

2. Мынбаев К.Д., Иванов-Омский В.И. Модифицирование свойств Hg_{1-x}Cd_xTe низкоэнергетическими ионами (обзор) // Физика и техника полупроводников. – 2003. – Т.37, №10. – С. 1153–1178.
3. Васильев В.П., Мамонтов М.Н., Быков М.А. Термодинамические свойства и устойчивость твердых растворов системы CdTe-HgTe-Te // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2, химия. – 1990. – Т.31, №3. – С. 211–218.
4. Богобоящий В.В. Особенности прыжковой проводимости кристаллов p-Hg_{0,78}Cd_{0,22}Te при двойном легировании // Физика и техника полупроводников. – 2002. – Т.36, №1. – С. 29–36.
5. Курило И.В., Бекеша С.Н., Островская А.С. Морфология и особенности структуры кристаллов CdxHg1-xTe, полученных методом химических транспортных реакций // Неорганические материалы. – 1993. – Т.29, №8. – С. 1157–1159.
6. Бирюлин П.В., Кошелева В.И., Туринов В.И. Исследование электрофизических свойств CdxHg1-xTe // Физика и техника полупроводников. – 2004. – Т. 38, № 7. – С. 784–791.
7. Межиловська Л.Й., Дмитрів А.М., Фреїк Д.М., Жуковські П.В. Точкові дефекти твердого розчину CdxHg1-xTe // Фізика і хімія твердого тіла. – 2004. – Т. 5, № 4. – С. 792–798.
8. Дмитрів А.М. Точкові дефекти та їх компенсація у меркурій телуриді // Фізика і хімія твердого тіла. – 2005. – Т. 6, № 2. – С. 287–294.
9. Krause R., Klimakow A., Kiessling F., Polity A., Gille P., Schenk M. Study of Hg vacancies in (Hg, Cd)Te after thm growth and post-growth annealing by positron annihilation // J. Cryst. Growth. – 1990. – V. 101. – P. 512–516.
10. Krause-Rehberg R., Leipner H., Abgarjan T., Polity. Review of defect investigations by means of positron annihilation in II-VI compound semiconductors // Applied Physics A. – 1998. – V. 66. – P. 599–614.

У роботі був запропонований новий метод діагностики сальмонеллезу, шляхом визначення маркерів бактерій роду Salmonella, котрий заснован на використанні напівпровідникових наноматеріалів (квантових точок), як високоточних детекторних елементів нанофотонного сенсорного пристрою

Ключові слова: нанофотонний сенсор, квантова точка, серотип, ендотоксин

В работе предложен новый метод диагностики сальмонеллеза, путем определения маркеров бактерий рода Salmonella, который основан на использовании полупроводниковых наноматериалов (квантовых точек), как высокоточных детекторных элементов нанофотонного сенсорного устройства

Ключевые слова: нанофотонный сенсор, квантовая точка, серотип, эндотоксин

The new method of salmonellosis diagnostics by detection of bacteria of sort Salmonella markers, which is based on usage of semiconductor nanomaterials (quantum dots) as precision detector elements of nanophotonic sensing device is offered in this work

Key words: nanophotonic sensor, quantum dot, serotype, endotoxin

УДК 542.98

МЕТОД И НАНОФОТОННОЕ СЕНСОРНОЕ УСТРОЙСТВО ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА

Н.В. Павлова

Кафедра биомедицинской электроники
Харьковский национальный университет
радиоэлектроники
пр. Ленина, 14, г. Харьков, Украина, 61166
Контактный тел.: (057) 70-21-364
E-mail: pavlova_li@ukr.net

1. Введение

Среди острых кишечных инфекционных болезней с каждым годом всё большее значение приобретают

сальмонеллёзы, в заболеваемости которыми в последние десятилетия проявляется заметная тенденция к росту, как в Украине, так и в большинстве стран мира. Сложность решения проблемы сальмонеллёзов свя-

зана с рядом особенностей, отличающих их от других кишечных инфекционных болезней: большим разнообразием клинических форм, широким распространением бессимптомных форм инфекций, колоссальной полиэтиологичностью и множественностью источников её, многообразием путей и факторов передачи возбудителя и др. [1].

