

Иммуночипы в серологической диагностике инфекционных и аллергических болезней

М. Л. Маркелов, Г. А. Шипулин, В. И. Покровский
ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Важной составляющей санитарно-эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями является система методов и средств их лабораторной диагностики. Быстрое и точное выявление и характеристика возбудителя инфекционного заболевания — определяющий фактор для своевременного проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий.

В настоящее время в рутинной лабораторной диагностике инфекционных заболеваний используют прямые методы выявления возбудителей, их антигенов или нуклеиновых кислот, а также непрямые методы, направленные на выявление специфических факторов гуморального и клеточного иммунитета. В ряде случаев сходные по первоначальной симптоматике, но существенно различающиеся по смертности и тяжести течения инфекционные болезни вызываются разными патогенами и иногда являются следствием смешанных инфекций.

Часто возникает необходимость исключения патологических аллергических состояний, сходных по клиническим проявлениям с некоторыми инфекционными заболеваниями. Это особенно важно в связи с возрастанием количества случаев аллергических заболеваний, обусловленных контактом с ингаляционными, пищевыми и профессиональными алергенами на фоне неблагоприятной экологической ситуации в ряде регионов РФ.

Актуальность работ по совершенствованию средств диагностики возбудителей природно-очаговых, особо опасных и социально значимых инфекционных болезней обусловлена целым рядом особенностей социально-экономического развития РФ в постсоветский исторический период, влияющих на заболеваемость инфекционными болезнями.

Активизация миграционных процессов в последние годы приводит к возрастанию вероятности завоза (заноса) возбудителей инфекций из-за рубежа (холеры, ТОРС, гриппа птиц и др.) и проведения террористических актов с применением биологических агентов.

На территории РФ существует большое количество активных природных очагов особо опасных и зоонозных (поражают животных и человека) инфекций, зарегистрировано более 35 000 неблагополучных по сибир-

ской язве стационарных пунктов (скотомогильников).

Чрезвычайно высокую опасность в эпидемиологическом плане представляют собой инфекции, относящиеся к I группе патогенности и вызывающие высокую смертность: возбудители чумы, натуральной оспы, геморрагических лихорадок Марбург, Эбола и др. Проблема ранней и эффективной лабораторной диагностики перечисленных заболеваний особенно важна для своевременного распознавания и выбора эффективных средств предупреждения их распространения.

Реальная угроза биотерроризма придаёт особую важность работам по созданию качественно новых, эффективных технологий быстрого выявления патогенных биологических агентов.

Не меньшую опасность представляют собой относящиеся ко II группе патогенности флавивirusы (возбудители клещевого энцефалита, омской геморрагической лихорадки, японского энцефалита, лихорадки Западного Нила, желтой лихорадки, лихорадки денге, геморрагической лихорадки Альхурма и др.), буньяvirusы (virusы геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) и Конго-Крымской геморрагической лихорадки (ККГЛ), рабдовирус (virus бешенства), возбудители туляремии, риккетсиозов, боррелиозов. Большинство инфекционных заболеваний, вызываемых этими агентами, относятся к зооантропонозам и формируют в природной среде постоянно проявляющиеся очаги инфекции. Многие из перечисленных возбудителей широко распространены на территории РФ.

В последние годы произошли резкие изменения циркуляции этих агентов, сформировались новые очаги инфекции, появились новые геноварианты virusов, которые стали циркулировать в густонаселённых регионах России. Так, с 1999 г. наблюдается активизация очагов Конго-Крымской геморрагической лихорадки на юге РФ. Опасность данного заболевания для населения эндемичных регионов обусловлена высоким уровнем смертности (до 50 % от числа заболевших) и возможностью его передачи от человека к человеку. Открыты и описаны новые геноварианты хантаvirusов, циркулирующие на Дальнем Востоке России. В Волго-

Потребность в диагностических тест-системах на упомянутые инфекции определяется необходимостью проведения в РФ десятков миллионов анализов в год.

граде (1999 г.), Краснодаре (1999 г.) и Астрахани (1999 и 2005 гг.) были зарегистрированы вспышки заболевания, вызываемого вирусом лихорадки Западного Нила.

При отсутствии средств специфической профилактики и лечения в отношении этой группы инфекций, действенным механизмом снижения медицинского и экономического ущерба от данных групп заболеваний является их быстрая диагностика, позволяющая своевременно проводить эффективные противоэпидемические мероприятия. Проблема современного подхода к лабораторной диагностике данной группы инфекций состоит в фактическом отсутствии на российском рынке промышленно выпускаемых и доступных наборов реагентов, позволяющих комплексно подходить к расшифровке симптоматически сходных, но вызываемых разными микроорганизмами, инфекций.

При современном уровне биотехнологии международные террористические группы имеют возможность организации производства биологического оружия всего за несколько десятков тысяч долларов. В число основных потенциальных агентов биотерроризма входят возбудители чумы, сибирской язвы, туляремии, натуральной оспы, геморрагических лихорадок.

Реальная угроза биотерроризма придаёт особую важность работам по созданию качественно новых, эффективных технологий быстрого выявления патогенных биологических агентов (ПБА). Такие технологии должны предоставлять возможность для одновременного выявления целого ряда маркеров патогенных микроорганизмов, поскольку при использовании ПБА в качестве биологического оружия отсутствует опережающая информация об их природе.

