

СОВРЕМЕННЫЕ СРЕДСТВА И МЕТОДЫ ИНДИКАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

Евгений Николаевич ХРАМОВ

д.т.н., профессор, заместитель директора Государственного научного центра
"ГосНИИ биологического приборостроения"

*Лекция, прочитанная 24 марта 2005 г. в Московском физико-техническом институте
для слушателей курса*

***Режим нераспространения и сокращения оружия массового поражения и
национальная безопасность (<http://www.armscontrol.ru/course/>)***

Проблема биомониторинга при угрозе террористических актов определяет необходимость разработки высокочувствительных и специфичных (селективных) методов индикации патогенов и создания на основе этих методов совершенных технических средств, пригодных для организации необходимых защитных мероприятий.

Известно, что надежность защиты населения при прочих равных условиях находится в прямой зависимости от эффективности каждого из звеньев противобиологической защиты (ПБЗ): биологического контроля, экстренной профилактики (общей и специальной), изоляционно-ограничительных и других мероприятий по ликвидации последствий применения биоагентов, преемственности, слаженности действий подразделений и частей РХБ разведки МЧС, МВД, войск РХБ защиты, подразделений медицинской службы Главного Военно-медицинского управления МО РФ, Минздрава и других, осуществляющих защиту от биообъектов.

Первоочередными задачами, стоящими перед биологическим контролем, являются обнаружение факта применения биоагента, установление вида примененного возбудителя, границ заражения и момента применения и снятия средств защиты.

В сложившейся системе биологического контроля в настоящее время для решения задачи обнаружения факта применения проводят неспецифическое экспресс-обнаружение по ряду признаков (повышение уровня белкового фона, наличие ферментативной активности анализируемой пробы и др.). При этом также предполагается проведение отбора проб для осуществления следующей задачи – установление вида примененного возбудителя, которая возлагается на методы и средства специфической индикации.

В общем случае противобиологическая защита включает в себя:

- биологический контроль и оценку (прогнозирование) биологической обстановки; использование индивидуальных и коллективных средств защиты;
- специальную обработку, включая санитарную обработку личного состава, дезинфекцию объектов, местности, дорог, сооружений;
- экстренную (общую и специальную) профилактику поражений и вакцинацию (ревакцинацию);
- изоляционно-ограничительные и лечебно-эвакуационные мероприятия;

маневрирование мобильными резервами.

Из перечисленного решающее значение принадлежит биологическому контролю. Полученные при ведении контроля данные служат основанием для оценки биологической обстановки, подготовки предложений по защите от биоагентов с указанием характера, объемов и сроков выполнения в каждом конкретном случае мероприятий по ликвидации последствий его применения.

Применение индивидуальных и коллективных средств защиты, дезинфекция, общая и специальная профилактика, обсервация или карантин также проводятся по данным биологического контроля (неспецифической биологической индикации и специфической индикации).

При этом очевидно, что чем раньше будут вводиться в действие те или иные мероприятия, тем больше вырастает их эффективность, в том числе и экономическая.

С другой стороны, оперативное использование отдельных элементов комплекса мероприятий защиты от биоагентов должно проводиться на основе достоверной и полной информации о биологической обстановке.

Отсюда существенная особенность процесса ПБЗ состоит в том, что все последующие мероприятия осуществляются по результатам анализа биологической обстановки. При этом система биоконтроля, включающая в себя НБИ и СИ, является первичным фактором, который реализует потенциальные возможности имеющихся средств и методов защиты от биоагентов.

При решении проблемы ПБЗ следует иметь в виду, что в настоящее время сохраняется потенциальная опасность применения биологических агентов некоторыми государствами, т.к. отсутствуют надежные механизмы контроля за соблюдением Конвенции 1972 г. и трудно разграничить работы между разрешенной деятельностью в области защиты и исследованиями по совершенствованию биологических объектов. Кроме того, в последнее время особую актуальность приобрела проблема биотерроризма. Анализ последствий применения БО, проведенный американскими специалистами, показывает, что для города с населением 100 тыс. человек материальный ущерб может составлять от 470 млн. до 22 млрд. долларов США в зависимости от вида используемого БА, число пораженных людей с летальным исходом может достигать 35 тыс. человек. При этом следует особо подчеркнуть, что эффективное обнаружение биологических агентов и соответственно организация защиты возможна при наличии информации о возможных способах и средствах применения БА, что само по себе является наисложнейшей задачей.

Считают, что наиболее вероятным способом заражения объектов при применении БО является аэрозольный (аэрогенный) путь распространения БА.

