

INCREASING THE RAPIDITY OF DIAGNOSTICS OF CERTAIN SEXUALLY TRANSMITTED INFECTIONS WITH APPLICATION OF THE «ELECTRONIC NOSE» ON THE PIEZO SCALER

A. Shuba¹, assistant lecturer
 T. Kuchmenko², head of a chair, doctor of chemistry, full professor
 I. Tyurkin³, applicant
 V. Bituyukova⁴, professor, doctor of medical sciences, full professor
 Voronezh State Technological Academy, Russia¹
 Voronezh State University of Engineering Technology, Russia²
 Voronezh State Medical Academy named after N.N. Burdenko, Russia^{3,4}

Authors discuss the possibility of increasing the rapidity and reliability of the sexually transmitted infections diagnosis by using an array of piezo-sensors for detection of gases-markers in the equilibrium gas phase above biomaterial and differentiation of pathogens.

Keywords: sexually transmitted infections, pathogens, gases-markers, identification, sensors, regression on principal components.

Conference participants

Проблема высокой заболеваемости инфекциями, передаваемыми половым путем (ИППП), остается актуальной во всем мире, несмотря на то, что за последние 5–7 лет в США, Западной Европе и России отмечается стойкая тенденция к снижению частоты их встречаемости в целом [1]. Сложность клинико-лабораторной диагностики бактериальных инфекций заключается в наличии одновременно 2–3 патогенных возбудителей и более, отсутствии, как правило, патогномных симптомов заболеваний, хотя в настоящее время созданы высокоэффективные тест-системы (ПЦР, ИФА). Однако, некоторые методы длительны (от 2 часов до 7–8 дней) и дороги из-за необходимости контроля оборудо-

вания, ингредиентов и привлечения квалифицированного персонала, постоянно обучающегося современным методикам диагностики [2]. Поэтому продолжается поиск новых методических подходов прямой и косвенной детекции возбудителей, в том числе разработка скрининг методов, позволяющих сократить временные и материальные затраты на диагностику.

Определенный род возбудителя выделяет в процессе жизнедеятельности различные классы органических соединений, в том числе легколетучих (газы-маркеры) (табл. 1), т.е. состав равновесной газовой фазы (РГФ) над образцом биоматериала (биопробой) может являться косвенным диагностическим признаком наличия

ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССНОСТИ ДИАГНОСТИКИ НЕКОТОРЫХ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАВАЕМЫХ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ, С ПРИМЕНЕНИЕМ «ЭЛЕКТРОННОГО НОСА» НА ПЬЕЗОВЕСАХ

Шуба А.А.¹, ассистент
 Кучменко Т.А.², д-р хим. наук, проф., зав. кафедрой
 Тюркин И.³, соискатель
 Битуюкова В.⁴, д-р мед. наук, проф.
 Воронежская государственная технологическая академия, Россия¹
 Воронежский государственный университет инженерных технологий, Россия²
 Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко, Россия^{3,4}

В работе обсуждается возможность повышения экспрессности и надежности диагностики инфекций, передаваемых половым путем, за счет применения массива пьезосорбционных сенсоров для детектирования газов-маркеров в равновесной газовой фазе над биопробами и дифференциации возбудителей.

Ключевые слова: инфекции, передаваемые половым путем, возбудители, газы-маркеры, идентификация, сенсоры, регрессия на главные компоненты.

Участники конференции

возбудителя, что можно использовать для разработки скрининг метода по составу газов.

Наиболее распространенным подходом для анализа газовой фазы сложного многокомпонентного состава с возможностью классификации и детерминации образцов является использование мультисенсорных приборов, в том числе на основе пьезокварцевых резонаторов, с искусственным интеллектом типа «электронный нос» [5]. Цель исследования – разработка экспрессного способа диагностики наиболее распространенных инфекций, передаваемых половым путем, с применением мультисенсорной системы на основе 8 микрогравиметрических сенсоров (пьезовесов).

Таблица 1.