Проблема внутриутробных инфекций является одной из основных в акушерской практике, в связи с высоким риском нарушений развития плода и рождения больных детей у инфицированных рожениц. Остроту проблеме придаёт сложная демографическая ситуация в России, характеризующаяся резким падением суммарного коэффициента рождаемости до 1,3 (численность родившихся на одну женщину в течение жизни). Для воспроизводства населения коэффициент рождаемости должен быть не менее 2,14–2,15.

Тяжесть данной проблемы усугубляется широкой распространённостью инфекций плода и новорождённых. Так, в 2005 г. в РФ родилось более 32 000 детей с внутриутробной инфекцией. При этом умерло почти 2 % детей с признаками внутриутробной инфекции. Спектр микроорганизмов, способных вызвать внутриутробные инфекции (TORCH-инфекции), разнообразен

и включает возбудителей урогенитальных инфекций (хламидии, микоплазмы, уреаплазмы, бледная трепонема, вирусы простого герпеса, цитомегаловирус), а также токсоплазма (токсоплазмы) и краснухи (вирус краснухи). В случае если беременность при TORCH-инфекции не заканчивается самопроизвольным выкидышем, у новорождённого развиваются множественные пороки сердца, поражения глаз (глаукома, катаракты), порок развития органа слуха (поражение слухового нерва), пороки развития центральной нервной системы, костно-суставной системы и т.д. В структуре причин ранней смертности новорождённых внутриутробные инфекции занимают одно из первых мест, уступая лишь врождённым порокам развития.

Вакцинопрофилактика TORCH-инфекций в настоящее время проводится только в отношении краснухи. Лечение TORCH-инфекций во время беременности часто не может быть проведено в связи с токсичностью лекарственных препаратов для плода. Поэтому правильной врачебной тактикой в профилактике внутриутробного инфицирования является выявление факта инфицированности женщин до беременности и проведение своевременной специфической терапии или выявление активного инфекционного процесса во время беременности, что может являться показанием для её прерывания при доказательстве инфицирования плода.

Диагностика внутриутробных инфекций требует комплексного анализа клинических данных и результатов лабораторно-инструментальных исследований. С помощью современных методов лабораторной диагностики удаётся выявлять группы риска по тем или иным видам внутриутробной инфекции. В настоящее время разработаны все необходимые средства скрининговой диагностики TORCH-инфекций. Нерешённой проблемой данного направления инфектологии является отсутствие на российском рынке доступных подтверждающих тест-систем и отсутствие тестов, позволяющих проводить комплексное обследование как на основные микроорганизмы, входящие в состав TORCH-комплекса, так и на другие возбудители инфекций, редко встречающиеся при беременности.

В последние годы появились научные публикации, в которых предлагается использовать ДНК-чипы в качестве инструмента для быстрой расшифровки вспышек инфекционных заболеваний неясной этиологии, т. е. для выявления возбудителей ранее неизвестных инфекционных болезней или известных возбудителей, которые в настоящее время претерпели генетические изменения. Таким образом, очевидна ценность ДНК-чипов для научно-исследовательских работ.

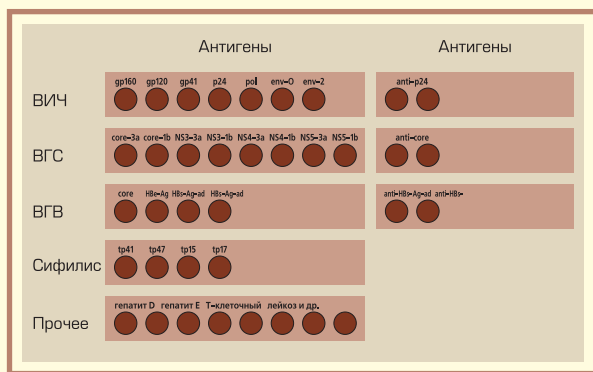


Рис. 1. Проект структуры иммуночипа для скрининга донорской крови

В последнее время в России складывается крайне неблагоприятная ситуация по заболеваемости гепатитами, вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) и сифилисом.

По данным Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, в РФ на декабрь 2006 г. зарегистрировано около 384 тыс. людей с ВИЧ-инфекцией, среди них 1963 ребенка, заразившихся от ВИЧ-инфицированных матерей. Только за 2006 г. выявлено более 30 тыс. новых случаев инфицирования ВИЧ лиц репродуктивного возраста.

Наряду с сохраняющейся в Российской Федерации тенденцией снижения заболеваемости передаваемыми через кровь вирусными гепатитами, быстрыми темпами возрастает количество пациентов с хроническим гепатитом и циррозом печени. Так, число зарегистрированных носителей гепатита С в 2005 г. составило 151 452 человека.

Остаётся тревожной ситуация по уровню заболеваемости сифилисом (в среднем 120 случаев на 100 тыс. населения). Особенно тяжёлое положение сложилось среди молодежи. Среди всех новых случаев сифилиса почти 14 % выявлено у подростков до 19 лет и 43 % у молодых людей 20–29 лет. За период с 1990 по 2000 г. число подростков до 19 лет, заболевших сифилисом, увеличилось в десятки раз.