В связи с этим актуальным является вопрос разработки новых экспрессных, эффективных и экономичных методов выявления биологически важных веществ: токсинов, ядов, лекарственных препаратов, маркеров того или иного вида заболевания, находящихся в очень низких концентрациях в исследуемом материале, в т.ч. маркеров сальмонеллеза. Существующий набор методов и устройств не дает требуемых результатов исходя из узконаправленности тестовых систем или сложности проведения процесса исследования, недостаточной точности определения пр.

Целью работы является разработка процесса электрохемилюминесцентного определения низкомолекулярных веществ в растворе, используя в качестве детекторных элементов полупроводниковые наноматериалы.

2. Серологическая характеристика сальмонелл

Сальмонеллез – это полиэтиологическая инфекционная болезнь, вызываемая различными серотипами бактерий рода *Salmonella*, семейства *Enterobacteriaceae*. В настоящее время насчитывают более 2200 серотипов, из них у человека более 700 (рис. 1).

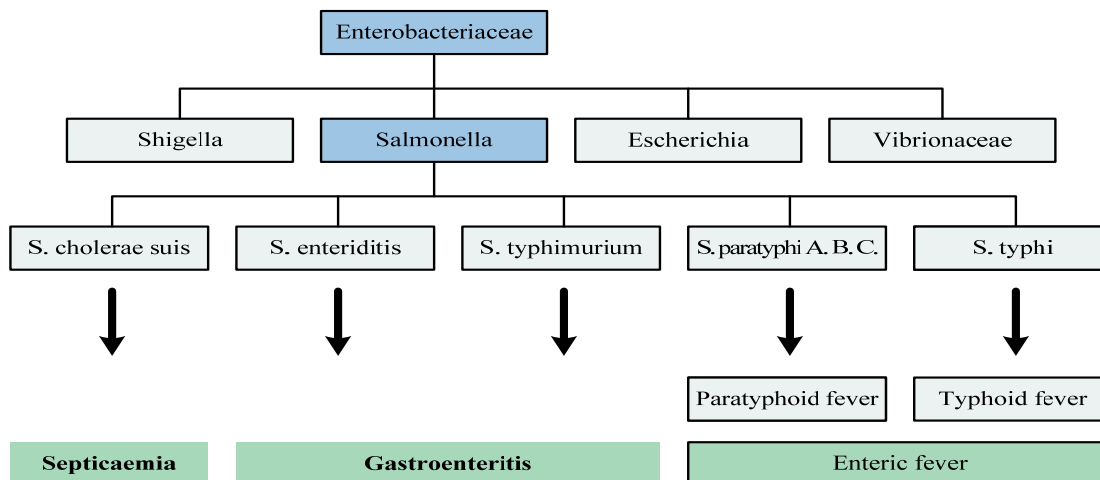


Рис. 1. Классификация семейства *Enterobacteriaceae*

Каждый серотип сальмонелл имеет характерный только для него набор определенных антигенных факторов. Антигенная структура сальмонелл сложна. Они содержат О-, Н-, а также Vi-антиген, относящийся к капсульным К-антигенам (рис. 2). О-антиген связан с соматической субстанцией клетки, термостабилен, одним из его компонентов является Vi-антиген; Н-антиген обладает жгутиковым аппаратом, термолабилен [2].

О-антиген расположен на поверхности микробной клетки и представляет собой фосфолипидо-полисахаридный комплекс, включающий 60% полисахарида, 20 – 30% липида и 3,5 – 4,5% гексозамина (углевода).

Этот комплекс термостабилен, не разрушается при кипячении в течение 2,5 ч., а автоклавированием при 120°C в течение 30 мин. Чувствителен к действию формалина, но резистентен к этанолу.

