

Д.В.Уткин, В.Е.Куклев, П.С.Ерохин, Н.А.Осина

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАТОГЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

В обзоре представлены данные о применении методов УФ спектроскопии, спектроскопии в видимом диапазоне, ИК спектроскопии при проведении неспецифической индикации патогенных биологических агентов; ИК Фурье спектроскопии, Раман спектроскопии при их идентификации. Рассмотрены преимущества, недостатки и перспективы использования различных методов спектроскопии при мониторинге окружающей среды на наличие патогенных биологических агентов.

Ключевые слова: индикация, патогенные биологические агенты, УФ спектроскопия, ИК спектроскопия, Раман спектроскопия, Фурье спектроскопия, биолюминесценция.

D.V.Utkin, V.E.Kouklev, P.S.Erokhin, N.A.Ossina

Application of Spectroscopy Methods for Indication and Identification of Pathogenic Biological Agents

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

The review presents data on application of UV, IR and optical spectroscopy methods for non-specific indication of pathogenic biological agents, and IR Fourier spectroscopy, and Raman spectroscopy – for their identification. Considered are advantages, disadvantages and prospects of different spectroscopy methods application for monitoring of the environment for the presence of pathogenic biological agents.

Key words: indication, pathogenic biological agents, UV spectroscopy, IR spectroscopy, Raman spectroscopy, Fourier spectroscopy, bioluminescence.

Защита населения страны от биологической агрессии и других видов биологических угроз (эпидемии, природные и техногенные катастрофы) зависит от своевременного обнаружения патогенных биологических агентов (ПБА) и проведения противоэпидемических мероприятий [1]. Выявление ПБА включает в себя три функциональных звена: неспецифическую индикацию, специфическую индикацию и идентификацию (определение вида) ПБА [2].

Неспецифическая индикация основана на экспресс-обнаружении ПБА по ряду признаков (повышение белкового фона, наличие ферментативной активности), характерных для живых микроорганизмов [1]. В основе специфической индикации лежат методы лабораторного анализа, направленные на выявление характерных для каждого вида ПБА антигенов и участков генома иммунологическими и молекулярно-генетическими методами [2]. В результате исследования нативного материала экспресс-методами предварительный ответ о наличии ПБА в пробе может быть получен от 1–3 до 3–5 ч [2]. Анализ материала после биологического обогащения занимает от 18 до 72 ч [2]. Несмотря на то, что методы лабораторной диагностики характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью, в настоящее время остаются не решенными ряд вопросов:

- оснащение подразделений, осуществляющих биологическую разведку, средствами неспецифической индикации;

- сокращение времени выявления и определения

вида ПБА;

- возможность бесконтактного и безреагентного проведения анализа для повышения биологической безопасности;

- разработка автоматических средств мониторинга объектов окружающей среды на наличие ПБА.

На современном этапе развития методов лабораторной диагностики инфекционных болезней все большее применение находят физические методы, основанные на принципах анализа химического состава и молекулярной структуры клеток микроорганизмов: ультрафиолетовая (УФ) и инфракрасная (ИК) спектроскопия, биолюминесценция, Раман и ИК Фурье спектроскопия.

Методы ИК и УФ спектроскопии легли в основу разработки дистанционных средств индикации ПБА в аэрозольном состоянии – ИК и УФ лидаров (от англ. LIDAR – light detection and ranging) [1]. Лидары способны осуществлять в автоматическом режиме непрерывный мониторинг воздушного пространства без использования дополнительных реагентов. Принцип действия лидаров основан на применении ИК или УФ лазерного излучения, проходящего через слой атмосферы и отражаемого от аэрозольных частиц. ИК лидары позволяют определить наличие биологических частиц диаметром менее 20 мкм на расстоянии 5–6 км, УФ лидары детектируют биологические частицы диаметром 1–10 мкм на расстоянии 2–3 км (Trošt M., 2008). С использованием ИК лазерного излучения обнаруживают частицы как биологического, так и не биологического происхождения (снег, пыль,

порошки). УФ излучение индуцирует флуоресценцию только биологических молекул (белков) [14].

