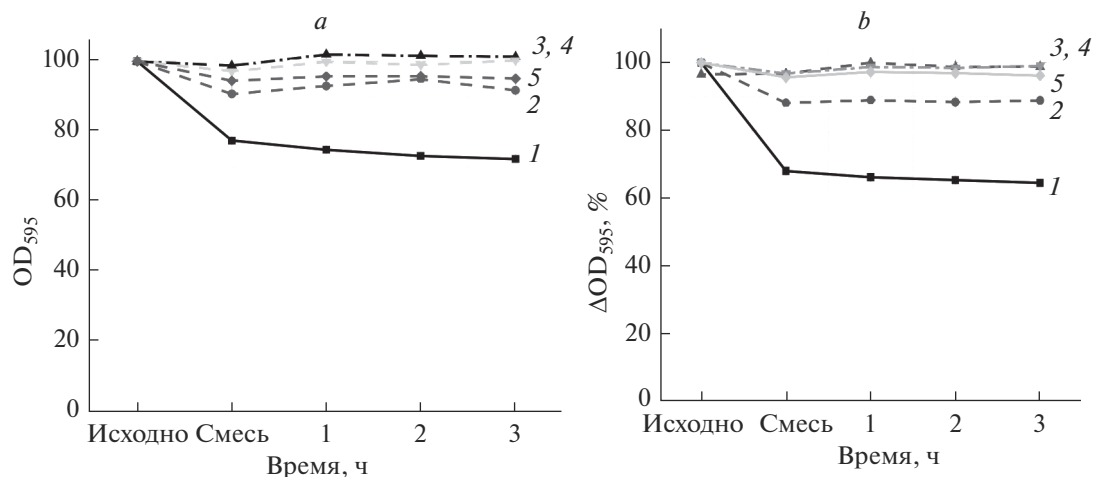
Кинетику изменения сигнала определяли спектрофотометрически при добавлении фильтрованных питательных сред и раствора белка А к конъюгатам. На рис. 5*a* видно, что резкий скачок оптической плотности происходит только при взаимодействии конъюгатов наночастиц с культуральной средой коагулазоположительных штаммов стафилококков (2341 и 2242). Увеличение оптической плотности происходит резко в первую минуту после добавления питательной среды, затем она снижается, что связано с выпадением в осадок образовавшихся комплексов наночастиц и формированием крупных нестабильных агрегатов. При наблюдении за изменениями, происходящими с реакционными смесями в интервале от нескольких часов до суток, обнаружено, что формирование хлопьев либо изменение цвета реакционной среды происходило в течение первой минуты. В ходе наблюдения за коллоидами обнаружена их высокая стабильность и отсутствие колебаний оптической плотности при измерении в течение 22 ч (период наблюдения). С учетом кинетики изменения оптического сигнала время

анализа было выбрано равным 1 мин. Это позволяет зарегистрировать максимальную оптическую плотность до стадии, когда начинается самопроизвольное осаждение комплексов конъюгатов из реакционной среды после взаимодействия с коагулазой в соответствующих средах после добавления коагулазоположительных *Staphylococcus* spp. (рис. 5*b*).