Высокая распространенность данной группы инфекций приводит к высокой вероятности их передачи при переливании крови и трансплантациях. Поэтому специалисты службы переливания крови значительное внимание уделяют обследованию донорской крови на маркеры вирусных гепатитов В и С, ВИЧ и сифилиса. Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 14 сентября 2001 г. № 364 в соответствии с Законом Российской Федерации от 9 июня 1993 г. № 5142-1 «О донорстве крови и её компонентов» утверждён «Порядок медицинского обследования донорской крови и её компонентов». Общим для всех видов донорства и категорий доноров является обследование крови на наличие антител к ВИЧ, возбудителю сифилиса, антигена вируса гепатита В, антител к вирусу гепатита С.

Потребность в диагностических тест-системах на упомянутые инфекции определяется необходимостью проведения в Российской Федерации десятков миллионов анализов в год. Так, например, по данным оперативного мониторинга реализации мероприятий по выявлению носителей ВИЧ в рамках Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с заболеваниями социального характера» по компоненту «Профилактика ВИЧ-инфекции, гепатитов В и С, выявление и лечение больных со СПИДом» по состоянию на 01.11.2006 г. обследовано на наличие ВИЧ-инфекции 17 408 037 человек, гепатита В и С — 11 925 617 человек. В 2005 г. по Национальному проекту «Здоровье» для выявления ВИЧ-инфекции и гепатитов В и С были приобретены тест-системы и расходные материалы к ним на сумму 1 млрд 75 млн рублей.

В соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 30 июля 2001 г. № 292 «Об использовании иммуноферментных тест-систем для выявления антител к ВИЧ в сыворотке крови человека» в случае положительных результатов первичных исследований сывороток крови для окончательного подтверждения наличия антител к вирусу иммунодефицита человека применяется метод иммунного блоттинга. Постановка окончательного лабораторного диагноза без одного из подтверждающих тестов запрещается.

Обязательная двухшаговая система контроля является дорогой из-за высокой стоимости подтверждающих тестов; кроме того, манипуляции по дополнительному подтверждению положительных результатов первичного тестирования традиционными методами иммуноферментного анализа (ИФА) требуют значительного объёма исследуемого биологического материала.

Исходя только из цены диагностических наборов (без учёта заработной платы медперсоналу и стоимости расходных материалов), постановка одного первичного анализа на ВИЧ-инфекцию, гепатит С или В обходится в среднем 35–50 руб. на каждую инфекцию при использовании отечественных тест-систем, применение тест-систем зарубежного производства приводит к повышению стоимости анализа в 3–4 раза. Подтверждение одного позитивного результата с помощью иммунного блоттинга (в основном зарубежного производства) обходится государству дополнительно в 700–1000 руб.

Таким образом, на данном этапе развития отечественного здравоохранения актуальной становится задача создания и внедрения в медицинскую практику новейших методов лабораторного анализа, обладающих высокой технологичностью, информативностью, производительностью и низкой себестоимостью для одновременного выявления целого ряда патогенных микроорганизмов и быстрой дифференциальной диагностики инфекционных заболеваний с высокой эффективностью.

Тенденции развития современной биотехнологии свидетельствуют о том, что перечисленным требованиям удовлетворяют биочиповые диагностические системы, созданные на основе новейших протеомных и нанотехнологий. При конструировании биочипов сочетаются принципы миниатюризации и многофакторного анализа. Принцип миниатюризации, реализованный в биочипах, приводит к снижению себестоимости анализа, повышению производительности выполнения исследований (более 100 параметров в течение одного исследования), а также к полной автоматизации рабочего места.

Концепция биочипа возникла в конце 80-х начале 90-х годов XX в. в связи с необходимостью проведения структурного и функционального анализа целых геномов организмов. Следует отметить, что существенный вклад в развитие технологии биочипов был сделан российскими учёными под руководством академика А. Д. Мирзабекова, которые ещё в 1989 г. предложили технологию создания ДНК-биочипа и использования его в качестве инструмента для анализа первичной структуры геномной ДНК (генов). В настоящее время ни одно сколь либо серьёзное исследование, посвящённое поиску маркеров заболеваний (онкологических, аутоиммунных, аллергических и т.д.) и требующее анализа многокомпонентных биологических препаратов, не обходится без использования биочипов. К 2007 г. количество публикаций, в которых в качестве инструмента научного исследования упоминаются ДНК-чипы, достигло 20 тыс.

Биочип, как правило, представляет собой слайд-пластинку площадью несколько квадратных сантиметров (от 0,1 до 10 см²) с фиксированными на его поверхности в виде индивидуальных микроочек (диаметр от 20 до 500 микрон) образцами биологически активных препаратов (рис. 1). Современные технологии микропечати позволяют наносить на биочип десятки тысяч индивидуальных образцов молекул нуклеиновых кислот, белков, пептидов, полисахаридов, культур клеток, микроорганизмов и т.д.

При этом необходимые количества индивидуальных препаратов могут составлять лишь триллионные и миллиардные доли грамма (пикограммы и нанogramмы). Практически любые субстанции (сыворотка, цельная кровь, фекалии, микробиологические препараты, суспензии органических веществ, продуктов питания, почвы и т.д.) после несложной предварительной обработки могут быть подвергнуты анализу с помощью биочипа. Для этого экстрагированные из препаратов и химически модифицированные нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) или белки переносятся на поверхность биочипа, и далее осуществляется регистрация процессов межмолекулярных взаимодействий на поверхности биочипа с помощью флуоресцентных, хемилюминисцентных или масс-спектрометрических методов.