Метод индикации биологических частиц с использованием УФ спектроскопии основан на выявлении пика поглощения белковых молекул, содержащих ароматические аминокислоты (триптофан, тирозин, фенилаланин), в УФ диапазоне при длине волны 280 нм. УФ лазеры эффективны в условиях низкой освещенности, в том числе ночью. Однако наличие в воздухе аэрозолей, содержащих ароматические углеводороды (промышленные химические вещества, выхлопные газы), пыльцу растений, споры грибов, может приводить к ложноположительным результатам [28]. Для исключения подобных ложных ответов и выявления только клеток микроорганизмов нашел применение метод спектроскопии в видимом диапазоне, основанный на определении маркера метаболической активности живых клеток никотинамидаденинуклеотида (НАД), имеющего пик поглощения при длине волны 349 нм, а пик эмиссии – при длине волны 450 нм [17]. Однако указанный способ определения клеток микроорганизмов не позволяет обнаружить споры бактерий и токсины биологического происхождения, не обладающие метаболической активностью.

Для решения данной проблемы рядом авторов предложено использование многоволновой спектроскопии в УФ и видимом диапазоне (UV-VIS спектроскопия), регистрирующей наличие как белковых молекул в УФ диапазоне, так и маркеров метаболической активности (НАД, рибофлавина) в видимом диапазоне. Одновременная регистрация трех биологических маркеров (белков, НАД, рибофлавина) позволяет дифференцировать вегетативные клетки микроорганизмов, споры бактерий, белки и неорганические частицы. На основе многоволновой спектроскопии разработаны устройства для неспецифической индикации ПБА: Ultraviolet-Aerodynamic Particle Sizer (UV-APS) (TSI, Inc., США), Fluorescence Aerodynamic Particle Sizer (FLAPS) (Canadian Defense ministry, Канада), Biological Agent Warning Sensor (BAWS) (MIT Lincoln Laboratory, США), Single Particle Fluorescence Analyzer (SPFA) (Naval Research Laboratory, США) [4, 14, 28]. Детектор UV-APS сочетает в себе пробоотборник – насос для прокачивания проб воздуха, ИК лазер, определяющий размеры и количество частиц, содержащихся в пробе, и два УФ лазера, предназначенные для выявления белков, НАД и рибофлавина. V.Agranovski *et al.* показали, что чувствительность детектора UV-APS составляет 60 м.к./см³, наличие ложноположительной флуоресценции немикробных органических аэрозолей наблюдается в 0,1 % случаев [4]. Указанные устройства являются малогабаритными и могут быть использованы на мобильных постах контроля окружающей среды. Так, детектор FLAPS был интегрирован в систему индикации биологических агентов CIBADS (Canadian Integrated Biological Agent Detection System) министерства обороны Канады [14].

Одним из методических приемов, используемых для проведения неспецифической индикации микроорганизмов, является биоллюминесценция. При этом регистрируется либо собственная флуоресценция патогенов, либо флуоресценция, возникающая при взаимодействии специальных реагентов с маркерами метаболической активности клеток – аденозинтрифосфатазы, пероксидазы [3, 20, 21]. На сегодняшний день разработана коммерческая тест-система Profile-1 (New Horizon Diagnostics Inc., США), позволяющая выявлять от $3 \cdot 10^2$ до $1 \cdot 10^4$ м.к./мл в течение 5–15 мин [13]. Специфичность тест-системы составляет 100 %. Тест-система Profile-1 была использована для определения общей обсемененности пищевых продуктов [10], биологических аэрозолей [29], детекции спор бактерий [20].

Таким образом, рассмотренные выше средства ИК, УФ и видимой спектроскопии способны детектировать вегетативные клетки микроорганизмов, споры бактерий, белковые токсины в объектах окружающей среды, пищевых продуктах. Данные методы индикации характеризуются высокой чувствительностью, возможностью автоматизации исследований, способностью к длительному функционированию приборов в автономном режиме, быстротой получения ответа, в ряде случаев отсутствием прямого контакта с исследуемым материалом и необходимостью использования дополнительных биологических или химических реагентов. Данные преимущества могут быть реализованы при разработке средств неспецифической индикации ПБА и оснащении ими мобильных постов контроля окружающей среды. Однако указанные методы не позволяют определить вид ПБА.

Для специфической индикации и идентификации ПБА нашли применение методы спектроскопии, основанные на определении индивидуальных характеристик химического состава клеток микроорганизмов.