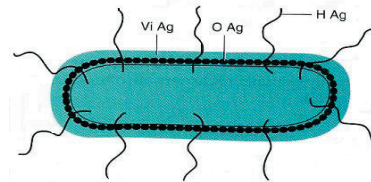


Рис. 2. Антигенная структура сальмонелл

Наличие у сальмонелл Н-антигена определяется жгутиками. Они термолабильны, разрушаются нагреванием при температуре 75 – 100°C, под воздействием HCl, этанола и протеолитических ферментов, но устойчивы к формалину. Н-антигены у сальмонелл могут встречаться в двух серологических фазах: первой («специфическая») и второй («неспецифическая»).

Антигены 1-й фазы (их обнаружено более 80 вариантов) обозначают прописными буквами латинского алфавита, 2-й фазы (9 вариантов) – арабскими цифрами или прописными латинскими буквами с арабскими цифрами. Сальмонеллы, в которых Н-антигены представлены двумя фазами, называют двухфазными в отличие от монофазных, имеющих только антигенные факторы 1-й фазы.

Поверхностные K(Vi)-антигены – антигены вирулентности.

Они представляют собой белково-полисахаридный комплекс с выраженными антигенными свойствами. Он термолабилен, чувствителен к действию HCl и этанола, полностью разрушается при кипячении в течение 10 мин, частично инактивируется под действием фенола и при температуре 60°C в течение 1 ч. Температурный оптимум для него 37°C.

Определение серовара сальмонелл начинается с изучения выделенной культуры, в реакции агглютинации на стекле с поливалентной (ABCDE) адсорбированной О-сывороткой и, далее, с монорецепторными Н-сыворотками. После определения антигенов 1-й фазы анализируют антигены 2-й, что позволяет установить антигенную формулу серовара. При отсутствии агглютинации с поливалентной ABCDE О-сывороткой и

положительной реакции с поливалентной сывороткой редких групп, проводят дополнительные биохимические тесты с целью определения принадлежности к под родам сальмонелл. При положительном решении далее исследуют штамм с помощью моновалентных О-сывороток редких групп и Н-сывороток.

Важное значение для идентификации имеет определение чувствительности штамма к сальмонеллезному О-бактериофагу. Он лизирует 97,5% штаммов сальмонелл.

Поэтому в качестве эпидемиологических маркеров используют и фаготип сальмонелл.

Патогенность сальмонелл обусловлена действием 2-х типов токсических веществ, выделяемых данными бактериями, что позволяет, в принципе, использовать тесты на данные вещества для определения, в т.ч., раннего, сальмонелл. К первому типу токсинов – экзотоксинов относятся вещества, выделяемые при жизни бактерий. Второй тип токсических веществ – эндотоксины образуется в результате разрушения бактериальной клетки и представляют собой ее структуру [3-4].

Экзотоксины, в химическом отношении, представляет собой белки (масса=50-1000 kD); эндотоксины – это комплекс липополисахаридов (ЛПС) с белками, которые находятся в наружных слоях клеточной стенки грамотрицательных бактерий (масса=10kD).

Эндотоксины состоят из гидрофильного полисахаридного остатка, который соединен ковалентной связью с гидрофобным липидным остатком (липид А) (рис. 3).

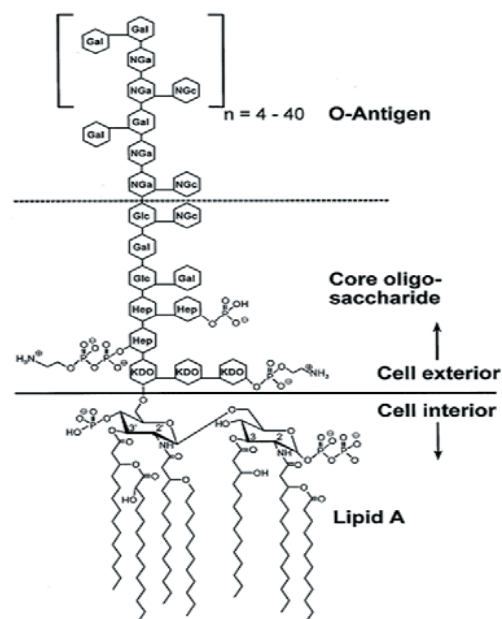


Рис. 3. Химическая структура эндотоксина из *E. coli*: (Hep) L-glycerol-D-manno-heptose; (Gal) galactose; (Glc) glucose; (KDO) 2-keto-3-deoxyoctonic acid; (NGa) N-acetylgalactosamine; (NGc) N-acetylglucosamine [3]

Липосахариды большинства видов бактерий состоят из трех основных блоков:

- блок О-антигена (O-antigen region),

- олигосахарид сердцевин (core oligosaccharide),
- липид А (lipid A).