Для обеспечения мероприятий НБИ и СИ в состав системы биоконтроля должны входить следующие комплексы технических средств:

приборы НБИ локального и дистанционного действия, предназначенные для установления факта применения БО;

комплекты (укладки) для неспецифического обнаружения БО в пробах (в эту группу ТС можно также включить и приборы для оснащения лабораторий);

средства пробоотбора и доставки проб;

средства (автоматические, полуавтоматические и комплекты) для автономного или лабораторного определения в пробах видовой или групповой принадлежности БС, в том числе, позволяющие биологически обогащать пробу с целью выдачи окончательного ответа по идентификации возбудителя болезни.

Для координации мероприятий ПБЗ должны быть также каналы связи для передачи в автоматизированные системы управления, а ТС должны иметь необходимые интерфейсы для передачи и приема сигналов. ТС должны располагаться на соответствующих транспортных средствах, обеспечивающих ведение биоконтроля, доставку проб, проведение анализов (машины РХБ разведки, вертолеты, медицинские и санитарно-эпидемиологические лаборатории).

В настоящее время табельные средства ПБЗ (сигнализатор АСП и микроскоп МЛД), являющиеся материальной основой существующей системы биоконтроля, не могут решить в достаточном объеме задачи, стоящие перед ПБЗ. Исходя из этого, создание новых более современных технических средств является важной актуальной задачей.

Для решения задач биомониторинга необходима разработка высокочувствительных и специфических (селективных) методов индикации патогенов, экopatогенов и создания на основе этих методов современных технических средств.

Вместе с тем, в настоящее время отсутствуют нормативно-технические документы (НТД), регламентирующие требования к системе биологического мониторинга и ее составным элементам.

В то же время в конце 90-х годов специалистами заинтересованных министерств и ведомств страны совместно с ГосНИИ БП в инициативном порядке был разработан проект НТД «Система общих технических требований. Средства системы биологического и экологического мониторинга окружающей среды».

В соответствии с данным документом в зависимости от назначения и принципа действия средства системы биологического и экологического мониторинга окружающей среды должны включать следующие классификационные группы:

- автоматические сигнализаторы биологических аэрозолей;
- автоматические анализаторы биологических средств;
- высокопроизводительные пробоотборные устройства биологических аэрозолей;
- автоматические (полуавтоматические) приборы индикации биологических объектов;
- аппаратура, приборы, наборы, комплекты и устройства обнаружения и идентификации биологических объектов;
- аппаратура управления, сбора и обработки данных.

В предлагаемой системе автоматические сигнализаторы биологических аэрозолей должны осуществлять постоянный контроль (мониторинг) зараженности приземного слоя воздуха, обеспечивая обнаружение биологического аэрозоля в облаке при прохождении его через контролируруемую точку.

Автоматические анализаторы биологических средств в режиме периодического функционирования должны обеспечивать дифференциацию

биологических средств, находящихся в аэрозольном состоянии, на следующие условно таксономические группы: вирусы, риккетсии, бактерии (отдельно вегетативные и споровые формы), бактериальные токсины.

Высокопроизводительные устройства биологических аэрозолей предназначены для отбора из воздуха представительных проб биологических агентов и их хранения в условиях, обеспечивающих максимальное сохранение жизнеспособности.

Автоматические (полуавтоматические) приборы индикации биологических агентов должны обеспечивать экспресс - индикацию (установление наличия в пределах условных таксономических групп) биологических агентов и продуктов микробиологического синтеза в нативных пробах, отобранных высокопроизводительными пробоотборными устройствами биологических аэрозолей.

Аппаратура, приборы, наборы, комплекты и устройства обнаружения и идентификации биологических агентов должны обеспечивать установление видовой (типовой) принадлежности возбудителей инфекционных болезней и бактериальных токсинов в нативных и обогащенных пробах воздуха, грунта, воды и других объектов окружающей среды.

Первоочередной задачей для предлагаемой системы и ее элементов является установление факта биологического заражения.

Для решения этой задачи на первом этапе проводят неспецифическое обнаружение, на которое возлагают также отбор проб для специфической индикации. В дальнейшем, на втором этапе проводят специфическую индикацию.

В нашей стране впервые в мире была осуществлена разработка технического средства обнаружения БС в аэрозольном состоянии. Созданный сигнализатор АСП основан на хемилюминесцентном люминольном методе анализа. Принятие решения о наличии биоаэрозоля в приземном слое атмосферы у сигнализатора АСП осуществляется на основе сравнения электронного порога срабатывания с аналитическим сигналом, регистрируемым с помощью фотоэлектронного умножителя в процессе протекания хемилюминесцентной люминольной реакции, катализируемой аэрозольными частицами, обладающими пероксидазной активностью. Превышение амплитуды аналитического сигнала над электронным порогом фактически служит основанием для оповещения о применении БА.

