

20. Zhou H., Yu W., Guo X. et al. Synthesis and characterization of amphiphilic glycidol chitosan doxorubicin acid nanoparticles as a drug carrier for doxorubicin // *Biomacromolecules*. 2010. N 11. P. 3480–3486.
21. Jin Y.-H., Hu H.-Y., Qiao M.-X. et al. pH-sensitive chitosan-derived nanoparticles as doxorubicin carriers for effective anti-tumor activity: preparation and in vitro evaluation // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010, in press.
22. Kato Y., Onishi H., Machida Y. N-succinyl-chitosan as a drug carrier: water-insoluble and water-soluble conjugates // *Biomaterials*. 2004. N 25. P. 907–915.
23. Pérez J., Szopkob R., Schmidt C., Peniche Covas C. Novel drug delivery systems: chitosan conjugates covalently attached to steroids with potential anticancer and agrochemical activity // *Carbohydrate Polymers*. 2011. Vol. 84. P. 858–864.
24. Jin N. K., Jain S. K. Development and in vitro characterization of galactosylated low molecular weight chitosan nanoparticles bearing doxorubicin // *AAPS PharmSciTech*. 2010. Vol. 11. N 2. P. 686–697.
25. Manocha B., Margaritis A. Controlled release of doxorubicin from doxorubicin/ γ -polyglutamic acid ionic complex // *Journal of Nanomaterials*. 2010. Vol. 1. P. 1–9.

УДК 579.61; 616.93; 616-078; 616-093; 615-07<<75>>

А. Б. Жебрун, д-р мед. наук,

Г. Я. Ценева, д-р мед. наук,

Г. Н. Хамдулаева, науч. сотр.,

Л. А. Краева, канд. мед. наук,

Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

Т. М. Зимина, канд. физ.-мат. наук,

Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ»

Бактериологическая безопасность при дифтерии: от классических методов к современным миниатюрным устройствам специального микробиологического контроля

Ключевые слова: дифтерийный токсин, биологические чипы.

Key words: diphtheritic toxin, biological chips.

*Разработан высокочувствительный и высоко-специфичный способ обнаружения дифтерийного токсина с целью мониторинга токсигенных штаммов *C. diphtheriae* среди больных дифтерией и бактерионосителей. Способ позволяет обнаружить дифтерийный токсин в количестве 0,001 Lf/ml дифтерийного токсина в пробе за 2–3 мин и может быть использован в лабораториях различных уровней организации как при единичных, так и при массовых обследованиях.*

Введение

Актуальность биологической опасности в настоящее время возрастает. Она исходит из существования в природе очагов особо опасных инфекций

с резервуарами в животном мире, наличия больных и бактерионосителей опасных возбудителей, обуславливающих высокий уровень заболеваемости в странах с высоким уровнем развития до 45 %, в развивающихся странах с высоким уровнем миграции и перемещения населения — до 75 %.

Важной проблемой следует признать эволюцию микроорганизмов, нередко ведущую к изменению степени патогенности микроорганизмов и приобретению патогенных свойств среди ранее непатогенных видов. Нельзя исключать возможность биотерроризма с использованием новых форм биологической угрозы, т. е. микроорганизмов с измененными биологическими свойствами.

Все сказанное диктует острую необходимость создания современных методов и систем обнаружения и распознавания биологических объектов, вирусов, бактерий, грибов и их токсинов. Класси-

ческие методы микробиологической диагностики обладают наибольшей достоверностью, однако они длительны по времени и трудоемки. Видимый рост микроорганизмов можно ожидать до 3–4 дней.

Дополнительное время необходимо также для получения чистой культуры микроорганизмов. Возможный рост различных микроорганизмов требует отсева каждой колонии на специальную среду. Без этого этапа невозможно получить представление о количестве микроорганизмов и их этиологической значимости для ряда инфекций.

Дальнейшие исследования состоят в идентификации микроорганизма. Классическим методом при этом является биохимическая дифференциация, которая занимает обычно 1–2 дня. При этом используют пробирочные субстраты. Результаты взаимодействия (изменение цвета, появление осадка и др.) позволяют определить вид микроорганизма. На смену пробирочной дифференциации бактерий все чаще приходят планшетные тест-системы, с помощью которых на одном планшете возможна биохимическая идентификация нескольких штаммов микроорганизмов. Использование тест-систем для ускоренной дифференциации микроорганизмов позволило сократить время этого этапа исследования до 4–6 часов.