О-антиген в основном состоит из последовательности одинаковых олигосахаридов (от трех до восьми моносахаридов каждый), определяющих видовую специфичность и серологическую особенность соответствующей бактерии.

Олигосахарид сердцевин имеет консервативную структуру с внутренней областью 3-дезоксид-D-манно-2-октулоносовой кислоты из (KDO) - гептоза и внешней области состоящей из гексоз. Так, например, среди видов *E. coli* известно пять разных типов сердцевинной области.

Липид А является самой консервативной частью эндотоксина и отвечает за большинство биологических свойств эндотоксина, в том числе, за его биологическую токсичность.

Бактериальные штаммы, в составе мембраны которых отсутствовал бы липид А или эндотоксин, не известны современной науке.

Анализируя данные литературы за последние десятилетия, можно сказать, что основными показателями интоксикации при сальмонеллезе являются перекисное окисление липидов (ПОЛ), уровень холестерина, циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК), молекулы средней массы (МСМ) и активность каталазы [4].

При развитии интоксикации на фоне сальмонеллеза происходит активный хемотаксис нейтрофилов в очаг воспаления, где они поглощая и переваривая чужеродный агент, изменяют свою метаболическую активность, характеризующуюся усилением поглощения кислорода, повышенной утилизацией глюкозы и гиперпродукцией активных форм кислорода (АФК):



Перекисное окисление является универсальным механизмом взаимодействия кислорода со многими органическими субстратами, в том числе с липидами. Внедрение кислорода в молекулы окисленного субстрата приводит к образованию реакционно-способных промежуточных продуктов – свободных радикалов, гидроперекисей, которые в дальнейшем вызывают повреждение других классов соединений – белков, нуклеиновых кислот, углеводов (рис. 4).

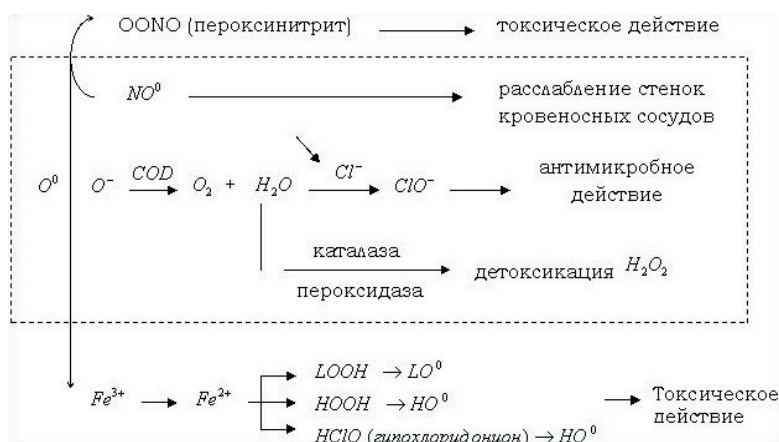


Рис. 4. Метаболизм супероксидного радикала в норме и при патологии

Существуют следующие методы диагностики сальмонеллеза: бактериологические и серологические методы (реакции агглютинации и непрямой гемагглютинации); методы экспресс-диагностики (МФА с антительными диагностикумами); методы агрегат-гемагглютинации и иммуноферментный метод; ПЦР-диагностика; дифференциальная диагностика.

Несмотря на их разнообразие, они все обладают целым рядом недостатков, а именно: длительность проведения исследования; использование значительного количества реактивов; использование значительного числа разнообразного оборудования; необходимость наличия высококвалифицированного персонала; частое наличие ошибок; проведение диагностики на поздних стадиях заболевания; дороговизна анализов (ПЦР).