Газы-маркеры некоторых возбудителей ИППП [1–4]

Диагностическая оценка	Характеристика запаха	Газы-маркеры в РГФ
Норма	Нет	Оксикислоты
Кандидоз	Дрожжевой	Одноатомные спирты, карбоновые кислоты
Гарднереллез	Рыбный	Алифатические амины, изонитрилы
Хламидиоз	Нет	Одноатомные спирты, аммиак
Трихомоноз	Неприятный	Алифатические и ароматические амины
Микроплазмоз	Нет	Не установлены
Уреаплазмоз	Нет	Не установлены

Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования выбраны пробы цервикальной слизи здоровых пациенток и с различными моноинфекциями (кандидоз, хламидиоз, гарднереллез, уреаплазмоз, вирус папилломы человека) или их сочетаниями – микст-инфекцией; кроме этого для обучения сенсорной системы выбраны индивидуальные тест-вещества, которые по литературным данным могут служить газамаркерами инфекций – первичные, вторичные и третичные амины с алкильными и арильными радикалами, уксусная и масляная кислоты марки «ч.д.а». Предварительная классификация 83 биопроб на 2 группы «больные» (38 проб), «условно здоровые» (45 проб) проводилась по результатам стандартных методов диагностики (ПЦР, микроскопия мазка, ИФА) (биоматериал и результаты лабораторных клинических анализов предоставлены сетью клиник «Медлайн», Воронеж). Отбор проб осуществляли специалисты клиник, помещали в стерильные пробирки с притертыми полистирольными крышками. Пробирки выдерживали при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 15–30 мин (время выдержки проб t, с).

Исследовали состав равновесной газовой фазы над биопробами и индивидуальными тест-веществами объемом 1 cm^3 при $20 \pm 2^\circ\text{C}$ в статическом режиме на анализаторе газов «MAG-8» (ООО «СенТех», Воронеж) со специальным программным обеспечением «MAG-Soft». Во время измерения в программе фиксировали выходные сигналы восьми сенсоров, относительные изменения частотных харак-

теристик каждого сенсора с шагом в 1 с в виде хроночастотограмм, аналитические сигналы ($\Delta F_{\text{max},i}$, Гц), площадь ($S_{\text{в.о.}}$, Гц·с) и степень идентичности «визуальных отпечатков» [6].

Сенсоры для анализа индивидуальных тест-веществ и РФГ над цервикальной слизью изготавливали на основе пьезоэлектрических кварцевых резонаторов ОАВ-типа (пьезовесы) путем нанесения на их электроды пленок различных по свойствам сорбентов. Подготовку сенсоров осуществляли по описанной ранее методике [7]. В качестве оптимальных выбраны пленки, проявляющие селективность к выбранным газамаркерам, стабильные, с низким уровнем шумов [8]: полиэтиленгликоль 2000 (ПЭГ-2000 – сенсор 1), углеродные нанотрубки (УНТ – сенсор 2), дициклогексан-18-краун-6 (ДЦГ-18-К-6 – сенсор 3), тритон X-100 (ТХ-100 – сенсор 4), бромкрезоловый синий (БКС – сенсор 5), метиловый красный (МК – сенсор 6), пчелиный воск (ПчВ – сенсор 7), полиэтиленгликоль адипинат (ПЭГА – сенсор 8). Для оценки эффективности сорбции паров тест-веществ на пленках сорбентов и идентификации отдельных веществ в смеси выбраны массовая чувствительность S_m (Гц·м³/г) и параметр эффективности сорбции A_{ij}^{max} , рассчитываемые по формулам:

$$S_m = \Delta F_{\text{max},i} / c;$$

$$A_{ij}^{\text{max}} = \Delta F_{\text{max},i} / \Delta F_{\text{max},j},$$

где $\Delta F_{\text{max},i(j)}$ – аналитический сигнал i-того (j-того) сенсора в массиве, Гц, c – концентрация тест-вещества в ячейке детектирования, г/м³.

Обработка данных по методу регрессии на главные компоненты выполнена в программе The Unscrambler X (v.10.0.0, CAMO Software). В качестве алгоритма проверки калибровки выбран метод тестового набора.

Результаты и их обсуждение

Для обеспечения достоверности диагностических мероприятий необходимо решить две принципиальные задачи. Первое, доказать специфичность детектирования возбудителей моноинфекций по их газамаркерам, что тесно связано со второй задачей – правильным подбором покрытий сенсоров, обеспечивающих селективность и чувствительность микровзвешивания классов соединений или конкретных веществ в РФГ над биопробой. Поэтому для детектирования газов-маркеров выбраны пленки разных по свойствам сорбентов, но с заметным сродством к определяемым группам соединений (табл. 2).

Установлены максимальные значения массовой чувствительности для каждого тест-вещества, на основании которых выбраны оптимальные пленки модификаторов электродов пьезокварцевых резонаторов для детектирования газов-маркеров в РФГ над биопробами. Так, например, для определения легколетучих органических кислот рекомендуется использовать пленки ДЦГ-18-К-6 и ПЭГ-2000, для определения алифатических аминов – БКС, МК и ПЭГА. Для пленок УНТ, ПчВ и ТХ-100 характерна высокая чувствительность к выбранным веществам, и они необходимы для дифференциации состава смесей.

