

*Michał Bartoszcze*

## METODY WYKRYWANIA ZAGROŻEŃ BRONIĄ BIOLOGICZNĄ

Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych  
Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii  
Dyrektor Instytutu: Marek Janiak

*Omówiono współczesne metody detekcji i identyfikacji czynników biologicznych ze szczególnym uwzględnieniem ich zastosowania w warunkach polowych. Przedstawiono najnowsze technologie, które w najbliższym czasie będą wprowadzane do praktyki mikrobiologicznej w celu szybkiego wykrywania zagrożeń bronią biologiczną.*

*Słowa kluczowe: wykrywanie, identyfikacja, broń biologiczna*

*Key words: detection, identification, biological weapon*

### WSTĘP

Atak drogą aerozolową nie jest możliwy do wykrycia w naturalny sposób tj. zmysłami człowieka. Aeroszol jest niewidoczny, bez zapachu, trudny do odróżnienia od otaczającego tła atmosferycznego. Skutki ataku biologicznego, w przeciwieństwie do ataku bronią chemiczną, będą ujawniać się dopiero po pewnym czasie w postaci zachorowań ludzi i zwierząt. Nie wykryty w porę atak niweluje szanse skutecznej obrony i zwiększa możliwości powstania masowych strat. Dostrzegając wagę tych problemów, już od dawna rozwijano techniki detekcyjne pozwalające wykryć obecność czynników biologicznych w powietrzu, co stwarzałyby szansę zastosowania w porę środków ochronnych.

### METODY DETEKЦИИ

Istnieją technologie (1), które przeznaczone są do wykrywania aerozolu nadchodzącego z dalekiej odległości. Przykładem jest system LRBSDS (*Long Range Biological Standoff Detection System*), przeznaczony do wykrywania chmury aerozolowej w promieniu 30 km. Wyposażony jest w transmiter laserowy na podczerwień, teleskop odbiorczy i detektor. System ten nie jest jednak w pełni automatyczny. Napotymano na problemy z odbieraniem sygnałów, które były często zakłócane, co było znaczną niedogodnością detekcyjną. System ten udoskonalono, tworząc JBSDS (*The Joint Biological Standoff Detection System*) - w pełni zautomatyzowany system mogący monitorować ruch chmury aerozolowej. Posiada on zdolność rozróżniania obłoków biologicznych od niebiologicznych, stwarza możliwość wczesnego ostrzeżenia i raportowania.

W kolejnych projektach uwzględniano nie tylko elementy detekcji, ale także identyfikacji czynników biologicznych. Takim projektem jest IBADS (*The Interim Biological Agent Detection System*). Jest to system półautomatyczny, który posiada koncentrator aerozolu oraz aerodynamiczny miernik cząstek. Do identyfikacji mikroorganizmów wykorzystano testy immunochromatograficzne. Technologia tego systemu jest tania i pozwala na wykonanie wstępnej identyfikacji zarazków.

JPS (*The Joint Portal Shields*) jest pierwszym wysoce zautomatyzowanym systemem udoskonalonym dzięki sieci sensorów zwiększających czułość wykrywania. Wszystkie operacje tego systemu kontrolowane są przez centralny komputer. Aeroszol po koncentracji i charakterystyce fizycznej jest następnie poddawany automatycznej analizie metodami immunochromatograficznymi, przy zdolności identyfikacji 8 czynników biologicznych w ciągu 25 minut.

Kolejnym systemem detekcyjnym i identyfikacyjnym jest system JBPDS (*The Joint Biological Point Detection System*) zbudowany z dwu modułów. W porównaniu do poprzedniego, charakteryzuje się znacznie wyższą czułością i swoistością. Stwarza możliwość wykrywania obecności biocząstek w ciągu 60 sekund, posiadając zdolność identyfikacji 10 organizmów w ciągu 20 minut.

JBAIDS (*The Joint Biological Agent Identification and Diagnostic System*) - jest to urządzenie przenośne, przygotowane do jednoczesnej identyfikacji patogenów, zarówno w próbkach środowiskowych jak i klinicznych.