В связи с этим актуальным является применение нового метода диагностики сальмонеллеза, путем определения специфических веществ (маркеров), характеризующих наличие бактерий рода *Salmonella*, который основан на использовании низкомолекулярных веществ в растворе, используя в качестве детекторных элементов полупроводниковых наноматериалов (квантовых точек), как высокоточных детекторных элементов.

3. Низкоразмерные полупроводниковые структуры

Одним из давно исследуемых и хорошо зарекомендовавших себя методов определения веществ является метод электрогенерированной хемилюминесценции (ЭХЛ). ЭХЛ представляет собой люминесценцию, возбуждаемую неоптически за счет последовательности электрохимических и рекомбинационных процессов в ячейке с электродами и исследуемым раствором или в сенсорном устройстве при подачи на ячейку напряжения (электролизе) [5-6].

В классической ЭХЛ на протяжении не одного десятилетия, широко использовались органические люминофоры: бипиридил рутения, дифенилантрацен, рубрен и т.д.

Однако, обладая рядом недостатков, в современной ЭХЛ XXI века все шире начали использовать наноматериалы, одним из ярких представителей которых являются полупроводниковые сферические квантовые точки (КТ).

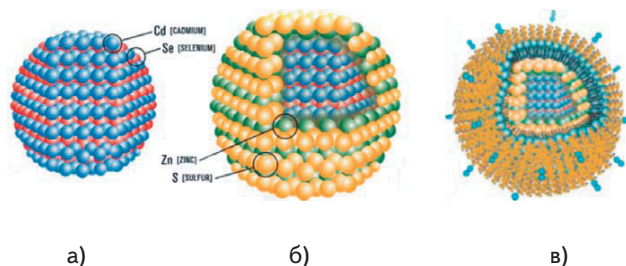


Рис. 5. Структуры квантовых точек

Исходя из целей данной работы, для диагностики инфекционного заболевания структура сенсорного устройства включает 3 вида КТ на определенные вещества:

- КТ со структурой ядро (рис. 5а);

- КТ со структурой ядро-оболочка (рис. 5б);
- КТ со структурой ядро-оболочка + полимерное покрытие (рис. 5в).

Свойства КТ: стабильность, узкий спектр излучения, возбуждаются любой длиной волны, высокая интенсивность излучения, стабильность к фотохимической и электрохимической деструкции и т.д. [7].

КТ имеют больше преимуществ перед стандартными органическими люминофорами. Электрон в квантовой точке переходит с одного уровня в зоне проводимости на другой в валентной зоне с испусканием фотона с энергией $E=h\nu$, равной разности энергий уровней размерного квантования. Попадание электронов на высшие уровни осуществляется в результате пропускания тока через структуру либо при фотовозбуждении.

Спектр, характерный для квантовых точек, является узким, зависящим от диаметра КТ, что является одним из основных преимуществ при определении маркерных веществ инфекционных заболеваний [8-9].

Кроме простых полупроводников (Si, Ge), в ЭХЛ-анализе возможно использование сложных полупроводников, т.е. CdSe, CdS, CdTe, ZnS, ZnSe и т.д. Отметим, что люминесценция КТ дает информацию о внутренней структуре частицы (например, ширине запрещенной зоны), тогда как при помощи ЭХЛ, используя электрохимические методы, можно исследовать поверхность частицы.

Для КТ, как и для большинства органических молекул, характерны процессы окисления и восстановления. Электрохимия КТ, растворенных в некотором растворителе, базируется на переносе заряда между электродом и КТ. Когда потенциал электрода становится отрицательным, электроны инжектируются в зону проводимости (E_c), переводя КТ в анион-радикал. Аналогично, при положительном заряде электрода, электроны КТ перемещаются к электроду, образуются дырки в валентной зоне (E_v), и переводя КТ в катион-радикал. Рекомбинация анион- и катион-радикалов данной КТ может привести к излучению света, аналогично ЭХЛ для систем со сложными органическими молекулами.

ЭХЛ определения низкомолекулярных веществ биологического значения в растворе можно проиллюстрировать уравнениями (1 - 4).