Таблица 2.

Массовая чувствительность (S_m , Гц·м³/г) сенсоров с пленками различных сорбентов к парам тест-веществ

Сорбаты Сорбенты	ПЭГ-2000	УНТ	ДЦГ-18-К-6	ТХ-100	БКС	МК	ПчВ	ПЭГА
Триэтиламин	$1.6 \cdot 10^{-1}$	$5.2 \cdot 10^{-1}$	$4.7 \cdot 10^{-1}$	1.50	20.0	2.90	$1.6 \cdot 10^{-1}$	1.90
2,4-Диметиланилин	27.0	20.0	87.0	52.0	17.0	20.0	10.0	87.0
Бензиламин	17.0	63.0	$1.60 \cdot 10^2$	$1.40 \cdot 10^2$	57.0	34.0	48.0	$2.70 \cdot 10^2$
Пиперидин	3.00	6.70	28.0	30.0	43.0	$1.70 \cdot 10^2$	5.50	40.0
Циклогексиламин	4.40	14.0	23.0	34.0	44.0	22.0	5.00	65.0
Аммиак	$4.4 \cdot 10^{-1}$	$8.8 \cdot 10^{-1}$	1.80	1.20	2.20	$4.7 \cdot 10^{-1}$	$4.4 \cdot 10^{-1}$	3.50
Уксусная кислота	68.0	21.0	$1.70 \cdot 10^2$	68.0	97.0	55.0	10.0	94.0
Масляная кислота	28.0	17.0	78.0	28.0	37.0	17.0	11.0	41.0
Вода	6.40	2.50	12.0	9.40	3.00	2.50	0.99	7.90

В качестве информативных данных мультисенсорной системы в программном обеспечении «MAG-Soft» при анализе состава равновесной газовой фазы над объектом применяются «визуальные отпечатки» в двух вариантах: по максимальным сигналам всех сенсоров в матрице («визуальные отпечатки» максимумов) и по сигналам сенсоров, регистрируемых в определенные моменты измерения (кинетические «визуальные отпечатки») (рис. 1). Геометрические особенности «визуальных отпечатков» (форма, площадь фигуры) определяются качественным и количественным (соотношение содержаний и концентрация отдельных соединений) составом РГФ над анализируемыми пробами. При анализе биопроб в РГФ находятся микроколичества газов-маркеров, особенности взаимодействия которых с пленками сорбентов в большей степени проявляются во временном развитии процесса и, как следствие, на кинетических «визуальных отпечатках».

Установлено, что по форме кинетических «визуальных отпечатков» для всех проб можно выделить несколько групп (рис. 1). Степень идентичности «визуальных отпечатков», рассчитанная в программе «MAG-Soft», между группами составляет 38 – 72%, внутри групп – от

73 до 89%. Выделение образцов в группы хорошо коррелирует с классификацией проб по результатам традиционных методов анализа и природой инфекции, возбудителя.

Присутствие возбудителей инфекций или кокковых грибов может вызывать сходные нарушения в микрофлоре цервикального канала, вследствие чего «визуальные отпечатки» над биопробами становятся похожими. Поэтому степень идентичности кинетических «визуальных отпечатков» для групп с различными заболеваниями в некоторых случаях достигает 85%. По значению площади «визуального отпечатка» надежно можно выделить только пробы из группы «пролеченные».

Таким образом, по геометрии и площади кинетических «визуальных отпечатков» невозможно надежно идентифицировать моноинфекции. Для получения экспрессной диагностической информации о наличии в пробе возбудителей инфекций использованы параметры для идентификации в РГФ отдельных газов-маркеров заболеваний.

Установлено, что в РГФ над биопробами, отнесенными к группам «гарднереллез», «кандидоз», «хламидиоз» по результатам анализа стандартными методами, по параметрам, идентифицированы триэтиламин, уксус-

ная кислота, аммиак соответственно (табл. 3), что согласуется с литературными данными [1-4]. Для возбудителей уреаплазмоза, микоплазмоза, вируса папилломы человека не установлены газы-маркеры, поэтому с помощью параметров невозможно диагностировать эти заболевания.

Для получения большей информации о наличии возбудителей ИППП использовали метод регрессии на главные компоненты, который относится к методам многомерной калибровки и используется для классификации образцов по предварительно построенной в процессе обучения модели [9].