Do wykrywania czynników biologicznych wykorzystano m.in. zdolność wzbudzenia fluorescencji wiązkami światła laserowego, analizowanej dzięki czułym fotodetektorom. Metodą tą odróżnić można czynniki biologiczne żywe od martwych, a także określić wielkość i kształt cząstek.

Zaawansowane technologicznie systemy zdolne są do szybkiego analizowania danych - łącznie z generowaniem sygnału alarmowego po przekroczeniu poziomów krytycznych - i przekazywania uzyskanych danych do centrów dowódczych.

Przykładem tego typu technologii jest nowoczesny system FLAPS (*Fluorescence Aerodynamic Particle Sizer*), dokonujący szybkiej analizy rodzaju aerozolu, kształtu i koncentracji. Urządzenia tego typu zastosowano w badaniach przesyłek podejrzanych o obecność zarodników *B. anthracis* w niektórych urzędach pocztowych USA (2). Cechą wspólną omawianych systemów jest to, że przeznaczone są one głównie do wykrywania aerozoli biologicznych. Atak bioterrorystyczny może być jednak przeprowadzony nie tylko drogą aerolową, ale także za pośrednictwem żywności i wody oraz metodami niekonwencjonalnymi (3, 4). W związku z powyższym omówione systemy zabezpieczają jedynie część potrzeb obronnych przed atakiem bioterrorystycznym. Poniżej zostanie omówiona technologia pozwalająca na detekcję czynników biologicznych w różnych środowiskach.

## LUMINOMETRIA

Jest to metoda pozwalająca na wykrycie zawartości ATP (adenozyno-trójfosforan) w żywych komórkach. Metoda oparta jest na zasadzie wykrywania emitowanego światła powstającego przy enzymatycznym rozkładzie ATP. Wyemitowana energia jest proporcjonalna do zawartości ATP w danej próbce i daje się oznaczać za pomocą czułego fotodetektora - luminometru (5). Technika luminometryczna jest przydatna m.in. do

szybkiego wykrywania obecności bakterii w płynach, proszkach, liofilizatach. Jedną z niewielu technologii przeznaczonych do pomiaru ATP jest system PROFILE, który pozwala na odróżnienie komórek eukariotycznych od prokariotycznych. Dzięki odpowiednim urządzeniom dodatkowym pozwala on na badanie zanieczyszczonych powierzchni, żywności, wody, powietrza itp. Umożliwia również szybkie wykrycie obecności w badanych próbkach przetrwalników bakteryjnych, co można wykorzystać przy badaniach przesiewowych próbek podejrzanych o obecność spor *B. anthracis* (6). Metodą luminometryczną, jak wskazują najnowsze badania, można także identyfikować *B. anthracis*, dzięki użyciu gamma-lizyny (7). W badaniach własnych wykazano także możliwość identyfikacji metodą luminometryczną pałeczek *Salmonella spp.* (8). Kierując się uniwersalnością zastosowań bioluminometrii w aspekcie zagrożeń bioterrorystycznych w WIHiE opracowano i wdrożono do stosowania Polowy System Wykrywania Zanieczyszczeń Bakteryjnych (PSWZB).

## METODY IDENTYFIKACJI CZYNNIKÓW BIOLOGICZNYCH

Konwencjonalne, klasyczne metody mikrobiologiczne, jakkolwiek pozwalają na wykrycie i identyfikację czynników biologicznych, to jednak z militarne punktu widzenia wykazują szereg wad. Należą do nich m.in.: długi czas niezbędny do uzyskania wyników, konieczność dysponowania zapleczem laboratoryjnym, wyszkolonym personelem i materiałochłonność.

## TECHNOLOGIE BIOSENSOROWE

W technikach biosensorowych przy poszukiwaniu, np. antygenów stosuje się często sensory światłowodowe opłaszczone przeciwciałem. Kompleks powstały po związaniu się przeciwciała z poszukiwanym antygenem wykrywany jest przeciwciałem znakowanym barwnikiem fluorescencyjnym. Dzięki wiązce światła laserowego następuje silne wzbudzenie znacznika w miejscu reakcyjnym, dając sygnał rejestrowany przez detektor. Dzięki temu oznaczenia można prowadzić w próbkach „brudnych”.