В последние годы существенное место в индикации микроорганизмов стали занимать иммунологические методы. В основе таких реакций лежит взаимодействие между антигеном и антителом. В настоящее время разработано большое количество методов для выявления возбудителей и антител к ним. Наиболее распространенным методом является иммуноферментный анализ (EIA, ELISA). Однако при этом длительность реакции все же составляет 3–4 ч.

Более быстрым методом выявления микроорганизмов или иммунных комплексов является флуоресцентный анализ, который по времени занимает 1,0–1,5 ч. Использование моноклональных антител и высокоочищенных фракций микроорганизмов позволило повысить чувствительность флуоресцентных методов до 95–98 % [1].

Современный шаг в индикации микроорганизмов и оценке их генетически обусловленных свойств внесли молекулярные методы диагностики — исследование ДНК возбудителей. Сегодня этот метод является наиболее чувствительным при изучении геномного аппарата в животном мире. Тем не менее время постановки реакций определяется задачами исследования и используемым оборудованием и может занимать от 2–3 ч до нескольких дней. Более того, молекулярные методы позволяют выявить лишь ДНК микроорганизма, но не дают ответа на вопрос о наличии самого микроба [2].

Наиболее востребованными являются такие методы диагностики, которые позволяют быстро и с высокой степенью достоверности выявлять в биологическом материале возбудителей опасных за-

болеваний и их компонентов, таких как токсины [3]. Одним из наиболее сильных является дифтерийный токсин, являющийся причиной развития тяжелого инфекционного заболевания — дифтерии.

Известно, что токсигенность *C. diphtheriae* является ведущим фактором патогенности данного микроорганизма, определяющим развитие дифтерийной инфекции [4, 5]. И хотя после эпидемии дифтерии 1993–1995 гг. доля токсигенных штаммов снизилась с 35 до 6 %, они продолжают циркулировать повсеместно. Более того, около 40 % штаммов, выделенных в последние три года, несут в себе «молчащий» ген [6]. Этот факт важно учитывать, так как рядом исследователей доказано, что при определенных условиях штаммы с «молчащим» геном могут восстанавливать токсигенность. Кроме того, в настоящее время, при сниженном внимании клиницистов к дифтерийной инфекции, возрастает вероятность взятия материала от больного для микробиологического исследования в поздние сроки и нередко на фоне применения антибиотиков. В таких случаях необходимы методы детекции токсина в биологических субстратах организма с более высокой чувствительностью.

С целью мониторинга токсигенных *C. diphtheriae* у больных и носителей нами разработан новый способ экспресс-диагностики на основе микротехнологий.

Основная часть

Аналитическая система для реализации экспресс-способа диагностики токсигенных штаммов состоит из двух составляющих: 1) иммунно-биологической (латексный диагностикум); 2) приборной части (микроридер со сменными чипами). В основу создания диагностикума положена реакция взаимодействия антигена и антитела, где в качестве антигена представлен дифтерийный токсин (анатоксин), а в качестве антитела — фракция высокоавидных антител, полученных в результате последовательного фракционирования антитоксических сывороток крови. Известно, что антитела слабее адсорбируются на латексных частицах, чем антигены, и чувствительность полученных диагностикумов не всегда высока [7]. Поэтому для повышения специфичности и чувствительности способа операцию иммобилизации латексных частиц комплементарными компонентами проводили под действием поля ультразвуковых колебаний по патентам (RU 2177617, G01N 33/567, 33/546, 2001). Подбор необходимого диаметра латексных частиц производили путем использования приготовленного диагностического набора под контролем микроскопа (при увеличении в 100, 400 и 1000 раз), а затем — в разрабатываемых чипах. В итоге был получен латексный антителый дифтерийный диагностикум, который представляет собой 1,5 мас. % взвесь

полистирольных карбоксилированных латексных частиц диаметром 0,81 мкм, сенсibilизированных высокоавидной фракцией высокоактивных антиоксических противодифтерийных антител (не менее 2,5 МЕ/мл) человека.

Способ разрабатывался с использованием семи контрольных (положительных и отрицательных) референс-штаммов и токсинов, полученных из NCTC (National Collection of Type Cultures Diphtheriae Reference Laboratory, Central Health Laboratory (CPHL), London, UK), ГИСК им. Л. А. Тарасевича и НИИЭМ имени Пастера (Россия). Апробацию способа осуществляли на 30 известных музейных штаммах *S. diphtheriae* в трех повторностях.