Для экспресс-оценки наличия возбудителя в цервикальной слизи выбран фактор с маркером «здоровые», который кодировали значениями «+1» в присутствии и «-1» без диагностируемых инфекций по результатам стандартных методов анализа проб (референтные значения).

Для обучения были взяты результаты анализа (идентификационные параметры, $\Delta F_{\max, i}, S_{B.o.}, t$) для представительного набора из 19 биопроб, с алгоритмом проверки правильности методом тестового набора. С помощью полученной модели можно выделить группы «здоровые» и «больные» с погрешностью не более 10% (выделены областями, рис. 2).

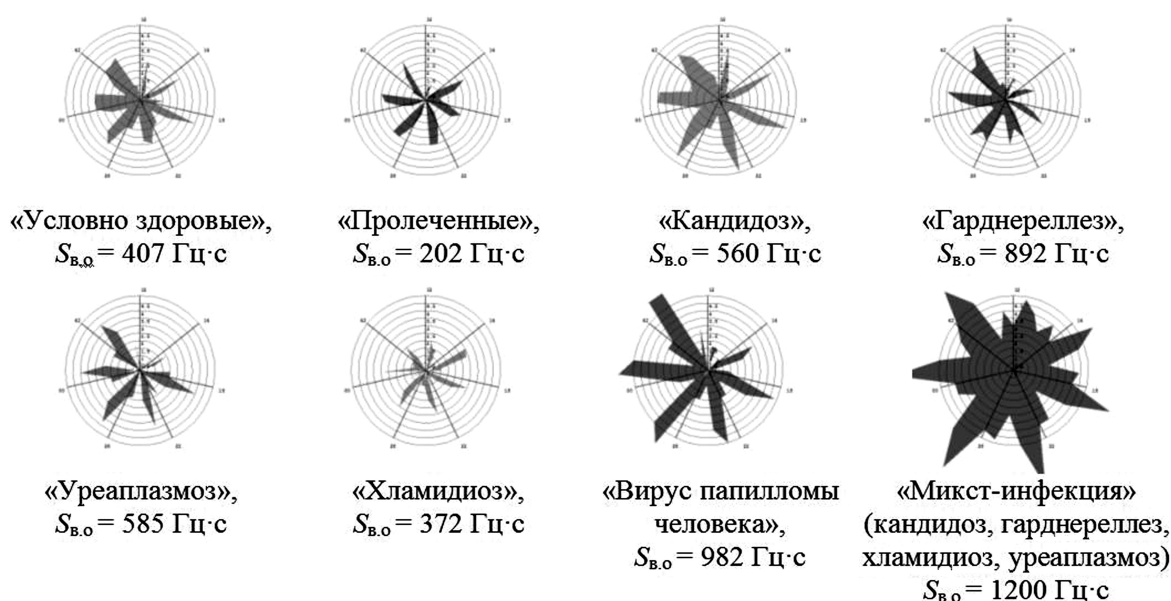


Рис. 1. Кинетические «визуальные отпечатки» откликов массива сенсоров в РГФ над биопробами. По вертикальной оси отложены отклики сенсоров (ΔF , Гц) в определенный момент времени, по круговой оси – время фиксирования сигналов (t , с).

Таблица 3.

Результаты определения наличия возбудителя в биопробах по идентификационным параметрам A_{ij}^{max}

Номера проб	Идентификационные параметры	Идентифицируемое соединение	Результаты идентификации	Предполагаемая инфекция	Совпадение с традиционными методами
8, 22, 28, 34, 35, 46		Триэтиламин	Присутствует	Гарднереллез	Совпадает
		Уксусная кислота	Не присутствует		
		Аммиак	Не присутствует		
1-3, 10, 24, 25, 41, 51, 60, 62, 63, 70, 72, 78, 80		Триэтиламин	Не присутствует	Кандидоз	Совпадает
		Уксусная кислота	Присутствует		
		Аммиак	Не присутствует		
15, 17, 21, 23, 73, 74, 83		Триэтиламин	Не присутствует	Кандидоз	Не совпадает
		Уксусная кислота	Присутствует		
		Аммиак	Не присутствует		
20, 47, 56, 75, 81		Триэтиламин	Не присутствует	Хламидиоз	Совпадает
		Уксусная кислота	Не присутствует		
		Аммиак	Присутствует		
4, 14, 16, 18, 36, 37, 43, 52, 53, 59, 69, 82		Триэтиламин	Не присутствует	Отсутствует	Не совпадает
		Уксусная кислота	Не присутствует		
		Аммиак	Не присутствует		
5, 7, 9, 11-13, 26, 27, 29-33, 38-40, 44, 45, 48, 49, 50, 54, 55, 57, 58, 64-68, 76, 77, 79		Триэтиламин	Не присутствует	Отсутствует	Совпадает
		Уксусная кислота	Не присутствует		
		Аммиак	Не присутствует		