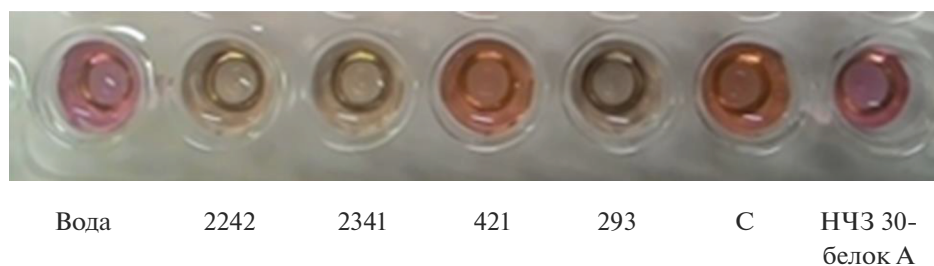
#### Анализ специфичности метода

Для понимания селективности взаимодействия конъюгатов золотых наночастиц с коагулазой в жидкой культуральной среде была исследована стабильность конъюгатов наночастиц золота разного размера с компонентами кроличьей плазмы. Для этого к конъюгатам добавляли среду культивирования непатогенного штамма *S. haemolyticus* и чистую среду. Как видно из данных, представленных на рис. 6, ни одна из этих сред не вызывала изменений оптической плотности конъюгированных с кроличьей плазмой наночастиц в течение времени наблюдения (3 ч). Следует заметить, что в лунках с конъюгированными с плазмой кролика 50-нм наночастицами наблюдали образование осадка и, как следствие, снижение оптической плотности на 20% уже через 1 ч хранения при комнатной температуре – еще до введения контрольных сред. В связи с тем, что этот самопроизвольный процесс будет искажать интерпретацию ре-





**Рис. 6.** Кинетика изменений оптической плотности препаратов конъюгированных с кроличьей плазмой наночастиц при внесении среды культивирования коагулазоотрицательного *S. haemolyticus*, штамм 421 (a); чистой среды С для роста *Staphylococcus* spp. (b). В анализе использованы конъюгированных с кроличьей плазмой НЧЗ-50 (1), НЧЗ-30 (2), НЧЗ-20 (3), НЧЗ-15 (4), НЧЗ-10 (5).  
**Fig. 6.** Kinetics of changes in optical density of preparations of nanoparticles conjugated with rabbit plasma upon introduction of the cultivation medium of coagulase-negative *S. haemolyticus*, strain 421 (a); pure medium C for the growth of *Staphylococcus* spp. (b). The gold nanoparticles conjugated with rabbit plasma, GNP-50 (1), GNP-30 (2), GNP-20 (3), GNP-15 (4), GNP-10 (5), were used.



**Рис. 7.** Анализ специфичности метода. Показаны лунки микропланшета, заполненные препаратом конъюгированных с кроличьей плазмой НЧЗ-30, в которые внесены фильтрованные среды культивирования коагулазоположительных (2242 и 2241) и коагулазоотрицательного (421) штаммов *Staphylococcus*, вода, чистая среда С и конъюгированные с белком А НЧЗ 30.  
**Fig. 7.** The analysis of specificity. There are microplate wells with rabbit plasma conjugated to GNP-30 shown after the addition of filtered culture media of coagulase-positive (2242 and 2241) and coagulase-negative (421) strains of *Staphylococcus*, water, pure medium C and GNP-30 conjugated with protein A.

зультатов анализа, 50-нм наночастицы золота были исключены из дальнейших исследований.

На основании полученных результатов для дальнейшего анализа был выбран конъюгат НЧЗ-30. Как видно из данных, представленных на рис. 7, при внесении отфильтрованных питательных сред коагулазоположительных штаммов 2242 и 2341 в лунки микропланшета с препаратом этих наночастиц изменяется как структура, так и цвет образцов.

Таким образом, можно сделать вывод, что взаимодействие конъюгатов наночастиц золота со средой культивирования коагулазоположительных штаммов *Staphylococcus* носит специфический характер, а результат можно регистрировать как ви-

зуально (рис. 4), так и оптическими методами (рис. 5).

Проведено сравнение результатов, полученных нами, с описанными в литературе. За основу взяты литературные данные по использованию наночастиц для детекции патогенных штаммов *S. aureus*. Основное отличие между предложенными тест-системами состоит в цели определения – как целых клеток, так и конкретных маркеров: ферментов, факторов агрессии, ДНК, специфических белков, определяющих принадлежность к *S. aureus*. Стоит отметить, что в случае использования золотых наночастиц размером 20 нм описаны разработки по определению белка А и рибо-

сомного белка L7/L12 *Staphylococcus* spp. методом иммунохроматографии [33]. При обнаружении целевого аналита наблюдалось формирование окрашенной полосы в тестовой зоне мембраны с иммобилизованными специфическими антителами. Апробацию разработанной тест-системы проводили на чистых бульонных культурах и клинических образцах молока при стафилококковом мастите. В этой работе наночастицы использовали в качестве носителя антитела, распознающего целевой белок. Сочетание золотых наночастиц с магнитными применяли для определения протеолитической активности *S. aureus* [48]. Механизм взаимодействия заключался в гидролизе пептида, находящегося на магнитных шариках и золотых наночастицах; при диссоциации комплексов происходило окрашивание поверхности сенсора в золотистый цвет. Золотые наностержни с платиновым покрытием были применены при разработке флуориметрического анализа на основе аптамера в качестве распознающего элемента для обнаружения стафилококкового энтеротоксина [34]. Апробацию проводили на образцах молока с добавлением энтеротоксина в среду определения. Еще в одной работе [31] использовали светорассеивающие свойства золотых наночастиц, усиленных серебром.