Oparty na tej koncepcji system Analyte 2000 może identyfikować za pomocą czterech sond, 4 próbki jednocześnie. Czułość testu wynosi od 3 do 30 bakterii/ml, a czas wykonania analizy 20 minut (9).

Rozwinięciem powyższej koncepcji jest RAPTOR (10), w pełni zautomatyzowany, przenośny system, w którym podwyższono czułość oznaczeń i skrócono czas identyfikacji. Zastosowano w nim wymienne bloczki wielokrotnego użycia, którymi przepływa materiał badany. System ten pozwala na wykrywanie zarówno bakterii i ich toksyn, jak i wirusów, co jest jego dużą zaletą. Urządzenie może pracować w systemie ciągłym w połączeniu z kolektorem próbek powietrza.

Omówione powyżej metody nie pozwalały na ogół na przeprowadzenie badań genetycznych. Przełomem w tej dziedzinie stał się m.in. RAPID - polowy zautomatyzowany system, który pozwala na identyfikację patogenów metodą „Real time” PCR (11). Dzięki odpowiednim barwnikom fluorescencyjnym i znakowanym sondom oraz wykorzystaniu zjawiska FRET (*Fluorescence Resonans Energy Transfer*), proces amplifikacji jest obserwowany na bieżąco na ekranie monitora. Aparat jest prosty w obsłudze, wymaga jedynie dokładności w przygotowaniu próbek do badań. Na uwagę zasługuje jego połączenie z systemem wczesnego ostrzegania „Leaders” (*Lightweight Epidemio-*

logy *Advanced Detection and Emergency Response*). Dużym osiągnięciem było zastosowanie systemu RAPID do identyfikacji wirusa pryszczycy bezpośrednio na farmie ze zwierzętami.

### POLOWE TESTY DIAGNOSTYCZNE

W przeciwieństwie do omówionych wcześniej mniej lub bardziej skomplikowanych i zazwyczaj drogich technologii, stosowane są także w praktyce proste testy immunochromatograficzne, pozwalające na uzyskanie wyniku w ciągu 10-15 minut (3). W technice tej stosowane są przeciwciała mono- lub poliklonalne znakowane koloidalnym złotem. Reakcja dodatnia obserwowana jest optycznie w postaci kolorowej, wąskiej linii. Czułość testów jest dosyć wysoka i wynosi od  $10^3$  do  $10^4$  CFU/ml. W przypadku ataku bioterrorystycznego koncentracja użytego środka może być wysoka (od  $10^8$  do  $10^{10}$ ). Aby podnieść czułość odczytu stosuje się dodatkowo czytniki pasków, co eliminuje subiektywność odczytu. Przykładem takiego rozwiązania jest czytnik Guardian. Czułość metod immunochromatograficznych można podwyższyć, stosując zamiast koloidalnego złota cząsteczki UCP (*Upconverting Phosphor*). Dzięki wzbudzeniu tych cząstek światłem zbliżonym do podczerwieni, dochodzi do emisji światła widzialnego, rejestrowanego przez detektor (UCPRS - *Upconverting Phosphor Reporting System*). W porównaniu do techniki z użyciem koloidalnego złota, metoda UCPRS jest 10-krotnie czulsza, przy skutecznej eliminacji „świecenia” tła. Dzięki zastosowaniu różnych substratów możliwe jest wykrycie tą metodą kilku czynników biologicznych jednocześnie (12).

Należy podkreślić, że wszystkie omówione technologie pozwalają na wykonanie mniej lub bardziej dokładnej, ale wstępnej diagnostyki. Potwierdzeniem wstępnej identyfikacji zajmują się laboratoria referencyjne o odpowiednim poziomie bezpieczeństwa biologicznego, wyposażone w unikalną aparaturę i zatrudniające wysokiej klasy specjalistów.