Получение оптимальных характеристик способа достигалось, с одной стороны, созданием наиболее чувствительных компонентов диагностикума (высокоавидной фракции высокоактивных антител), использованием современных технологий получения полиакриламидного латекса и сорбции на них антител, с другой стороны — за счет совершенствования приборной части (рис. 1).

Биочипы представляют собой микропланшеты, выполненные в виде прозрачного полимерного основания с нанесенным на него фоторезистивным слоем, перфорированным сквозными отверстиями с образованием лунок. Участки поверхности основания по месту выполнения лунок, служащие дном лунок, покрыты гидрофобным покрытием из парафина или стеарина, что необходимо для получения капли определенной высоты и предотвращения растекания реакционной смеси в лунках. С этой же целью чипы выполнены из полиметилметакрилата. Размеры микрочипа составляют 16 × 16 мм с различным количеством (от 1 до 96) лунок. Размеры лунок варьируют от 0,2 до 3,0 мм с расстоянием между центрами лунок 0,3–2,0 мм и глубиной около 5 мкм.

Аналитическая система снабжена блоком оптического контроля, выполненным на базе видеокамеры. Он состоит из осветительного устройства для освещения лунок, видеокамеры, подключенной к модулю обработки изображения, расположенной

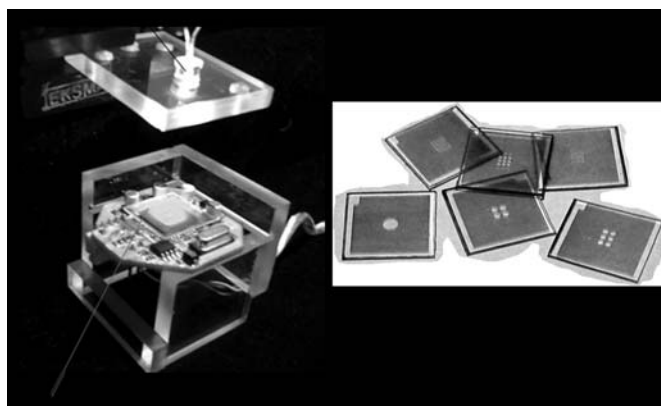


Рис. 1 | Ридер с микролатформами

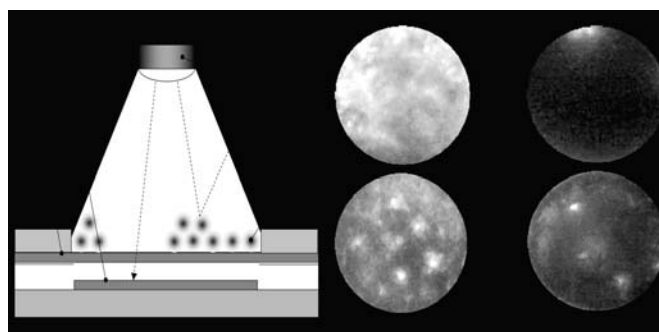


Рис. 2 | Оптическая схема и изображения результатов реакции

по ходу регистрации изменений светопропускания в лунках латексных частиц реакционной взвеси (рис. 2).

Микрочипы размещают на поверхности специального сенсора, видеоразрешение которого составляет 300 килопикселей. Для считывания сигнала большое значение имеют угол освещения и длина волны источника света. Принцип детекции и его результаты представлены на рисунке 2. Помещенные в лунки-ячейки реагенты в процессе реакции формируют непрозрачный монослой. Образец освещается диодом, а его изображение проецируется на CMOS-сенсор и далее — на экран монитора. При наличии агглютинации монослой фрагментируется из-за образования комочков латексных частиц, в результате чего наблюдается разница в видеоизображениях контролей (и проб) на экране монитора. Монослойность участков реакционной смеси достигалась путем оптимизации соотношений объемов и концентраций ингредиентов (сенсibilизированных латексных частиц и пробы) в процессе титрования пробы под контролем светового и объемного микроскопа.