Таким образом, исследование по получению конъюгированных с плазмой кролика наночастиц золота и их применению для специфической детекции коагулазоположительных штаммов бактерий проведено впервые. В описанных ранее работах использовали в основном частицы диаметром 20 нм, причем оптимизации по размерам наночастиц не проводили.

Разработанная методика для детекции коагулазоположительных штаммов *Staphylococcus* и дифференциации их от коагулазоотрицательных отличается простотой, быстротой и селективностью. Метод основан на использовании конъюгированных с компонентами кроличьей плазмы наночастиц золота, которые агрегируют и образуют крупные хлопья в присутствии коагулазосодержащей среды, полученной после культивирования в ней соответствующих штаммов *Staphylococcus*. Благодаря практически мгновенным изменениям (в течение первой минуты) в структуре и окрашивании реакционной среды в случае положительного результата, которые можно детектировать визуально, время анализа сведено к минимуму. Этот качественный метод обнаружения коагулазоположительных *Staphylococcus* spp. имеет перспективы использования в клинической практике с возможностью выявления наблюдаемых изменений вне лаборатории.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00370;

синтез и характеристика наночастиц золота разного размера, конъюгированных с компонентами кроличьей плазмы) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (применение полученных конъюгатов в гомогенном анализе фильтрованных культуральных сред).

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность С.М. Придворовой (Институт биохимии имени А.Н. Баха Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук) за помощь в получении микрофотографий наночастиц.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Parlet C.P., Brown M.M., Horswill A.R. Commensal staphylococci influence *Staphylococcus aureus* skin colonization and disease. *Trends Microbiol.*, 2019, 27(6), 497–507. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.01.008>
2. Tong S.Y.C., Davis J.S., Eichenberger E., Holland T.L., Fowler Jr. V. G. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2015, 28(3), 603–661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
3. Kristóf K., Kocsis E., Szabó D., Kardos S., Cser V., Nagy K., Hermann P., Rozgonyi F. Significance of methicillin–teicoplanin resistant *Staphylococcus haemolyticus* in bloodstream infections in patients of the Semmelweis University hospitals in Hungary. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2011, 30(5), 691–699. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-1142-5>
4. Chambers H.F., DeLeo F.R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009, 7(9), 629–641. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2200>
5. Turner N.A., Sharma-Kuinkel B.K., Maskarinec S.A., Eichenberger E.M., Shah P.P., Carugati M., Holland T.L., Fowler V.G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2019, 17(4), 203–218. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>
6. Brakstad O.G., Aasbakk K., Maeland J.A. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30(7), 1654–1660. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.7.1654-1660.1992>
7. Galia L., Ligozzi M., Bertoncelli A., Mazzariol A. Real-time PCR assay for detection of *Staphylococcus aureus*, panton-valentine leucocidin and methicillin resistance directly from clinical samples. *AIMS Microbi-*