Являясь наиболее массовым прибором неспецифической индикации биологических объектов, сигнализатор АСП имеет ряд следующих существенных недостатков, снижающих его эффективность по обнаружению факта применения биоаэрозоля:

ограниченный спектр обнаруживаемых биоаэрозолей ввиду низкого уровня пероксидазной активности или ее отсутствия у ряда БА;

ухудшение порога чувствительности при обнаружении биоаэрозоля БА в запыленной атмосфере.

Следует также отметить, что для непрерывной работы сигнализатора по назначению в течение суток требуется четыре литра индикаторного реактива из комплекта индикаторных средств (КИСа), входящего в состав прибора.

Дальнейшее совершенствование этих приборов целесообразно осуществлять в направлении уменьшения массо-габаритных характеристик и

энергопотребления за счет использования новейших технологий детектирования люминесценции и светорассеяния частиц и современной элементной базы (фотоприемное устройство, компактные полупроводниковые лазерные системы оптического зондирования и микропроцессорная техника).

Сигнализаторы снабжены пробоотборными устройствами, предназначенными для отбора пробы аэрозоля биологических агентов с целью последующего анализа методами специфической индикации и проведения мероприятий по биологической защите.

Для сигнализатора АСП это устройство выполнено в виде встроенного циклона, воздух в который подается после обнаружения БА. Объемный расход воздуха через циклон составляет 160...220 л/мин. Отбираемые частицы имеют средний диаметр более 2,5 мкм.

В настоящее время разрабатывается высокопроизводительное пробоотборное устройство, конструкция которого в качестве обязательного элемента включает концентратор респиральной фракции аэрозоля дисперсностью от 1 до 10 мкм. При этом его производительность должна составлять не менее 1,5-2 м³/мин.

Основные технические характеристики существующих и разрабатываемых пробоотборных устройств приведены в табл.1.

СРЕДСТВА ОТБОРА ПРОБ ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИНДИКАЦИИ

Наименование пробоотборника, принцип действия	ПАБ 20/50	Пробоотборник к сигнализатору АСП	Блок ВЗУ к сигнализатору АСП
	Инерционное осаждение	Центробежное осаждение	Инерционное осаждение, концентрирование
Объемный расход, л.мин ⁻¹	20 50	160...220	1500
Эффективность улавливания, %	85	80	85
Потребляемая мощность не более, Вт	40	80	250
Выживаемость, %	20...85	40...60	20...85
Масса (кг)	4,5	1...5,5	15...20

Наряду с разработкой автоматических сигнализаторов в 80...90 г.г. ГосНИИ БП проводил разработку дистанционных средств индикации аэрозолей биологических БС. В основу лидарных наземных комплексов был положен люминесцентный метод регистрации биологического аэрозоля на расстоянии до нескольких километров, который успешно был применен для контроля за выбросами БВК Киришского и Светлогорского биохимических заводов.

Для неспецифического обнаружения биологических объектов в пробах используются полевые носимые комплекты, предназначенные для анализа проб с целью первичной их сортировки. Основная задача при использовании комплектов – получение быстрого, в течение 10-15 мин, предварительного ответа о наличии и групповой принадлежности биологических материалов.

Для этой цели используется набор колориметрических, ферментативных реакций и биохимических тестов, характерных для различных групп биообъектов.

С использованием указанных реакций и тестов ГосНИИ БП были разработаны комплекты средств анализа проб КСП-11 и КСАП. Комплекты предназначены для обнаружения и групповой индикации микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний в полевых условиях.

Входящие в состав комплектов индикаторные бумаги, смачивающие растворы, реактивы, растворители, инструменты и материалы обеспечивают отбор, подготовку и проведение анализа неизвестных проб и микроорганизмов. Отнесение определяемого микроорганизма к таксономическим группам можно провести по соответствующему набору положительных и отрицательных реакций индикаторных средств, входящих в состав комплектов.

Комплект КСАП обеспечивает частичную групповую индикацию микроорганизмов (с отнесением обнаруживаемых микроорганизмов к вирусно-риккетсиозной и бактериальной вегетативной группам) в объектах окружающей среды в интервале температур от минус 20 до 30⁰С. Комплект обслуживает один оператор.

В настоящее время проводится модернизация комплекта КСАП в направлении расширения его функциональных возможностей по отнесению определяемых микроорганизмов дополнительно к вирусной и бактериальной споровой таксономическим группам.