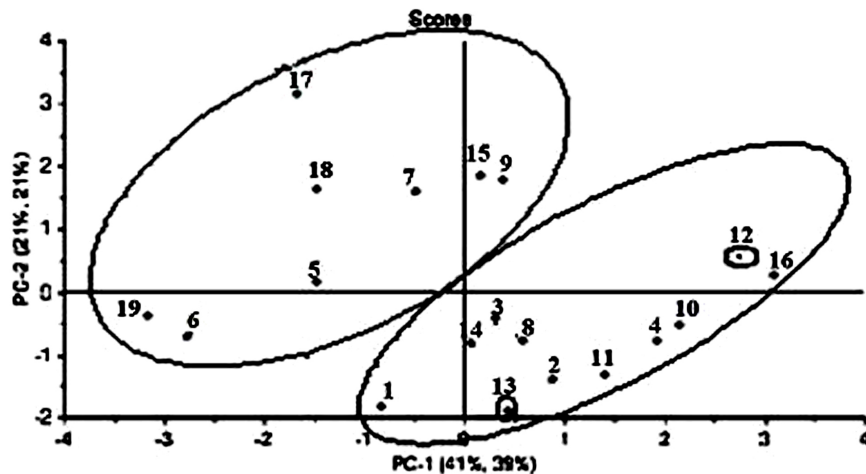


Рис. 2. Графики счетов, полученных методом регрессии на главные компоненты, для биопроб с использованием оптимального числа переменных.

Для оценки адекватности и возможности использования оптимизированной регрессионной модели в медицинских лабораториях ее применили для обработки массива данных для 64 биопроб (№ 20 – 83 в табл. 3). Прогнозируемые значения фактора «здоровые» для этих проб по модели являются значимыми и хорошо согласуются с референтными. Процент совпадения результатов, полученных по модели, с результатами микроскопии мазка составляет 97%, ИФА, ПЦР-анализа – 93%. Таким образом, полученная регрессионная модель является адекватной для скрининга и ее возможно использовать для ранжирования проб на группы «здоровые» и «больные». Использование регрессионной модели для обработки результатов анализа РГФ над цервикальной слизью массивом из 8 микрогравиметрических сенсоров позволяет высокоспецифично получить экспрессную (не более 30 мин) диагностическую информацию о наличии возбудителя ИППП.

References:

1. Haldin A.A., Infekcii i antimikrobnaja terapija [Infections and Antimicrobial Therapy]. - 2004., Vol. 6., No 3.
2. Dmitriev G.A., Infekcii i antimikrobnaja terapija [Infections and Antimicrobial Therapy]. - 2003., Vol. 05., No 1.
3. Morgan, S.L., Fox A., Gilbert J., J. Microbiol. Methods. - 1989., V. 9. - 57 P.
4. Chen K.C.S., Forsyth P.S., Buchanan T.M., et al., J Clin Invest. - 1979., V. 63. - 828 P.
5. Problemy analiticheskoj himii [Problems of Analytical Chemistry],

Vol. 14: Himicheskie sensory [Chemical sensors], Pod redakciej Ju.G. Vlasova. – Moskva., Nauka, 2011. - 399 P.

6. Kuchmenko T.A. Innovacionnye reshenija v analiticheskom kontrole [Innovative solutions in the analytical control], training manual. – Voronezh., Voronezhskaya gosudarstvennaya tehnologicheskaya akademiya [Voronezh State University of Engineering Technologies], ООО SenTeh, 2009. 252 P.

7. Kuchmenko T.A., Mishina A.A., Zhurnal analit. Himii [Analytical chemistry journal]. - 2011., Vol. 66., No 8., pp. 816.

8. Kuchmenko T.A., Shuba A.A., Bel'skih N.V., Analitika i kontrol' [Analysis and control]. - 2012., Vol. 16., No 2., pp. 151.