В настоящее время свое развитие в микробиологии получила колебательная ИК спектроскопия с Фурье преобразованием – ИК Фурье спектроскопия (англ. Fourier transform infrared – FT-IR) [23], которая долгие годы используется в химическом анализе чистых веществ [31]. При ИК Фурье спектроскопии исследуемый образец подвергается воздействию ИК излучения. Поглощение излучения веществом приводит к колебательным движениям молекул, регистрируемых в виде колебательного спектра. Для каждой молекулы характерны своя частота и амплитуда колебаний. Установлено, что микроорганизмы обладают индивидуальными Фурье спектрами [24, 27], что обусловлено уникальным для каждого возбудителя набором макромолекул (белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот). Определение Фурье спектров микроорганизмов позволяет дифференцировать их на самых разных таксономических уровнях, вплоть до подвидов, сероваров и штаммов. Так, установлена эффективность применения ИК Фурье спектроскопии при идентификации *Brucella sp.* [15], *Yersinia*

enterocolitica [18], *Listeria monocytogenes* [25, 26], дрожжей [30], прионов [7]. М.А. Miguel Gómez *et al.* использовали Фурье спектроскопию для определения биоваров *Brucella melitensis* и дифференциации от других видов бруцелл [15]. Показана эффективность определения биовара бруцелл в 95 % случаев. А.Е. Kuhn *et al.* с помощью ИК Фурье спектроскопии дифференцировали *Y. enterocolitica* от других видов рода *Yersinia* (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. bercovieri*, *Y. intermedia*) [18]. Авторам удалось определить вид *Y. enterocolitica* в 80 % случаев, биовар – в 98 %, серовар – в 92 %, присутствие маркера вирулентности (*ail*-гена) – в 98 %, в 100 % случаев дифференцировать штаммы *Y. enterocolitica*, *Y. bercovieri*, *Y. intermedia*, *Y. rohdei*, имеющие сходный биохимический профиль, и которые невозможно различить с использованием коммерческой тест-системы API 20E (BioMérieux, Франция). Согласно литературным данным, применение ИК Фурье спектроскопии позволяет сократить время анализа до нескольких минут, минимизировать объем исследуемого материала, повысить чувствительность иммунологических и бактериологических методов до $1 \cdot 10^3$ м.к./мл, исключить трудоемкую подготовку образцов при молекулярно-генетических методах [31].

Еще одним способом, реализуемым при индикации и идентификации ПБА, является Раман спектроскопия, основанная на комбинационном рассеянии света или эффекте Рамана [6]. Раман спектроскопия является одним из методов химического анализа, изучения состава и строения веществ. Раман спектроскопия, в отличие от других видов спектроскопии, может проводиться в широком диапазоне длин волн – от ультрафиолетовой до инфракрасной области. Из-за высокой фоновой флуоресценции воды, буферных растворов, сред в видимом диапазоне, используют спектры комбинационного рассеяния света вдали от фоновой флуоресценции – в ближнем инфракрасном диапазоне (ИК Раман спектроскопия) или ультрафиолетовом диапазоне (УФ Раман спектроскопия) [19]. При Раман спектроскопии сдвиг вторичных спектральных линий (линий-спутников) относительно первичных линий характеризует вещество. Сигнал, испускаемый каждым типом молекул, в результате их взаимодействия между собой, а также в результате различной толщины молекул является индивидуальным. УФ Раман спектроскопия была использована для детекции спор бацилл и определения их вида [22]. ИК Раман спектроскопия нашла применение в индикации и идентификации *Mycobacterium sp.* [5, 9], *Listeria sp.*, *Legionella sp.*, *Cryptosporidium sp.* [16], спор *Bacillus cereus* [12], спор *Bacillus anthracis* [8, 11, 32, 33]. Чувствительность метода при обнаружении спор бактерий составила $5 \cdot 10^4$ – $5 \cdot 10^5$ спор/мл [32]. Показано, что Раман спектроскопия имеет ряд преимуществ перед другими методами лабораторной диагностики инфекционных болезней (иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция, иммуноблоттинг): отсутствие этапов подготовки проб

(отмывка, лизис клеток, разделение белков, выделение ДНК/РНК), высокая скорость анализа (5 мин), высокая информативность [19]. Основное преимущество Раман спектроскопии – возможность проведения анализа без прямого физического контакта с биологическим агентом. Это свойство нашло отражение при идентификации патогенных вирусов, находящихся внутри инфицированных клеток [19].