В настоящее время для решения задач специфической индикации используются следующие методы и средства микробиологического экспресс-анализа: метод флуоресцирующих антител (МФА), реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), твердофазный иммуноферментный метод (ТИФМ).

Чувствительность МФА и РНГА составляет $10^5 \dots 10^6$ мт/мл.

Схема специфической индикации предполагает также биологическое обогащение и исследование МФА и РНГА методами, используются также лабораторные животные, исследования занимают до 2-3 суток. При получении отрицательного ответа проводят полный микробиологический анализ. Он может занимать время до 36 дней и более. Такие сроки проведения анализа уже не приемлемы в настоящее время.

Основой для практически всех методов, используемых для специфической индикации, являются те или иные модификации иммунологических

(иммунохимических) способов. Именно недостаточная эффективность классического биологического анализа послужила движущей силой развития иммунохимических и амплификационных (гибридизационных) методов специфической индикации и диагностики возбудителей инфекционных заболеваний.

В частности, в ГосНИИ БП дальнейшее развитие получили методы иммунофлуоресцентного анализа биоматериалов в объеме пробы. Один из них – метод универсального полифазного концентрирования комплексов биоагентов (вирусов, микроорганизмов, токсинов) с мечеными флуоресцеином изотиоцианатом (ФИТЦ) антителами. Основными недостатками этого метода являются невысокая устойчивость к воздействию больших концентраций мешающих примесей и сильное влияние степени очистки антител на результаты анализа. Эти недостатки удалось преодолеть за счет использования растворов с различной удельной плотностью в качестве двухфазной системы. При этом в зоне равновесной плотности наблюдается пик люминесценции, обусловленный образованием иммунного комплекса биоагента с люминесцирующими иммуноглобулинами. В то же время высокие концентрации примесей распределяются в одной из фаз в соответствии с их плотностью и не мешают определению.

Совершенствование методов и технических средств экспресс - индикации на основе твердофазного люминесцентного иммуноанализа направлено на поиск новых люминесцентных меток и методических приемов детекции, обеспечивающих существенное повышение соотношения сигнал/фон. Высокий уровень чувствительности $10^{-13} \dots 10^{-14}$ М (в пересчете на концентрацию метки) был достигнут за счет использования меток, обладающих аномально длительной люминесценцией, и специального способа ее выделения в режиме временного разрешения с отсечкой короткоживущей фоновой составляющей. Такой подход был реализован в лантанидном иммунофлуоресцентном анализе, так называемом методе ИФА, или диссоциативно-усиленном лантанидном флуоресцентном иммуноанализе. В качестве меток были использованы хелаты лантаноидов (Eu, Tb, Dy, Sm), ковалентно связанные с антителами. Данный метод хорошо зарекомендовал себя при диагностике вирусных инфекций. Вместе с тем метод ИФА оказался недостаточно эффективным для проведения высокочувствительного многокомпонентного анализа возбудителей инфекций. Это связано со снижением чувствительности метода при использовании вместо Eu других редкоземельных меток, обладающих более слабой люминесценцией.

Молекулярно-генетический анализ обладает наибольшей чувствительностью из всех известных методов экспресс-индикации. Применение традиционных флуоресцентных меток для обнаружения биоагентов с помощью ДНК – зондов, как правило, позволяет выявить сотни-тысячи клеток в пробе. Амплификация генетического материала методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) нуклеиновых кислот снижает этот порог до единичных клеток. Развитие методологии ПЦР в настоящее время рассматривается как одно из важнейших направлений для создания чувствительных и специфичных методов индикации и идентификации возбудителей, не имеющих равных среди методов лабораторной диагностики по чувствительности и специфичности анализа. Вместе с тем, как

показал опыт практического применения ПЦР в созданном в 2001 году комплекте КПБК-1У для экспресс-индикации возбудителей, существенными ограничениями метода являются его длительность и низкая помехозащищенность от контаминации продуктами реакции. В связи с этим одним из направлений в совершенствовании методологии ПЦР для целей специфической индикации являются разработка методических приемов и создание люминесцентных зондов нового поколения, позволяющих существенно снизить число циклов амплификации за счет повышения чувствительности детекции метки. Как и в случае твердофазного иммуноанализа, наиболее перспективно использование длительно люминесцирующих меток на основе хелатов лантаноидов или металлопорфиринов. Методы амплификации нуклеиновых кислот позволяют повысить чувствительность иммунохимических методов обнаружения токсинов, антигенов за счет создания гибридных молекул антител меченых олигонуклеотидами. Твердофазный анализ при этом проходит две стадии. На первом этапе на твердой фазе адсорбируется комплекс искомого анализита и связанных с ним молекул гибридных антител, на втором этапе осуществляются амплификация нуклеиновой кислоты и ее выявление с помощью различных, в том числе люминесцентных, ДНК-зондов.