### METODY BIOLOGII MOLEKULARNEJ W IDENTYFIKACJI CZYNNIKÓW BIOLOGICZNYCH

Podstawową metodą stosowaną w diagnostyce genetycznej jest PCR - *polimerase chain reaction* - polimerazowa reakcja łańcuchowa, pozwalająca na selektywną amplifikację wybranych fragmentów DNA. Dzięki swoistym starterom (primerom) możliwe jest wykrycie genów bakteryjnych zlokalizowanych na plazmidach lub chromosomie (13). W przypadku wykrywania czynników zawierających RNA stosuje się metodę RT-PCR. Klasyczna metoda PCR pozwala na uzyskanie dobrych wyników, zwłaszcza przy badaniu czystych kolonii oraz materiału klinicznego. Przy badaniu próbek środowiskowych, w związku z występowaniem w nich wielu inhibitorów reakcji PCR, lepsze wyniki identyfikacji uzyskuje się przy użyciu metody Nested PCR, przy której stosuje się dwie pary starterów zewnętrznych i wewnętrznych. Reakcja amplifikacji odbywa się w dwu etapach. Produkty powstałe w fazie pierwszej (preegzystujące produkty amplifikacji) stają się następnie matrycą dla wewnętrznej pary primerów, co w efekcie poprawia znacznie czułość reakcji. W związku z wymianą materiału genetycznego między bakteriami w warunkach naturalnych, w diagnostyce genetycznej próbek środowiskowych należy stosować kilka, a nawet kilkanaście różnych primerów.

Rozwinięciem wspomnianej metody jest PCR-ELISA, będąca połączeniem Nested PCR i techniki ELISA. Polega ona na wprowadzeniu do mieszaniny dNTP („master miks”) znakowanego digoksygeniną dUTP, dzięki czemu dochodzi do powstania w procesie amplifikacji znakowanych amplikonów. W kolejnym etapie wykonuje się hybryzację powstałych produktów z biotynylowaną sondą wewnątrznych starterów. Otrzymana hybryda jest przenoszona na płytki polistyrenowe opłaszczone streptawidyną, gdzie jest wychwytywana dzięki silnemu wiązaniu streptawidyny-biotyny. Wykrywanie hybrydy następuje przy użyciu przeciwciał dla digoksygeniny, znakowanych enzymem. Dzięki enzymowi i dobranemu do niego substratowi dochodzi do pojawienia się reakcji barwnej, oznaczanej na czytniku ELISA. Wykazano, że test ten jest od 10 do 100 razy czulszy od klasycznej metody PCR.

Multiplex PCR-pozwala na równoczesną amplifikację kilku regionów genomu przy użyciu różnych par primerów. Ma to swoje zalety, gdyż umożliwia wykrycie kilku czynników jednocześnie, wpływając na skrócenie czasu badań i zmniejszenie zużycia odczynników. W badaniach własnych (14) zastosowano Multiplex PCR do wykrywania *B. anthracis*, *Francisella tularensis* i *Vibrio cholerae*. Inne metody genetyczne stosowane w identyfikacji patogenów omówiono w jednej z prac (13).

Obecnie trwają intensywne badania nad opracowaniem prostych testów "handhandle tickets", przystosowanych do przeprowadzenia badań genetycznych (metoda paskowa) w warunkach polowych. Czułość ich jest zbliżona do czułości klasycznej metody PCR.

#### SPEKTROMETRIA MASOWA

Jedną z bardziej obiecujących technik identyfikacyjnych jest spektrometria masowa. Cząstki aerozolu po skoncentrowaniu poddawane są procesowi sonifikacji w celu uwolnienia białek. Otrzymane produkty są oczyszczane, koncentrowane i rozdzielane metodą chromatograficzną, a następnie poddawane jonizacji UV i analizowane w spektrometrze masowym. Metoda pozwala na identyfikację bakterii, łącznie z wykazaniem różnic międzyszczepowych. Dalszy postęp w tej dziedzinie nastąpił po zastosowaniu do jonizacji próbek, podczerwieni (UR) zamiast światła UV, dzięki czemu uzyskano bardziej swoisty sygnał i wyższą czułość. Ponadto, co warto podkreślić, metoda ta nie wymaga specjalnego opracowywania próbek (15).