Применение белковых биочипов обеспечивает как высокую производительность и специфичность анализа биологических препаратов, так и очень высокую чувствительность анализа, превышающую аналогичные показатели для «золотого стандарта».

Исторически наибольшее развитие получила технология анализа сложных гетерогенных смесей ДНК или РНК с помощью ДНК-чипов, основными элементами которых являются так называемые олигонуклеотидные зонды. Количество индивидуальных точек с уникальными зондами в пределах одного чипа может достигать сотен тысяч.

Так, например, фирма «Affimetrix» (США) предлагает для использования в исследовательских целях для анализа первичной структуры генома человека ДНК-чип, на поверхности которого расположено около 250 000 индивидуальных олигонуклеотидных зондов. По мере накопления информации об особенностях строения генома человека (которая опять же получается с помощью ДНК-чипов) станет возможным проведение клинических исследований, направленных на оценку индивидуальной предрасположенности каждого человека к развитию онкологических заболеваний, восприимчивости к инфекционным заболеваниям, устойчивости к воздействию факторов окружающей среды и т. д. Таким образом, в системе практического здравоохранения появятся высокотехнологичные средства на основе ДНК-чипов для определения индивидуального функционального резерва организма.

Зарубежными и отечественными учёными разработаны ДНК-чипы, которые можно использовать в качестве инструмента для генетического анализа микроорганизмов или выявления генетического материала одновременно нескольких патогенных микроорганизмов. Кроме того, в последние годы появились научные публикации, в которых предлагается использовать ДНК-чипы в качестве инструмента для быстрой расшифровки всплеск инфекционных заболеваний неясной этиологии, т.е. для выявления возбудителей ранее неизвестных инфекционных болезней или известных возбудителей, которые в настоящее время претерпели генетические изменения. Таким образом, очевидна ценность ДНК-чипов для научно-исследовательских работ.

Несмотря на то, что из-за высокой стоимости в практическом здравоохранении ДНК-чипы пока не нашли широкого применения, имеются примеры экономически оправданного применения ДНК-чипов. В частности, на территории РФ зарегистрированы (ООО «Биочип-ИМБ») тест-системы на основе

ДНК-чипов для определения устойчивости возбудителя туберкулёза (*Mycobacterium tuberculosis*) к лекарственным препаратам. Немецкая фирма «Chipron» предлагает целый спектр тест-систем для выявления и генотипирования микобактерий, стафилококков, энтеробактерий, папилломавирусов человека и т. д. с помощью ДНК-чипов.

В связи с расшифровкой генома человека и геномов почти 1000 других организмов возникло и активно развивается новое направление молекулярной биологии — протеомика. Одной из основных задач протеомики является высокопроизводительный функциональный анализ белков сложных биологических систем. Очевидным практическим выходом исследований в области протеомики является выявление белковых маркеров заболеваний, белковых мишеней лекарственных веществ, определение белков, вовлечённых в развитие заболеваний.

За счёт многофакторного анализа с помощью биочипов можно осуществлять быструю одновременную детекцию множества видов возбудителей особо опасных инфекций с характеристикой их по важнейшим признакам (патогенность, таксономическая принадлежность), что особенно важно при угрозе биотеррористических актов.

Последние достижения биотехнологии (в частности, в области производства рекомбинантных аналогов природных белков и антител) и нанотехнологии (создание сверхтонких полимерных плёнок на поверхностях слайдов) открыли возможности для создания белковых биочипов, т.е. микрочипов с фиксированными на них антигенами одновременно нескольких патогенных микроорганизмов или антителами к ним. Такие биочипы особенно ценны для протеомики, поскольку предоставляют возможность для высокопроизводительных исследований белок-белковых взаимодействий, а также взаимодействий белков с лекарственными препаратами, нуклеиновыми кислотами, субстратами ферментов и т.д.

Для проведения протеомных исследований американская фирма «Invitrogen» предлагает единый биочип, содержащий 8000 индивидуальных белков человека, сгруппированных по принципу функциональной активности. Данный биочип включает в себя структурные белки, ферменты различной специфичности, транскрипционные факторы; мембранные белки-рецепторы; протеолитические белки; белки, вовлечённые в механизм программированной гибели клеток (апоптоз) и т.д. Фирма «Takara Bio Company» (Япония) выпускает биочип, содержащий на площади

20 520 мм 500 индивидуальных образцов моноклональных антител к функциональным доменам белков всех известных классов. Данный биочип позволяет провести работу по отнесению неизвестных белков к определённому классу и, следовательно, получить информацию об их функции всего за 2–3 дня. С помощью такого биочипа можно выполнить работу, которая ещё 5 лет назад требовала минимум 2–3 мес. работы научной группы из 3–4 человек.

Есть примеры эффективного применения белковых биочипов для анализа гормонального статуса пациентов и для определения профиля кровяных факторов (цитокинов) сыворотки доноров.