- ol.*, 2019, 5(2), 138.  
<https://doi.org/10.3934/microbiol.2019.2.138>
8. Appelbaum P.C. Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin. Inf. Dis.*, 2007, 45(Supp. 3), S165–S170.  
<https://doi.org/10.1086/519474>
  9. Yoon J.-H., Wei S., Oh D.-H. A highly selective enrichment broth combined with real-time PCR for detection of *Staphylococcus aureus* in food samples. *LWT*, 2018, 94, 103–110.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.054>
  10. Pérez-Sancho M., Alvarez-Perez S., Garcia-Seco T., Hernandez M., Rodríguez-Lázaro D., Domínguez L., García M.E., Blanco J.L. Antimicrobial resistance of coagulase-positive *Staphylococcus* isolates recovered in a Veterinary University Hospital. *Antibiotics*, 2020, 9(11), 752.  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9110752>
  11. Hao Z., Guo Y., Rao L., Yu J., Zhan Q., Xu Y., Wang B., Wu X., Yu F. Deletion of SarX decreases biofilm formation of *Staphylococcus aureus* in a polysaccharide intercellular adhesin (PIA)-dependent manner by downregulating spa. *Infect. Drug Resist.*, 2021, 14, 2241–2250.  
<https://doi.org/10.2147/IDR.S305650>
  12. Stepanović S., Vuković D., Dakić I., Savić B., Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods*, 2000, 40(2), 175–179.  
[https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
  13. Kornienko M., Ilina E., Lubasovskaya L., Pripitnevich T., Falova O., Sukhikh G., Govorun V. Analysis of nosocomial *Staphylococcus haemolyticus* by MLST and MALDI-TOF mass spectrometry. *Infect. Genet. Evol.*, 2016, 39, 99–105.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.12.015>
  14. Jaddoa H.H., Hameed I.H., Mohammed G.J. Analysis of volatile metabolites released by *Staphylococcus aureus* using gas chromatography-mass spectrometry and determination of its antifungal activity. *Orient. J. Chem.*, 2016, 32(4), 8–24.  
<https://doi.org/10.13005/ojc/320439>
  15. Jenul C., Horwill A.R. Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiol. Spectr.*, 2019, 7(2), 7.2.29.  
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018>
  16. Ahmad-Mansour N., Ahmad-Mansour N., Loubet P., Pouget C., Dunyach-Remy C., Sotto A., Lavigne J.P., Molle V. *Staphylococcus aureus* toxins: an update on their pathogenic properties and potential treatments. *Toxins*, 2021, 13(10), 677.  
<https://doi.org/10.3390/toxins13100677>
  17. Bonar E., Międzobrodzki J., Władyka B. Chapter 7 – The Staphylococcal coagulases. In: *Pet-to-man traveling Staphylococci: A World in Progress*. Ed. V. Savini. Academic Press, 2018, 95–102.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-1.00007-8>
  18. Crosby H.A., Kwiecinski J., Horwill A.R. *Staphylococcus aureus* aggregation and coagulation mechanisms, and their function in host–pathogen interactions. *Adv. Appl. Microbiol.*, 2016, 96, 1–41.  
<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2016.07.018>
  19. Kopeć M., Węgrzynowicz Z., Budzyński A.Z., Jęlaszewicz J., Latalo Z.S., Lipiński B., Kowalski E. Formation and properties of fibrin clots resulting from staphylococcal (SC) action. *Thromb. Haemost.*, 1967, 18(07/08), 475–486.  
<https://doi.org/10.1055/s-0038-1655057>
  20. Kateete D.P., Kimani C.N., Katabazi F.A., Okeng A., Okee M.S., Nanteza A., Joloba M.L., Najjuka F.C. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 2010, 9, 23–30.  
<https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-23>
  21. Fisk A. The technique of the coagulase test for staphylococci. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1940, 21(5), 311–314.
  22. Sperber W.H., Tatini S.R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.*, 1975, 29(4), 502–505.  
<https://doi.org/10.1128/am.29.4.502-505.1975>
  23. Pickering A.C., Yebra G., Gong X., Goncheva M.I., Wee B.A., MacFadyen A.C., Muehlbauer L.F., Alves J., Cartwright R.A., Paterson G.K., Fitzgerald J.R. Evolutionary and functional analysis of coagulase positivity among the *Staphylococci*. *mSphere*, 2021, 6(4), e00381-21.  
<https://doi.org/10.1128/mSphere.00381-21>
  24. Algammal A.M., Hetta H.F., Elkesh A., Alkhalifah D.H.H., Hozzein W.N., Batiha G.E., El Nahhas N., Mabrok M.A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): one health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. *Infect. Drug Resist.*, 2020, 13, 3255–3265.  
<https://doi.org/10.2147/IDR.S272733>
  25. Gill A.A.S., Singh S., Thapliyal N., Karpoomath R. Nanomaterial-based optical and electrochemical techniques for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a review. *Microchim. Acta*, 2019, 186(2), 114–133.  
<https://doi.org/10.1007/s00604-018-3186-7>
  26. Nemr C.R., Smith S.J., Liu W., Mephram A.H., Mohammedi R.M., Labib M., Kelley S.O. Nanoparticle-mediated capture and electrochemical detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Anal. Chem.*, 2019, 91(4), 2847–2853.  
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04792>
  27. Yao S., Li J., Pang B., Wang X., Shi Y., Song X., Xu K., Wang J., Zhao C. Colorimetric immunoassay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* based on etching-enhanced peroxidase-like catalytic activity of gold nanoparticles. *Microchim. Acta*, 2020, 187(9), 504–512.  
<https://doi.org/10.1007/s00604-020-04473-7>
  28. Zhu A., Jiao T., Ali S., Xu Y., Ouyang Q., Chen Q. SERS sensors based on aptamer-gated mesoporous silica nanoparticles for quantitative detection of *Staphylococcus aureus* with signal molecular release. *Anal. Chem.*, 2021, 93(28), 9788–9796.  
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c01280>