#### PGCIMS (*Pyrolysis-gas chromatography-ion mobility spectrometry*)

pozwala na identyfikację chemiczno-biologiczną (16). Po koncentracji, próbka jest poddawana działaniu wysokiej temperatury, dzięki czemu dochodzi do uwalniania markerów analizowanych przez aparat. Tak, np. łatwo wykrywalny tą metodą jest kwas pikolinowy *B. anthracis*. Produkowane aparaty nie są obecnie większe od pudełka na buty.

#### CYTOMETRIA PRZEPLYWOWA

Metoda ta znalazła zastosowanie do wykrywania zarówno patogenów jak i toksyn bakteryjnych. Wartość tej metody uzależniona jest bezpośrednio od jakości odczynników (przeciwciał, antygenów). Poza stosowaniem przeciwciał i antygenów na uwagę zasługuje także możliwość użycia do celów diagnostycznych samych barwników, które mogą selektywnie wiązać się z jedno- lub dwuniciowymi kwasami nukleinowymi. Ob-

szerne dane na temat zastosowania cytometrii przepływowej w diagnostyce mikrobiologicznej zawarte są w pracy Stopy (17). Obiecujące są badania nad wykorzystaniem UCPRS w identyfikacji czynników biologicznych metodą cytometrii przepływowej (18). Wykazano przydatność tej metody do analizy wielkości fragmentów kwasów nukleinowych, co może służyć celom identyfikacyjnym (19).

#### TECHNOLOGIA „CHIP” DNA

daje możliwość przeprowadzenia znacznej liczby eksperymentów hybrydacyjnych jednocześnie (15). Reakcja zachodzi na niezwykle małej płytce, na której umieszcza się oligonukleotydy. Testowany DNA znakuje się znacznikiem fluorescencyjnym i ogląda pod mikroskopem fluorescencyjnym konfokalnym. Punkty emitujące sygnał fluorescencyjny wskazują na zaszłą hybrydację. Różne odmiany wspomnianej technologii stwarzają szerokie możliwości badawcze i aplikacyjne (15).

W ostatnim czasie nastąpił znaczny postęp w badaniach nad nowymi technologiami detekcji i identyfikacji czynników biologicznych (19). Część z nich po testach laboratoryjnych i polowych wejdzie z pewnością w najbliższym czasie do praktyki mikrobiologicznej, przyczyniając się do skuteczniejszej walki z zagrożeniami biologicznymi.

*M Bartoszcze*

#### METHODS OF BIOLOGICAL WEAPON THREATS DETECTION

#### SUMMARY

Detection and identification of biological weapon agents are ones of more important elements of defence against biological weapon and bio-terrorism. So, the attack agent determination creates the chance of necessary prophylactic - medical and liquidation activities undertaking on time. Different systems of biological hazards detection are known. Among others, they allow to detect the biological agents presence in the air, execute the aerosol particles analysis, and are able to generate the alarm signal (LRBSDS, JBSDS, FLAPS). Some systems are able to detect biological agents presence, and moreover, to identify them (JPS, JBAIDS). Luminometric method possesses many advantages, from which the versatility of its usage at different attack scenarios, is getting to stay the most important one. A lot of attention is paid to identification problems, recently. Simple technologies, adjusted to field conditions, which give initial identification result within several minutes (immuno-chromatographic tests), have been developed. These tests, based on colloidal gold may be replaced with UCP particles, what influences positively for identification sensibility and specificity. Systems allowing to execute genetic tests in field conditions (RAPID) and biosensors, thank to which bacteria and their toxins, and viruses can be identified (RAPTOR) have occurred. Huge diagnostic possibilities are created by flow cytometry. Instrumental techniques, among which the mass spectrometry pays attention, are developed. Huge hope is connected to systems working on "chips", allowing, among others, to execute significant amount of analyses simultaneously. Thank to huge expenditures, paid for biological agents identification methods development, part of them, after positive laboratory and field practical tests, shall be introduced into the microbiological practice, staying the valuable contribution of fight against bio-terrorism.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Walt DR, Franz DR. Biological warfare detection. *Anal Biochem* 2000;72:738A-46A.