При подаче напряжения происходит образование ион-радикалов молекул аналитов $A^{\bullet+}$, а также ион-радикалов $KT^{\bullet-}$ (рис. 6). В результате этого, катионы молекул-аналитов $A^{\bullet+}$ диффундируют к $KT^{\bullet-}$, результатом реакции является образование синглет-возбужденной формы KT^* . Так как данное состояние КТ является нестабильным, то он переходит из зоны проводимости в валентную зону КТ с испусканием кванта света (рис. 6, уравнение 4). А

ион-радикалы молекулы-аналита возвращаются в основное состояние.

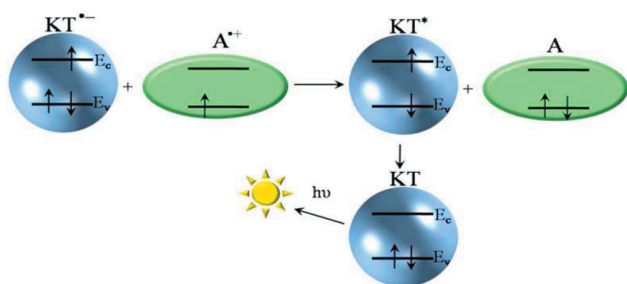


Рис. 6. Схематическое изображение процесса электрохимического люминесцентного определения молекулы-аналита

Основной идеей работы является применение нанопотонного сенсорного устройства на базе квантово-размерных структур (КРС) для ранней диагностики сальмонеллеза, и, соответственно, подбор специфической КРС для определения веществ биомедицинского значения - маркеров, выделяемых серотипами бактерий *Salmonella*.

4. Выводы

Проанализировано современное состояние населения Украины, стран СНГ и ЕС на предмет инфицирования сальмонеллами и показана актуальность разработки новых эффективных методов ранней диагностики сальмонеллеза.

С учетом проведенного аналитического обзора в данной работе интерес сконцентрирован на полупроводниковых сферических квантовых точках, обладающих целым перечнем положительных свойств, важных для диагностики сальмонеллеза.

В связи с тем, что нанопотонное сенсорное устройство предназначено для детектирования определенных органических соединений – маркеров в биожидкостях (моча и кровь), что особенно важно для раннего выявления нарушений обмена веществ и сопровождающихся ими болезней, был проведен выбор биологически значимого вещества, являющегося своеобразным маркером на инфекционное заболевание.

Представлено теоретическое обоснование процессов в нанопотонном сенсорном устройстве при его функционировании.

Литература

1. Возианова, Ж.И. Инфекционные и паразитарные болезни [Текст] / Ж.И. Возианова. – М. : Медицина, 2002, – С. 470.
2. Инфекционные болезни и эпидемиология [Текст] : учеб. / В.И. Покровский, Г.С. Пак, В.И. Брико, Б.К. Данилкин. – 2-е изд. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 816 с.
3. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии [Текст] / под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. – М. : Мир, 2002, – С. 292.
4. Закомырдин, А.А. Пищевые токсикозы, токсикоинфекции [Текст]. / А.А. Закомырдин, Ю.И. Бочевин. – М. : Медицина, 1985.
5. Рожицкий, Н.Н. Электрохимическая люминесценция: [Текст] : монография / Н.Н. Рожицкий, А.И. Бых, М.А. Красногоровец. – Х. : ХТУРЭ, 2000, – 320 с.
6. Bard, A.J. Electrochemical methods: fundamentals and applications [Текст] / A.J. Bard, L.R. Faulkner. – USA : John Wiley & Sons, Inc., 2001. – 834 p.
7. Electrochemistry and Electrogenerated Chemiluminescence from Silicon Nanocrystal Quantum Dots [Текст] / Z. Ding, B.M. Quinn, S.K. Haram et al. – SCIENCE, 2002, – V. 296. – P. 1293 – 1297.
8. Zhong, Lin Wang Nanomaterials for Nanoscience and Nanotechnology [Текст] / Lin Wang Zhong. – Verlag : Wiley-VCH, 2000, – P. 132.
9. Rao, C. N. R. The Chemistry of Nanomaterials. [Текст] / C. N. R. Rao, A. Muller, A.K. Cheetham. – Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., 2004. – 742 p.