9. Jesbensen K. Analiz mnogomernyh dannyh. Izbrannye glavy [Analysis of multidimensional data. Selected chapters], Translated from English S.V. Kucherjavskogo; Ed. by O.E. Rodionovoj. - Chernogolovka., Publisher IPHF RAN, 2005. - 160 P.

Литература:

1. Халдин А.А. // Инфекции и антимикробная терапия. 2004. Т. 6. № 3.
2. Дмитриев Г.А. // Инфекции и антимикробная терапия. 2003. Т. 05. № 1.
3. Morgan, S.L., Fox A., Gilbert J. // J. Microbiol. Methods. 1989. V. 9. P. 57.
4. Chen K.C.S., Forsyth P.S., Buchanan T.M., et al. // J Clin Invest. 1979. V. 63. P. 828.
5. Проблемы аналитической химии Т. 14: Химические сенсоры / Под ред. Ю.Г. Власова. М.: Наука, 2011. 399 с.
6. Кучменко Т.А. Инновационные решения в аналитическом контроле: учеб пособие. Воронеж: Воронеж.

гос. технол. акад., ООО «СенТех», 2009. 252 с.

7. Кучменко Т.А., Мишина А.А. // Журнал аналит. химии. 2011. Т. 66. № 8. С. 816.

8. Кучменко Т.А., Шуба А.А., Бельских Н.В. // Аналитика и контроль. 2012. Т. 16. № 2. С. 151.

9. Эсбенсен К. Анализ многомерных данных. Избранные главы / Пер. с англ. С.В. Кучерявского; Под ред. О.Е. Родионовой. Черногородка: Изд-во ИПХФ РАН, 2005. 160 с.

Information about authors:

1. Anastasiia Shuba - Assistant Lecturer, Voronezh State Technological Academy; address: Russia, Voronezh city; e-mail: an-mishina@yandex.ru

2. Tatiana Kuchmenko - Doctor of Chemistry, Full Professor, Head of a Chair, Voronezh State University of Engineering Technologies; address: Russia, Voronezh city; e-mail: tak1907@mail.ru

3. Igor Tyurkin - Applicant Voronezh State Medical Academy named after N.N. Burdenko; address: Russia, Voronezh city; e-mail: nmtmed@yandex.ru

4. Valeriia Bitjukova - Doctor of Medicalsciences, Full Professor, Voronezh State Medical Academy named after N.N. Burdenko; address: Russia, Voronezh city; e-mail: bitjukovavv@yandex.ru

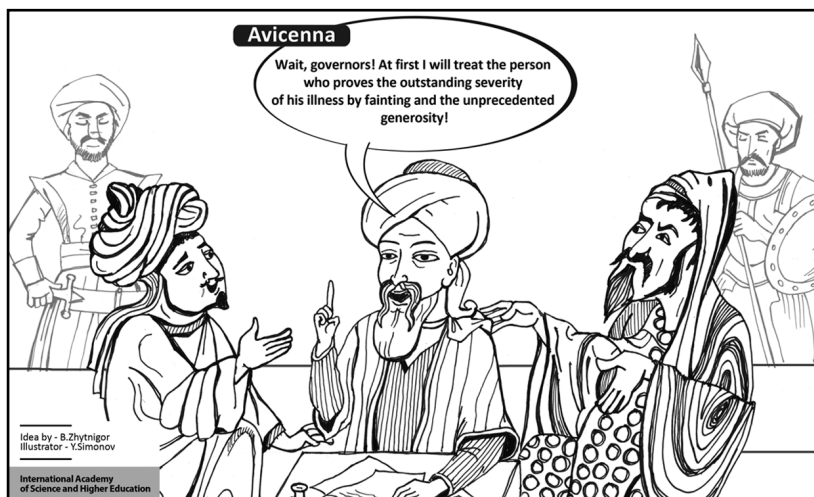
Сведения об авторах:

1. Шуба Анастасия - ассистент Воронежская государственная технологическая академия; адрес: Россия, Воронеж; электронный адрес: an-mishina@yandex.ru

2. Кучменко Татьяна - доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой, Воронежский государственный университет инженерных технологий; адрес: Россия, Воронеж; электронный адрес: tak1907@mail.ru

3. Тюркин Игорь – соискатель, Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко; адрес: Россия, Воронеж; электронный адрес: nmtmed@yandex.ru

4. Битюкова Валерия - доктор медицинских наук, профессор, Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко; адрес: Россия, Воронеж; электронный адрес: bitjukovavv@yandex.ru



Idea by - B.Zhytnigor
Illustrator - V.Simonov

International Academy
of Science and Higher Education