2. Leoma GA. Detecting Biological Agents in Mail Using Fluorescence Particle Sizing. Detection of Bioterrorism Agents. Biodetection Technologies. Furthering Science through Information. Knowledge Press 2003;9-21.
3. Bartoszcze M, Niemcewicz M, Maliński M. Recognition of Biological Threats. AAVDM Newsletter 2001;6:113-4.
4. Bartoszcze M, Niemcewicz M., Chomiczewski K. Biological threats (aerosol, water, unconventional). Joint Service Scientific Conference on Chemical and Biological Defense Research 2002 Nov 19-21; Hunt Valley, Maryland; 21.
5. Bartoszcze M, Bielawska A. The past, present and future of luminometric methods in biological detection. Rapid methods of Analysis of Biological Materials in the Environment. Ed. P. Stopa and M. Bartoszcze. Kluwer Academic Publisher Dordrecht/Boston/London 2000;73-7.
6. Bartoszcze M, Arciuch H, Chomiczewski K, Matras J. Some Problems Concerning Application of the Luminometric Methods in the Detection of Bacillus anthracis Spores. Proc. of the 1996 ERDEC Conference on Chemical and Biological Defense Research 1997 Nov 19-22; Aberdeen Proving Ground; 711-2.
7. Nelson D, Loomis L, Fischatti V A. Using Bacterial Enzymes for Rapid Identification of Bacteria. Laboratory of Bacterial Pathogenesis. The Rockefeller University, NY and New Horizons Diagnostics Corporation, Columbia, MD; Information leaflet; 2002.
8. Lidacki A, Bartoszcze M, Arciuch H, Skoczek A, Mierzejewski J. The evaluation of IMS method for biological detection. Proc. of the ERDEC Scientific Conference on Chemical and Biological Defence Research 1995 Nov. 14-17; Aberdeen Proving Ground;775-7.
9. Tempelman L A, King K, Anderson G P, Liglers F S. Quantitating Staphylococcal Enterotoxin B in Diverse Media Using a Portable Fiber Optic Biosensor. Anal Biochem 1996;233:50-7.
10. Lim D. Real time/near real time biosensor. Detection of Bioterrorism Agents. Biodetection Technologies. Furthering Science through Information. Knowledge Press 2003;117-36.
11. Ritter T. Fighting Germs on the Front Lines: an Integrated Laboratory Approach to Field and Lab Analysis and Surveillance. Detection of Bioterrorism Agents. Biodetection Technologies. Furthering Science through Information. Knowledge Press 2003;95-103.
12. Cooper D E. Upconverting Phosphor Technology Overview. Biological Agent Detection and Identification. DARPA, 1999 April 27-30; Santa Fe, New Mexico;76-100.
13. Matras J, Bartoszcze M: Bacillus anthracis. Post.Mikrobiol 2002;41:3-19.
14. Niemcewicz M, Osiak B, Gaweł J, Bartoszcze M. Zastosowanie PFGE i PCR w różnicowaniu niechorobotwórczych (bezpłazmidowych) szczepów B. Anthracis, B. spp. 813. II Konferencja naukowa. Ochrona przed Zagrożeniami Biologicznymi; 2002 listopad 19; Puławy.
15. Donlon M. Biosensors - The tool for fast detection. NATO ARW. 2003 Jan 15-18 Warsaw;31.
16. Spangler G E. Miniaturizing Gas Chromatography in Combination with Ion Mobility Spectrometry. DARPA, 1999 April 27-30; Santa Fe, New Mexico; 302.
17. Stopa P J. The Application of Flow Cytometry For the Detection and Identification of Microbiological Agents. Ph.D. Dissertation. Military Institute of Hygiene and Epidemiology Warsaw;1999.
18. Wright B. Compact Flow Cytometer. Biological Agent Detection and Identification. DARPA Santa Fe, New Mexico 1999 April 27-3;94-100.
19. CBNSP-Annual Report Technology Development. Chemical & Biological National Security Program. <http://www.nn.doe.gov/cbnp/tech-dev.shtml>.

**Adres autora:**

Michał Bartoszcze

Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych WIHiE

ul. Lubelska 2, 24-100 Puławy