29. Sarratea M.B., Noli T.S., Mitarotonda R., Antonoglou M.B., Chiappini S., Fernández L. M.J., Romasanta P., Vescina C., Desimone M., De Marzi M., Malchiodi E., Fernández M. Optimized surface plasmon resonance immunoassay for staphylococcal enterotoxin G detection using silica nanoparticles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2021, 558, 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.04.077>
30. Wang S., Deng W., Yang L., Tan Y., Xie Q., Yao S. Copper-based metal–organic framework nanoparticles with peroxidase-like activity for sensitive colorimetric detection of *Staphylococcus aureus*. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, 9(29), 24440–24445. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b07307>
31. Ramakrishnan R., Buckingham W., Domanus M., Gieser L., Klein K., Kunkel G., Prokhorova A., Riccelli, P.V. Sensitive assay for identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, based on direct detection of genomic DNA by use of gold nanoparticle probes. *Clin. Chem.*, 2004, 50(10), 1949–1952. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.036723>
32. Nagasawa Y., Kiku Y., Sugawara K., Yabusaki N., Oono K., Fujii K., Suzuki T., Maehana K., Hayashi T. Rapid *Staphylococcus aureus* detection from clinical mastitis milk by colloidal gold nanoparticle-based immunochromatographic strips. *Front. Vet. Sci.*, 2020, 6, 504. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00504>
33. Huang S.-H. Gold nanoparticle-based immunochromatographic test for identification of *Staphylococcus aureus* from clinical specimens. *Clin. Chim. Acta*, 2006, 373(1), 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.05.026>
34. Wu Z., He D., Cui B. A fluorometric assay for staphylococcal enterotoxin B by making use of platinum coated gold nanorods and of upconversion nanoparticles. *Microchim. Acta*, 2018, 185(11), 516. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-3058-1>
35. Berlina A.N., Sotnikov D.V., Komova N.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Limitations for colorimetric aggregation assay of metal ions and ways of their overcoming. *Anal. Methods*, 2021, 13, 250–257. <https://doi.org/10.1039/D0AY02068K>
36. Berlina A.N., Komova N.S., Zherdev A.V., Gaur M.S., Dzantiev B.B. Colorimetric technique for antimony detection based on the use of gold nanoparticles conjugated with poly-A oligonucleotide. *Appl. Sci.*, 2019, 9(22), 4782–4796. <https://doi.org/10.3390/app9224782>
37. Cronin U.P., Girardeaux L., O'Meara E., Wilkinson M.G. Protein A-mediated binding of *Staphylococcus spp.* to antibodies in flow cytometric assays and reduction of this binding by using Fc receptor blocking reagent. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2020, 86(17), e01435-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01435-20>
38. Asif M., Awan F.R., Khan Q.M., Ngamsom B., Pamme N. Paper-based analytical devices for colorimetric detection of *S. aureus* and *E. coli* and their antibiotic resistant strains in milk. *Analyst*, 2020, 145(22), 7320–7329. <https://doi.org/10.1039/D0AN01075H>
39. Chang Y.-C., Yang C.Y., Sun R.L., Cheng Y.F., Kao W.C., Yang P.C. Rapid single cell detection of *Staphylococcus aureus* by aptamer-conjugated gold nanoparticles. *Sci. Rep.*, 2013, 3, 1863. <https://doi.org/10.1038/srep01863>
40. Orlov A.V., Khodakova J.A., Nikitin M.P., Shepelyakovskaya A.O., Brovko F.A., Laman A.G., Grishin E.V., Nikitin P.I. Magnetic immunoassay for detection of staphylococcal toxins in complex media. *Anal. Chem.*, 2013, 85(2), 1154–1163. <https://doi.org/10.1021/ac303075b>
41. Skov R., Lonsway D.R., Larsen J., Larsen A.R., Samulionienė J., Limbago B.M. Evaluation of methods for detection of  $\beta$ -lactamase production in MSSA. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2021, 76(6), 1487–1494. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab032>
42. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., Beachey E.H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.*, 1985, 22(6), 996–1006. <https://doi.org/10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985>
43. Zapotoczna M., McCarthy H., Rudkin J.K., O'Gara J.P., O'Neill E. An essential role for coagulase in *Staphylococcus aureus* biofilm development reveals new therapeutic possibilities for device-related infections. *J. Infect. Dis.*, 2015, 212(12), 1883–1893. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv319>
44. Lubasovskaya L.A., Kornienko M.A., Pripitnevich T.V., Ilyina E.N., Shchegolev A.I. Microbiological and molecular genetic characteristics of coagulase-negative staphylococcal isolates from neonates in intensive care unit. *Antibiot. Khimioter.*, 2013, 58(3–4), 25–32 (in Russ.).
45. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nat. Phys. Sci.*, 1973. 241. 20–22. <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
46. Hermanson G.T. *Bioconjugate Techniques*, 3<sup>rd</sup> edition. Academic Press, 2013. <https://www.sciencedirect.com/book/9780123822390/bioconjugate-techniques#book-info>
47. Byzova N.A., Zherdev A.V., Zvereva E.A., Dzantiev B.B. Immunochromatographic assay with photometric detection for rapid determination of the herbicide atrazine and other triazines in foodstuffs. *J. AOAC Int.*, 2019, 93(1), 36–43. <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.1.36>
48. Suaifan G.A., Alhogail S., Zourob M. Rapid and low-cost biosensor for the detection of *Staphylococcus aureus*. *Biosens. Bioelectron.*, 2017, 90, 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.047>