Более 10 зарубежных компаний производят биочипы, которые позволяют получать количественную оценку содержания в крови человека одновременно десятков белковых молекул со специфическими функциями, т.е. информацию, необходимую для определения иммунного статуса обследуемого пациента. Получаемая с помощью таких биочипов информация крайне важна при определении схем лечения онкологических больных или оценки напряжённости иммунитета населения в эпидемиологически неблагоприятных географических районах.

Другим удачным примером применения биочипов в практическом здравоохранении является продукция австрийской фирмы «VBC-Genomics» — биочип для алергодиагностики одновременно на несколько десятков природных аллергенов. Необходимость тестирования сыворотки крови на наличие антител одновременно к большому количеству аллергенов делает современные тест-системы на основе иммуноферментного анализа крайне громоздкими и очень дорогими. Применение биочипов (в частности, производства фирмы «VBC-Genomics») приводит к снижению себестоимости анализа в десятки раз и практически снимает ограничения по количеству используемых в одном анализе аллергенов. Немаловажным также является тот факт, что для проведения анализа на белковых биочипах требуются микроколичества препаратов крови, существенно меньшие трудозатраты и время, необходимое для тестирования, чем при постановке иммуноферментного анализа в традиционном формате.

В последние 2–3 года в зарубежной научной литературе появились публикации о разработках биочипов (иммуночипов) для иммунологической диагностики инфекционных заболеваний человека, в частности, вирусных гепатитов С и В и внутриутробных инфекций.

При использовании специальных лазерно-оптических устройств (флюоресцентных сканеров) удаётся достичь очень высоких показателей специфичности и чувствительности анализа на биочипах. Кроме того, за счёт специальных методик ферментативного усиления сигнала и применения специальных микрофлюидных ячеек для перемешивания микроколичеств

препаратов чувствительность анализа на биочипах может достигать фемтомолярных (10⁻¹⁵ моль) и теоретически атомолярных (10⁻¹⁸ моль) количеств белка в тестируемых жидкостях.

Таким образом, применение белковых биочипов обеспечивает не только высокую производительность и специфичность анализа биологических препаратов (например, анализ сыворотки или плазмы на наличие антител к патогенным микроорганизмам), но и очень высокую чувствительность анализа, превышающую аналогичные показатели для «золотого стандарта» — однокомпонентного иммуоферментного анализа в традиционном формате.

К сожалению, несмотря на высокую эффективность применения в молекулярной биологии, на долю «белковых» биочипов, используемых в практической медицине, пока приходится только 7–10 % общего объёма мирового производства биочипов.

Медленное внедрение белковых биочипов в практическое здравоохранение обусловлено рядом факторов. Прежде всего, белки (основные компоненты биочипов) отличаются огромным разнообразием, поэтому при разработке технологии производства биочипов следует учитывать необходимость сохранения ими (белками) своих структурных и функциональных свойств. Это, в свою очередь, приводит к необходимости проведения большой исследовательской работы по подбору условий нанесения каждого конкретного класса белков на биочип. Кроме того, требуется проведение работ по сравнительным испытаниям тест-систем на основе биочипов с традиционными методами, что является необходимым условием допуска новых диагностических систем к применению в практическом здравоохранении.

Наконец, на сегодняшний день не существует высокопроизводительных универсальных аппаратно-программных диагностических комплексов, пригодных для проведения иммунологических анализов, с помощью биочипов в условиях отечественных диагностических лабораторий. Исключение составляет лишь продукция английской компании «Randox Laboratories Ltd» — специализированный диагностический комплекс «Evidence». Однако цена этого комплекса составляет около 8 млн рублей, а стоимость анализов, проводимых с его помощью, в несколько раз выше себестоимости тестирования биологических препаратов с использованием отечественных диагностических наборов на основе иммуоферментного анализа.

В 2006 г. в РФ в рамках межведомственной программы «Протеомика в медицине и биотехнологии» на базе Федерального государственного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека проводились научные работы по созданию биочипов для диагностики заболеваний, вызываемых спирохето-

подобными микроорганизмами. На примере сифилиса и боррелиоза показана принципиальная возможность проведения скринингового и подтверждающего тестирования с помощью универсального биочипа сыворотки пациентов на наличие специфических антител одновременно и к природно-очаговым инфекциям, и к инфекциям, передаваемым через кровь.

В настоящее время проводятся работы по расширению спектра тестируемых с помощью упомянутого биочипа инфекций и включения в него антигенов лептоспир, а также рекомбинантных антигенов вирусного гепатита С и вируса иммунодефицита человека.

Результаты предварительного тестирования этих биочипов на клиническом материале и сравнение их с традиционными методами диагностики полностью согласуются с данными, представленными в научных публикациях, подтверждают высокую специфичность и чувствительность иммунологических анализов, проводимых с применением биочипов. Из вышесказанного понятно, что для наиболее эффективного использования возможностей, которые предоставляет биочип при постановке иммунологического анализа, следует наносить на биочип максимальное количество вариантов антигенов, соответствующих патогенным микроорганизмам.

Технология биочипов позволяет проводить иммунологический анализ одновременно и к инфекциям, передаваемым через кровь, и к природно-очаговым инфекциям, и к внутриутробным инфекциям. При наличии универсального аппаратно-программного комплекса для проведения иммунологических анализов с помощью биочипов, а также при условии разработки технологии нанесения на поверхность активированных слайдов-чипов микроколичеств препаратов природных аллергенов возможно создание тест-систем и для аллергодиагностики (рис. 2).