В настоящее время в практической работе по прежнему доминируют традиционные методики иммунофлуоресцентного анализа с меткой антител ФИТЦ. Вместе с тем современная база люминесцентной микроскопии позволяет применять несколько флуорохромов, различающихся по спектрально-люминесцентным характеристикам, что может обеспечить гораздо надежнее идентификацию возбудителей. Функциональные возможности методов иммунолюминесцентной микроскопии расширяются за счет применения длительно люминесцирующих меток и регистрации сигнала люминесценции в режиме фосфориметрии или двухфотонного возбуждения с отсечкой фона люминесценции.

По-видимому, сочетание современных технологий ультрамикроскопии, используемых в люминесцентной микроскопии, таких, как лазерное возбуждение люминесценции ДНК-зондов с регистрацией в режиме фосфоресценции или двухфотонного возбуждения, с компьютерным распознаванием образов позволит исключить этапы амплификации и контролировать наличие биоагентов в пробе непосредственно по уровню сигнала люминесценции. Однако сложность и высокая стоимость оборудования, необходимого для осуществления такого типа анализа обуславливают возможность его внедрения только в крупных диагностических центрах.

Одним из направлений в разработке средств экспресс-индикации возбудителей является создание люминесцентных иммуносенсоров. В этой области преобладают методические подходы с использованием длительно люминесцирующих меток с регистрацией в режиме временного разрешения. Вместе с тем, анализ данных научно-технической литературы показывает, что в отличие от полупроводниковых электрохимических иммуносенсоров создание капиллярных и оптоволоконных иммунолюминесцентных сенсоров в настоящее время не вышло из стадии научно-методической и технологической разработки.

Представленные результаты свидетельствуют о возможности

совершенствования средств экспресс-индикации на основе комбинации современных методов иммунохимического и молекулярно-генетического анализа с новейшими разработками в области создания люминесцентных меток, техники регистрации сверхслабых световых потоков в режиме счета фотонов и лазерных методов спектроскопии. Задачи экспресс-индикации биологических агентов ни в настоящее время, ни в ближайшей перспективе, по-видимому, не смогут быть решены с помощью какого-либо универсального метода.

Для исследований, связанных с необходимостью быстрого обнаружения возбудителей и токсинов, оптимальными являются иммуносенсорные технологии и технологии, реализующие принципы гомогенного иммуноанализа.

Для стационарных лабораторий основное значение приобретают такие характеристики методов, как чувствительность, специфичность, производительность, тогда как фактор времени анализа менее важен. В этой ситуации методы молекулярной гибридизации и мультикомпонентного твердофазного иммуноанализа с регистрацией продуктов биоспецифического связывания в режиме временного разрешения люминесценции, взаимно дополняя друг друга, по-видимому, будут доминировать над остальными.

В качестве перспективных простейших средств индикации БА в окружающей среде безусловно следует признать метод анализа на иммунохроматографических тест-полосках с использованием в качестве меток коллоидного золота или графита. В данном направлении в институте ведутся интенсивные исследования, тем более что производственно-технологическая база по средствам «сухой» химии была создана при решении проблемы средств диагностики больных сахарным диабетом.

В заключении следует отметить, что сложность задач и комплексный подход проблем биоиндикации требует постоянного совершенствования организационной структуры, которая в свою очередь может реформироваться опираясь на реальные успехи в развитии методов и технических средств индикации. С учетом сложившейся организационной структуры и специфических задач различных ведомств можно выделить ряд ключевых направлений в разработке средств индикации:

- персональные био-и иммуносенсоры;
- полевые укладки и комплекты для обработки проб;
- средства для оснащения автолабораторий, в т.ч. приборы для полностью автоматизированного отбора и анализа биопроб;
- средства для непрерывного и периодического мониторинга в автоматическом режиме воды и воздуха;
- приборы и комплекты диагностических средств для стационарных лабораторий.

При этом следует постоянно помнить о том, что несмотря на необходимость развития методов диагностики инфекционных заболеваний, где в качестве детектора выступает человек, существенное снижение последствий при возможном применении БА, в т.ч. при биотерроризме, возможно лишь своевременном обнаружении данных биологических материалов, что достигается широким применением технических средств индикации.