Таким образом, наряду с бактериологическими, иммунологическими и молекулярно-генетическими методами индикации и идентификации ПБА, все большее применение находят физические методы спектроскопического анализа. Анализ научной литературы показал возможность использования методов ИК, УФ спектроскопии, многоволновой спектроскопии, биолюминесцентного анализа при неспецифической индикации ПБА. При этом указанные методы позволяют решить ряд вопросов: возможность дифференциации вегетативных и споровых форм микроорганизмов, белков и неорганических молекул, сокращение времени анализа до нескольких минут, в ряде случаев, проведение анализа в автономном (автоматическом) режиме в течение длительного времени без использования дополнительных реагентов, способность выявлять ПБА на определенном расстоянии без контакта с исследуемым материалом. Данные свойства могут быть использованы при разработке средств мониторинга объектов окружающей среды.

Уникальные характеристики отдельных видов микроорганизмов, получаемые с помощью методов ИК Фурье и Раман спектроскопии, нашли свое применение при идентификации ПБА. Преимущества методов Фурье и Раман спектроскопии перед традиционными методами лабораторной диагностики связаны с минимальным расходом исследуемого материала, быстротой выдачи ответа, отсутствием длительных этапов пробоподготовки, необходимости использования меченых реагентов и хромогенных субстратов, возможностью выявления труднокультивируемых и некультивируемых форм бактерий, вирусов. Все это указывает на перспективу использования методов спектроскопии для неспецифической, специфической индикации и идентификации ПБА.

Работа выполнена по государственному контракту № 57-Д от 29.06.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Злобин В.И., Евстигнеев В.И. Специфическая и неспецифическая индикация микроорганизмов в окружающей среде. Вест. Рос. АМН. 2002;11:37–42.
2. Практическое пособие для подготовки врачей-бактериологов и эпидемиологов по вопросам противодействия биотерроризму. Волгоград; 2004. 233 с.
3. Сквиррелл Д.Д. Способ и устройство для определения присутствия и/или количества клеточного материала в газовой среде. Патент РФ № 2142016, опубл. 27.11.1999.
4. Agranovski V., Ristovski Z.D., Hargreaves M., Blackall P.J., Morawska L. Real-time measurement of bacterial aerosols with the UVAPS: performance evaluation. J. Aerosol Sci. 2002; 34:301–17.