В ряде случаев применение иммуночипов позволит совместить скрининг и подтверждение полученных результатов. Например, возможно сокращение



Рис. 2. Принцип работы тест-системы для серодиагностики на основе иммуночипа.

Цитируется по сайту <http://www.vbc-genomics.com> фирмы VBC-GENOMICS Bioscience Research GmbH

Таблица 1

Оценка себестоимости проведения иммунологического анализа на некоторые передаваемые через кровь инфекции с помощью отечественных тест-систем и биочипов

Диагностические тест-системы отечественных производителей	Себестоимость одного анализа (без учёта накладных расходов диагностических лабораторий), рубли	Необходимое количество анализов в год при 20 % охвате населения, млн	Стоимость необходимого количества анализов, млн рублей
Сифилис, IgG	10 – 75	28,8	288 — 2 160
Вирус иммунодефицита человека, IgG/IgM	45 — 100	28,8	1296 — 2880
Вирус гепатита В, HBsAg	15 — 120	28,8	432 — 3456
Вирус гепатита С, IgG	50 — 70	28,8	1440 — 2016
Комплексное обследование на выявление четырех инфекций: сифилис, IgG; вирус иммунодефицита человека, IgG/IgM; вирус гепатита В, HBsAg; вирус гепатита С, IgG	120 — 365	28,8	3456 — 10512
Комплексный универсальный иммуночип на четыре инфекции	20	28,8	576
Экономия за счёт использования комплексного иммуночипа, млн рублей			2880—9936

в 1,5–2 раза бюджетных расходов в системе переливания крови в случае применения серологических иммуночипов на один только сифилис.

За счёт многофакторного анализа с помощью биочипов можно осуществлять быструю одновременную детекцию множества видов возбудителей особо опасных инфекций с характеристикой их по важнейшим признакам (патогенность, таксономическая принадлежность), что особенно важно при угрозе биотеррористических актов.

Использование универсальных аппаратно-программных диагностических комплексов на основе иммуночипов позволило бы существенно повысить эффективность и снизить стоимость диагностики за счёт одновременного комплексного тестирования биологических препаратов на наличие маркеров не только социально значимых инфекционных болезней, но и других групп инфекционных заболеваний, а также аллергических состояний. Повышение достоверности определения природы инфекционного агента за счёт применения универсальных иммуночипов на широкий спектр инфекций позволит практикующим врачам лечебно-профилактических учреждений делать более точные

оценки прогноза течения заболевания и выбирать наиболее адекватный курс терапии.

Для расширения работ в направлении создания диагностических иммуночипов и в соответствии с постановлением Правительства Российской Федерации от 19 апреля 2005 г. № 239 «Об утверждении Положения о разработке и реализации ведомственных целевых программ» Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека была подготовлена и представлена на рассмотрение в Министерство экономического развития и торговли целевая программа ведомства «Научная и промышленная база производства в РФ средств нового поколения для высокоэффективной диагностики инфекционных и аллергических заболеваний человека». Одним из основных разработчиков программы выступило Федеральное государственное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии», на базе которого функционирует один из крупнейших в РФ Центр молекулярной диагностики инфекционных и аллергических заболеваний.

Предметом предлагаемой целевой программы ведомства является разработка и организация произ-

водства универсальных комплексов для диагностики не только социально значимых инфекционных болезней (туберкулёз, ВИЧ-инфекция, инфекции, передаваемые половым путём), но и гораздо более широкого спектра инфекционных и аллергических заболеваний человека. Предлагаемые к разработке в рамках данной программы биотехнологические решения и производственная инфраструктура могут быть использованы для создания биочипов для диагностики онкологических, аутоиммунных заболеваний, для выявления токсинов в окружающей среде, продуктах питания и т.д.

При массовом производстве комплексного иммуночипа только на четыре инфекции, приведённые в табл. 1, средняя себестоимость тест-системы может быть снижена до 20 руб. за анализ, т.е. по 5 руб. за выявление спектра серологических маркеров одной инфекции. Следует отметить, что расход наиболее дорогих компонентов (антигенов и антител) при производстве иммуночипов в 50–100 раз меньше, чем при производстве тест-систем на основе ИФА. Стоимость тестирования для пациента с учётом накладных расходов учреждений здравоохранения останется в пределах 150–400 руб., но при этом будет проводиться количественный анализ наличия иммунологической реакции не к одному возбудителю, а одновременно ко всем четырем возбудителям.

Таким образом, суммарная стоимость комплексной диагностики одновременно по нескольким инфекциям будет уменьшаться пропорционально увеличению количества специфических антигенов возбудителей, фиксированных в пределах одного иммуночипа.

По данным Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в 2005 г. имело место ухудшение эпидемиологической ситуации по ряду природно-очаговых и зоонозных инфекций: возросло число заболеваний туляремией на 33,3 %, клещевым энцефалитом на 18 %, боррелиозом на 9 %, крымской геморрагической лихорадкой в 2,4 раза.