## Gold Nanoparticles Conjugated With Rabbit Plasma Components for Detection Coagulase-Positive *Staphylococcus* Strains

A. N. Berlina<sup>a, #</sup>, V. N. Kopyltsov<sup>b</sup>, M. A. Kornienko<sup>c</sup>, A. V. Zherdev<sup>a</sup>, and B. B. Dzantiev<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

<sup>b</sup>*Head Center for Hygiene and Epidemiology, Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow, 123182 Russia*

<sup>c</sup>*Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow, 119435 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: anberlina@yandex.ru*

**Abstract**—A simple and rapid qualitative method for the detection and differentiation of coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci is proposed. The first of them include pathogens that cause serious human diseases and often death. In addition to resistance to antimicrobial drugs, they carry a number of virulence factors that determine severe complications. The proposed method is based on the aggregation of gold nanoparticles conjugated with rabbit plasma components in the presence of *Staphylococcus aureus* coagulase. A medium, in which *Staphylococcus* ssp. was grown and which was disinfected on bacterial filters, was used in the analysis. In this study, we also compared nanoparticles of various sizes from 10 to 50 nm and chose the rabbit plasma concentration for conjugation with nanoparticles. The best results were obtained using gold nanoparticles with a diameter of 30 nm. The analysis time is 1 min; the results are evaluated visually.

**Keywords:** gold nanoparticles, conjugate, rabbit plasma, coagulase, *Staphylococcus*, coagulase-positive strains, express test