В процессе создания аналитической системы учитывали не только качество всех компонентов реакции, но также создавали все необходимые условия для прохождения заданных биофизикохимических реакций в малых объемах за короткий промежуток времени. Поэтому происходящие в лунках процессы в ходе создания этого способа детекции вначале контролировали с помощью оптического блока, подключенного к микроскопу. Кроме того, в отличие от традиционного анализа биологической пробы в реакции агглютинации на стекле, в предлагаемом способе признак, по которому судили о ее результате, зависел от состава реакционной смеси. В этой связи в предварительных опытах определяли характер изменения прозрачности латексных частиц в монослойных участках, вызванных агрегацией связанных комплементарных компонентов при их соотношениях в области порога чувствительности способа.

Результаты реакции могут фиксироваться в заданном или произвольном режиме оператором в памяти компьютера в виде фотоизображений или видеоролика.

Таблица 1

Перечень внешних контролей для апробации микроаналитической системы

Контроли	Наименование	Источник получения	Исходная активность
Положительные контроли	Diphtheria toxin	NCTC (National Collection of Type Cultures Diphtheriae Reference Laboratory, Central Health Laboratory (CPHL), London, UK	600 Lf/ml 500 Lf/ml
		НИИЭМ им. Пастера	300 Lf/ml
Отрицательные контроли	Референс-штамм <i>S. diphtheriae</i> № 10648 (tox+)	NCTC (National Collection of Type Cultures Diphtheriae Reference Laboratory, Central Health Laboratory (CPHL), London, UK	0,1 Lf/ml
	Референс-штамм <i>S. diphtheriae</i> № 10356 (tox-)		0 Lf/ml
	Референс-штамм <i>S. striatum</i>	0 Lf/ml	
	Референс-штамм <i>S. aureus</i>	ГИСК им. Л. А. Тарасевича	0 Lf/ml
	Буферный раствор	НИИЭМ им. Пастера	0,05% -ный раствор NaCl

При апробации диагностикомов разных серий использовали несколько положительных и отрицательных контролей (табл. 1).

Качество работы полученных серий диагностикомов проверяли на 20 штаммах *S. diphtheriae* (tox+) и 10 штаммах *S. diphtheriae* (tox-) в ПЦР. В рабочем варианте микроаналитической системы применяются два контроля: положительный (токсин активностью 0,1 Lf/ml) и отрицательный (буферный раствор).

Результаты, полученные с помощью созданного способа, контролировали с другими используемыми методами (РНГА, Elek-тест и ICS-тест). Оценку чувствительности и специфичности каждого метода рассчитывали по формулам, приведенным Domeika (1994).

$$\text{Чувствительность} = \frac{\text{ИП}}{\text{ИП} + \text{ЛО}} 100\%;$$

$$\text{Специфичность} = \frac{\text{ИО}}{\text{ИО} + \text{ЛП}} 100\%;$$

где ИП — истинно положительный результат; ИО — истинно отрицательный результат; ЛП — ложно положительный результат; ЛО — ложно отрицательный результат.

Истинно положительным считали положительный результат, полученный при исследовании культуры *S. diphtheriae* в Elek-тесте и/или двумя другими указанными методами.

В итоге специфичность полученного диагностикума составила 98 % ($p < 0,05$), чувствительность — 97 % ($p < 0,05$). При количественной оценке чувствительность способа составила 0,001 Lf/ml дифтерийного токсина.

Время пробоподготовки при использовании нового способа диагностики составляет около 6 ч; при всех других сравниваемых способах — не менее 18 ч. Время проведения реакции составляет 2–3 мин. Чипы используются в ассортименте (от 4 до 96 лунок), поэтому за одну постановку можно исследовать до 94 проб.

Из всех фенотипических методов разработанный способ обладает наилучшими показателями по скорости пробоподготовки, проведения реакции, а также возможности одновременной постановки большого количества проб. По показателям чувствительности и специфичности этот способ можно сравнить только с ICS-тестом (рис. 3, табл. 2).