Экономический ущерб, наносимый одним случаем инфекционной болезни, составляет до 20–40 тыс. рублей при туляремии, лептоспирозе, бруцеллезе, вирусных гепатитах А, В, С (ВГА, ВГВ, ВГС) (Шаханина И. Л. и соавт., 2005 г., ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора).

За счёт быстрой комплексной диагностики инфекционных болезней с помощью иммуночипов и своевременного проведения адекватных противоэпидемических мероприятий могут быть снижены затраты на работу по профилактике заболеваний и ликвидации последствий вспышек инфекций и достигнут значительный экономический эффект.

В комплексе с другими мероприятиями Министерства здравоохранения и социального развития РФ реализация Программы может способствовать снижению уровня заболеваемости инфекционными забо-

леваниями. В случае снижения заболеваемости всего на 10 % по шести природно-очаговым инфекциям и инфекционным заболеваниям социального характера (туляремия, клещевой боррелиоз, лептоспироз, гепатиты А, В, С) предотвращённый экономический ущерб за три года более чем в 2 раза превысит финансовые затраты на выполнение всей Программы.

В связи с тяжёлой эпидемиологической ситуацией по заболеванию, вызываемому ВИЧ, ежегодно совершаются государственные закупки диагностических тест-систем на основе ИФА на ВИЧ более чем на 20 млн анализов. С учётом того, что стоимость выявления антител к ВИЧ (без учёта накладных расходов учреждений здравоохранения) составляет более 27 руб. за анализ, расход бюджетных средств на закупку ИФА тест-систем только на ВИЧ достигает 540 млн рублей в год. Снижение себестоимости проведения анализа для выявления антител к одному только ВИЧ до 10 руб. за счёт использования комплексного иммуночипа одновременно на несколько инфекций, позволит ежегодно экономить до 340 млн рублей бюджетных средств.

Разработка и применение биочипов для алергодиагностики приведёт к снижению стоимости анализа в 10–20 раз! Это сделает реальной возможность предоставления широким слоям населения Российской Федерации качественной и доступной помощи в области профилактики и лечения аллергии.

Согласно данным международной статистики, за последние два десятилетия заболеваемость аллергией возросла в 3–4 раза, причём заболевание часто протекает в тяжёлой, необычной форме. Ухудшающаяся экологическая ситуация, нерациональное питание, излишняя лекарственная терапия, бесконтрольное использование антибиотиков, стрессовые нагрузки, малоподвижный образ жизни, изменения в климате приводят к возрастанию вероятности развития аллергии. Для человека, предрасположенного к заболеванию, аллергеном может стать всё, что его окружает: бытовая пыль, пыльца, шерсть домашних животных, лекарства, продукты питания, препараты бытовой химии. При аллергии повышается утомляемость, усиливается раздражительность, снижается иммунитет. Аллергия может провоцировать различные заболевания, например, экзему, гемолитическую анемию, бронхиальную астму. В среднем каждый третий гражданин России болен тем или иным аллергическим заболеванием.

Зарегистрированные на территории РФ зарубежные тест-системы на основе иммуноферментного анализа для определения пищевой непереносимости

на 190 продуктов питания («Доктор Фуке», Германия) стоят около 9–10 тыс. рублей. Пациенту такого рода анализы обходятся в 13–15 тыс. рублей.

Разработка и применение биочипов для алергодиагностики приведёт к снижению стоимости анализа в 10–20 раз! Это сделает реальной возможность предоставления широким слоям населения Российской Федерации качественной и доступной помощи в области профилактики и лечения аллергии.

В числе мероприятий Программы предполагается оснастить 106 подведомственных учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека отечественными аппаратно-программными комплексами и диагностическими препаратами (иммуночипами). Суммарная стоимость предполагаемого к поставке оборудования и препаратов составляет 137,8 млн рублей. В случае оснащения подведомственных организаций аналогичными комплексами производства английской компании «Randox Laboratories Ltd.» суммарная стоимость оборудования составила бы 848 млн рублей. Для проведения анализов потребовались бы диагностические наборы производства исключительно той же компании по цене, превосходящей стоимость иммуноферментного анализа с помощью наборов отечественных производителей. Кроме того, в настоящее время данная компания производит тест-системы лишь для ограниченного спектра инфекционных болезней.

Нanomатериалы, такие как наноплёнки, можно было бы использовать при конструировании отдельных элементов диагностических комплексов на основе иммуночипов в качестве альтернативы уже имеющимся материалам.

Как отмечалось выше, существенный вклад в обеспечение диагностики инфекционных заболеваний вносит система государственных контрактов, заключаемых государственными заказчиками с исполнителями мероприятий Федеральных целевых программ. В частности, в рамках Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с заболеваниями социального характера» (2001—2006 гг.) по компоненту «Профилактика ВИЧ-инфекции, гепатитов В и С, выявление и лечение больных ВИЧ» осуществлялись приобретение и поставка в субъекты РФ соответствующих тест-систем на основе иммуноферментного анализа в традиционном формате и анализа на основе полимеразной цепной реакции.