5. *Aziz M.A., Kholy A.E.* Laser-Raman spectroscopy: a novel approach for sensitive molecular characterization of the *Mycobacterium* genomic DNAs. *Arab. J. Biotech.* 2006; 9(3):453–66.
6. *Baena J.R., Lendl B.* Raman spectroscopy in chemical bioanalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004; 8:534–9.
7. *Beekes M., Lasch P., Naumann D.* Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. *Vet. Microbiol.* 2007; 123(4):305–19.
8. *Bell S.E.J., Mackle J.N., Sirumithu N.M.S.* Quantitative surface-enhanced Raman spectroscopy of dipicolinic acid-towards rapid anthrax endospore detection. *Analyst.* 2005; 130:545–9.
9. *Buijtiels P.C.A.M., Willemsse-Erix H.F.M., Petit P.L.C., Endtz H.P., Puppels G.J., Verbrugh H.A. et al.* Rapid Identification of *Mycobacteria* by Raman Spectroscopy. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(3):961–5.
10. *Cutler C.N., Dorsa W.J., Sirogusa G.R.* A rapid microbial ATP bioluminescence assay for meat carcasses. *Dairy Food Environ. Sanit.* 1996; 16:726–36.
11. *Esposito A.P., Talley C.E., Huser T., Hollars C.W., Schaldach C.M., Lane S.M.* Analysis of single bacterial spores by micro-Raman spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 2003; 57:868–71.
12. *Farquharson S., Grigely L., Khitrov V., Smith W., Sperry J.F., Fenerty G.* Detecting *Bacillus cereus* spores on a mail sorting system using Raman spectroscopy. *J. Raman Spectr.* 2004; 35:82–6.
13. *Fatah A.A., Arcilesi R.D., Chekol T., Lattin C.H., Sadik O., Aluoch A.* Guide 101–06 for the Selection of Biological Agent Detection Equipment for Emergency First Responders. 2nd ed. 2007.
14. *Fatah A.A., Barrett J.A., Arcilesi R.D., Ewing K.J., Lattin C.H., Moshier T.F.* An Introduction to Biological Agent Detection Equipment for Emergency First Responders. *NIJ Guide 101–00.* 2001. 53 p.
15. *Gómez M.A., Miguel, Pérez M.A., Bratos, Gil F.J., Martín, Díez A., Dueñas, Rodríguez J.F., Martín, Rodríguez P., Gutiérrez et al.* Identification of species of *Brucella* using Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Microbiol. Methods.* 2003; 55(1):121–31.
16. *Grow A.E., Wood L.L., Claycomb J.L., Thompson P.A.* New biochip technology for label-free detection of pathogens and their toxins. *J. Microbiol. Methods.* 2003; 53:221–33.
17. *Jeys T.H., Herzog W.D., Hybl J.D., Czerwinski R.N., Sanchez A.* Advanced Trigger Development. *Lincoln Laboratory Journal.* 2007; 17(1):29–62.
18. *Kuhm A.E., Suter D., Felleisen R., Rau J.* Identification of *Yersinia enterocolitica* at the Species and Subspecies Levels by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(18):5809–13.
19. *Lambert P.J., Whitman A.G., Dyson O.F., Akula S.M.* Raman spectroscopy: the gateway into tomorrow's virology. *Virology.* 2006; 3:51.
20. *Lee J., Deininger R.A.* A rapid screening method for the detection of viable spores in powder using bioluminescence. *Luminescence.* 2004; 19:209–11.
21. *Lim D.V., Simpson J.M., Kearns E.A., Kramer M.F.* Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(4):583–607.
22. *López-Díez E.C., Goodacre R.* Characterization of microorganisms using UV resonance Raman spectroscopy and chemometrics. *Anal. Chem.* 2004; 76(3):585–91.
23. *Preisner O., Lopes J.A., Guiomar R., Machado J., Menezes J.C.* Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in bacteriology: towards a reference method for bacteria discrimination. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007; 387(5):1739–48.
24. *Rabia D., Abubakar M., Javed A.M., Shamim S., Irfan U., Qurban A.* Biological characterization and protein profiles of two model bacteria by SDS-page and FT-IR». *ARPN J. Agricult. Biol. Sci.* 2008; 3(5–6):6–16.
25. *Rebuffo C.A., Schmitt J., Wenning M., von Stetten F., Scherer S.* Reliable and rapid identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species by artificial neural network-based Fourier transform infrared spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72:994–1000.
26. *Rebuffo-Scheer C.A., Schmitt J., Scherer S.* Differentiation of *Listeria monocytogenes* serovars by using artificial neural network analysis of Fourier-transformed infrared spectra. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73:1036–40.
27. *Rodriguez-Saona L.E., Khambaty F.M., Fry F.S., Dubois J., Calvey E.M.* Detection and identification of bacteria in a juice matrix with Fourier transform-near infrared spectroscopy and multivariate analysis. *J. Food Prot.* 2004; 67(11):2555–9.
28. *Sivaprakasam V., Huston A.L., Scotto C., Eversole J.D.* Multiple UV wavelength excitation and fluorescence of bioaerosols. *Optics Express.* 2004; 12(19):4457–66.
29. *Stopa P.J., Tieman D., Coon P.A., Milton M.M., Paterno D.* Detection of biological aerosols by luminescence techniques. *Field Anal. Chem. Technol.* 1999; 3:283–90.
30. *Wenning M., Seiler H., Scherer S.* Fourier-transform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68:4717–21.
31. *Yalçın Duygu D., Baycal T., Açıkgöz İ., Yıldız K.* Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy for Biological Studies. *G.U. Journal of Science.* 2009; 22(3):117–21.
32. *Zhang X., Yonzon C.R., Van Duyne R.P.* An electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy approach to anthrax detection. *Proc. SPIE.* 2003; 5221:82–91.
33. *Zhang X., Young M.A., Lyandres O., Van Duyne R.P.* Rapid detection of an anthrax biomarker by surface-enhanced Raman spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; 127:4484–9.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. *Zlobin V.I., Evstigneev V.I.* [Specific and non-specific indication of microorganisms in the environment]. *Vest. Ross. Acad. Med. Nauk.* 2002; 11:37–42.
2. [Practical Guide for Training of Bacteriologists and Epidemiologists on the Problems of Bioterrorism Counteraction]. *Volgograd;* 2004. 233 p.
3. *Squirrell D.J.* [Cellular material detection in gaseous medium apparatus and method]. *Patent PCT/GB1995/00544.* 28.09.1995.

Authors:

Utkin D.V., Kouklev V.E., Erokhin P.S., Ossina N.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". *Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia.* E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Уткин Д.В., Куклев В.Е., Ерохин П.С., Осина Н.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 15.10.10.