Разработанный способ отличают следующие преимущества:

- высокая чувствительность — 0,001 Lf/ml дифтерийного токсина.
- быстрота учета реакции — проведение и учет реакции занимают 15–20 мин; при условии роботизации постановки реакции сроки проведения одной реакции еще более сократятся, так как на одной планшете может быть исследовано до 94 проб одновременно.
- портативность прибора, т. е. возможность мобильной организации рабочего места при необходимости;

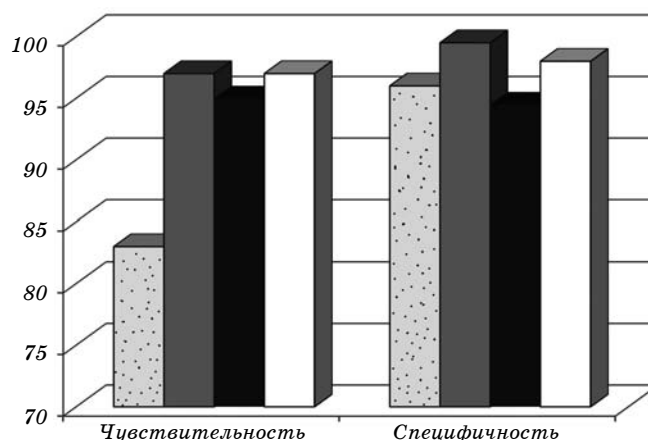


Рис. 3 Чувствительность и специфичность различных методов определения токсигенности у штаммов *S. diphtheriae*:
 ■ — Elek-тест; ■ — ICS-тест; ■ — РНГА;
 □ — биочип-тест

Таблица 2

Сравнение разработанного способа определения дифтерийного токсина с другими фенотипическими методами

Метод	Время подготовки теста, ч	Время проведения реакции	Возможность одновременной постановки проб
Elek-тест	18–24	18–48 ч	До 16 проб на одну чашку Петри
РНГА	18–24	2 ч	До 9 проб на один планшет
ICS-тест	18–24 + 3	15 мин	До 50 проб за один поход
Биочип-тест	6	2–3 мин	До 94 проб на одном чипе

- невысокая стоимость прибора в сравнении с другим оборудованием для иммунологических исследований;

- возможность работы с микрообъемами реагентов, что делает метод более дешевым и привлекательным;

- перспектива применения данного метода не только в единичных лабораторных исследованиях, но и при массовых обследованиях населения.

Представленный способ защищен патентом на изобретение «Способ контроля биологической пробы в реакции латекс-агглютинации и аналитическая система для его осуществления». № 2298798 от 10.05.2007.

Выводы

На основе новых биомикротехнологий с использованием противодифтерийных антитоксических высокоавидных антител человеческой иммунной сыворотки (чувствительность 0,001 Lf/ml дифтерийного токсина) разработан автоматизированный экспресс-способ выявления токсигенных *C. diphtheriae* in vitro, что позволяет значительно повысить качество лабораторной диагностики дифтерии.

Литература

1. **Jaancalves G. T.** Luminescence and Absorption of Hybrid Xerogels Doped with PbS Nanoparticles Prepared by Gas Diffusion Method // *Materials Science Forum*. 2006. Vol. 514–516. P. 1221–1224.
2. **Nikula T.** A human ImmunoChip cDNA microarray provides a comprehensive tool to study immune responses // *Journal of Immunological Methods*. 2005. Vol. 303. № 1–2. P. 122–134.
3. **Manz A.** Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing // *Sensors and Actuators-B1*. 1990. P. 244–248.
4. **Hadfield T. L.** The pathology of diphtheria // *J. Infect. Dis.* 2000. Vol. 181. P. 116–120.
5. **Jukka Lumio.** Studies on the Epidemiology and Clinical Characteristics of Diphtheria during the Russian Epidemic of the 1990 // *Tampere*. 2003. 122 p.
6. **Goranson-Siekierke J.** Anion-coordinating residues at binding site 1 are essential for the biological activity of the diphtheria toxin repressor // *Infect. Immunol.* 1999. Vol. 67. P. 1806–1811.
7. **Sanz I. M.** Amino, chloromethyl and acetal-functionalized latex particles for immunoassays: a comparative study // *Journal of Immunological Methods*. 2004. Vol. 287. № 1–2. P. 159–167.

Санкт-Петербургский
государственный электротехнический университет «ЛЭТИ»

VIII РОССИЙСКО-БАВАРСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО БИМЕДИЦИНСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

29–31 мая 2012 года

Тематика конференции:

- ✓ системы и оборудование для терапии и диагностики;
- ✓ биоматериалы, имплантанты и искусственные органы;
- ✓ медицинские изображения и обработка сигналов;
- ✓ микро- и нанотехнологии в биомедицинской инженерии;
- ✓ математические и компьютерные методы в медицинской инженерии.

Контактная информация по тел.: +7 (812) 234-35-55

<http://www.eltech.ru/ru>, www.rbc-2012.com