К сожалению, в рамках проблематики действующих и разрабатываемых федеральных целевых программ предусматривается финансирование научно-исследовательских работ, направленных на создание и внедре-

ние современных методов диагностики лишь для социально значимых инфекционных болезней и не предусматривается разработка и организация производства универсальных комплексов для диагностики более широкого спектра инфекционных заболеваний. С другой стороны, решение проблемы создания производства биочипов отдельно для диагностики социально значимых инфекционных болезней и отдельно для другой патологии привело бы к необходимости создания дублирующих производственных мощностей и, как следствие, неизбежно к повышению стоимости научно-исследовательских работ и работ по созданию биотехнологической инфраструктуры.

Вместе с тем использование универсальных аппаратно-программных диагностических комплексов на основе иммуночипов позволило бы существенно повысить эффективность и снизить стоимость диагностики за счёт одновременного комплексного тестирования биологических препаратов на наличие маркеров не только инфекционных заболеваний социального характера, но и других групп инфекционных заболеваний, а также аллергических состояний.

Ввиду сложности и масштабности задач по созданию биочипов и универсального программно-аппаратного комплекса для диагностики инфекционных и аллергических заболеваний человека целесообразна координация научно-исследовательских работ по созданию предлагаемых диагностических тест-систем с привлечением ряда научных коллективов и специалистов.

Следует отметить также, что успеху реализации предлагаемой целевой программы ведомства может способствовать разработка и успешная реализация Федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в РФ» на 2008–2010 гг. Согласно концепции данной Федеральной целевой программы предполагается создание нового поколения наноматериалов для использования в здравоохранении и биотехнологии. Такого рода наноматериалы (например, т. н. наноплёнки) можно было бы применять при конструировании отдельных элементов диагностических комплексов на основе иммуночипов в качестве альтернативы уже имеющимся материалам.

Научные учреждения Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (в частности, Центр молекулярной диагностики на базе ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии») располагают высоким научным и кадровым потенциалом, уникальными биотехнологическими ресурсами, методическими приёмами, коллекциями штаммов микроорганизмов и образцов клинического материала, технологиями производства антигенов и специфических антител высокой степени очистки. Эти обстоятельства позволяют гарантировать поставки диагностических тест-систем на основе иммуночипов по системе государственных контрактов по ценам существенно ниже рыночных при условии про-

ведения разработок и организации производства иммуночипов для диагностики инфекционных заболеваний и аллергических состояний в рамках Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Разработка универсальных биочиповых технологий диагностики инфекционных и аллергических заболеваний требует на начальном этапе существенных финансовых затрат. Это обусловлено, главным образом, высокой стоимостью специализированного биотехнологического оборудования и расходных материалов, необходимостью использования уникальных биохимических реагентов и большого количества хорошо охарактеризованного (с помощью современных лабораторных методов) клинического материала. При работе с патогенными микроорганизмами и клиническим материалом необходимы соблюдение специальных мер предосторожности и организация лабораторий для работы с опасными инфекциями, что возможно лишь в рамках специализированных государственных учреждений здравоохранения.

При сложившемся рынке диагностических услуг на основе традиционного иммуноферментного анализа и в условиях отсутствия развитой конкурентной среды не приходится ожидать значительных финансовых инвестиций российских частных компаний

При сложившемся рынке диагностических услуг на основе традиционного иммуноферментного анализа и в условиях отсутствия развитой конкурентной среды не приходится ожидать значительных финансовых инвестиций российских частных компаний в разработку биочиповых технологий.

в разработку биочиповых технологий. Другим фактором, удерживающим российские коммерческие структуры от инвестиций в разработку биочипов, является низкая скорость оборота средств, вкладываемых в биотехнологию.

При условии финансовой поддержки со стороны федерального бюджета совместное участие научных учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в предлагаемой к рассмотрению целевой программе ведомства позволит в кратчайшие сроки решить поставленные задачи, направленные на создание отечественных средств нового поколения для высокоэффективной диагностики инфекционных и аллергических заболеваний человека.

СЛОВАРЬ НАНОТЕРМИНОВ

Нановолокно — волокно, имеющее диаметр менее 100 нм. Обычно такие волокна получают методом интерфейсной полимеризации.

Наноиндустрия — интегрированный комплекс производственных, научных, образовательных и финансовых организаций различных форм собственности, осуществляющих целенаправленную деятельность по созданию интеллектуальной и промышленной конкурентоспособной продукции, относящейся к сфере нанотехнологий.

Нанокластер — разновидность наночастиц, представляющая собой аморфную или поликристаллическую наноструктуру, хотя бы один характерный размер которой находится в пределах 1–10 нм.

Нанокomпьютер — квантовый и механический компьютер нанометрических размеров с высокой производительностью.

Нанолитография — процесс производства интегральных микросхем, размер отдельных элементов которых составляет менее 100 нм.

Наноматериалы — разновидность продукции наноиндустрии в виде материалов, содержащих структурные элементы с нанометровыми размерами, наличие которых обеспечивает существенное улучшение или появление качественно новых механических, физических, химических, биологических и других свойств, определяемых проявлением наномасштабных факторов.

Наномедицина — комплекс подходов, обеспечивающий применение нанотехнологических разработок для нужд практической медицины и здравоохранения.

Нанометр — одна миллионная доля миллиметра.

Нанопорошок — агломерат некристаллических наноструктурных единиц, хотя бы один характерный размер которых менее 100 нм.

Нанопроволока — наноструктура, в которой два характерных размера находятся в диапазоне 1–100 нм, в то время как один (линейный) размер может быть неограничен.