Лекція № 11

Комерційні варіанти систем на основі біосенсорів

Аналізатори для клінічної діагностики.

Портативні аналізатори для використання в домашніх умовах.

Системи для *in vivo* моніторингу в клінічних умовах.

Аналізатори для харчової промисловості, біотехнологічного виробництва і екологічного моніторингу.

26.04.2010

<u>Основними галузями практичного застосування біосенсорів є:</u>

- ✔**медична діагностика,**
- ✔**харчова промисловість,**
- ✔**біотехнологічне виробництво і**
- ✔**екологічний моніторинг.**

Медична діагностика знаходиться на першому місці у цьому переліку, оскільки понад 80 % всіх комерційних приладів припадає саме на цю галузь.
Тут також існує певний розподіл:

- ✔**автоаналізатори для клінік і лабораторій,**
- ✔**портативні прилади для домашнього використання і**
- ✔**системи для *in vivo* вимірювань за клінічних умов.**

Аналізатори для клінічної діагностики

При створенні аналізаторів для клінічної діагностики необхідно враховувати наступні вимоги:

✔високі аналітичні характеристики приладів, а саме точність, надійність, відтворюваність даних;

✔простота у використанні;

✔дешевизна та доступність реагентів, що використовуються;

✔достатня швидкість аналізу.

Компанія	Країна	Модель	Речовина
Yellow Springs Instr., Ohio, OH.	США	YSI 2300 Stat Plus YSI 2700	глюкоза, лактат етанол, холін
NOVA Biomedical, Waltham, MA	США	NOVA Stat Profile	глюкоза, лактат, сечовина
PGW Medingen GmbH, Dresden	Німеччина	ESAT 6660 ECA 2000	глюкоза, лактат, глюкоза, лактат
Eppendorf AG, Hamburg	Німеччина	EBIO Plus EBIO Compact	глюкоза, лактат глюкоза, лактат
EKF Diagnostic GmbH, Magdeburg	Німеччина	BIOSEN 5030 BIOSEN 5040	глюкоза, лактат глюкоза, лактат
Analox Instruments Ltd, London	Англія	GM7 MicroStat GM9	глюкоза, лактат, етанол, глюкоза
Dr.Muller Geratebau GmbH, Freital	Німеччина	Super G	глюкоза
Biometra, Gottingene	Німеччина	OLGA	глюкоза, лактат
Gonotec, Berlin	Німеччина	SENSOMAT	етанол
Fresenius AG, Hamburg	Німеччина	Ionometer	глюкоза
Fuji Electric Corp., Osaki	Японія	GLUCO 20, UA-300 A	глюкоза, сечова кислота
Kyoto Daiichi Kodaku Co. Ltd, Kyoto	Японія	GT 1630, LT 1710	глюкоза, лактат
З-д точної механіки, Панєвєжис	Литва	ЕКСАН	глюкоза, лактат, сечовина
Seres, Aix-en-Provence	Франція	ENZYMAT	глюкоза, лізин, холін
Solea-Tacussel, Villeurbanne	Франція	Glucoprocesseur	глюкоза, лактат
SGI, Toulouse	Франція	MICROZYM-L	лактат, глюкоза
Roche, Basel	Швейцарія	LA 640	лактат

Перший комерційний аналізатор для визначення глюкози фірми Yellow Spring Instr. було анонсовано у 1975 році. Сьогодні YSI Incorporated виробляє аналізатор YSI 2300 StatPlus, який визначає глюкозу в цільній крові, сироватці та плазмі, а також лактат в цереброспінальній рідині. Для аналізу необхідно 25 мкл зразка, результат виводиться на екран вродовж хвилини, інтервал між вимірами близько 2 хвилин. Фермент (глюкозооксидаза чи лактатоксидаза) іммобілізується між двома мембранами: полікарбонатною та ацетатцелюлозною. Перша обмежує дифузію субстрату до ферментного шару, друга – попереджає інтерференцію з іншими електрохімічно активними компонентами. Час роботи мембран - 21 день для глюкозної та 14 днів для лактатної мембран.

Найбільшу кількість аналізаторів створено для визначення глюкози.

Перевага такого роду аналізаторів полягає в можливості роботи з нерозведеними зразками, тому що при введенні зразка до комірки виконується автоматичне внутрішнє розведення його, що дозволяє визначати досить високі концентрації глюкози в пробі. Крім того, вимірювання можна проводити в міру необхідності, використовуючи системи занурюваного типу. Оскільки з самого початку такі аналізатори (наприклад, YSI, ECA, Glucoprocesseur) показали хороші робочі характеристики при визначенні глюкози, на їхній основі були створені модифіковані системи для визначення інших речовин, а саме – сахаридів, лактату, етанолу, сечової кислоти.

Вони є найбільш придатними для потреб невеликих лабораторій. Використовуючи об'єм проби близько 50 мкл і маючи похибку визначення не більше 2 %, ці аналізатори давали можливість проводити близько 40 аналізів за годину.

Збільшення частоти вимірювань до 180 за годину розширило можливості аналітичних систем за рахунок впровадження в них елементів проточного аналізу.

Подібного роду аналізатори (ESAT, EBIO, BIOSEN, ЕКСАН) стали виробляти в середині 80-х років для визначення глюкози і лактату і застосовувати, як правило, у великих медичних лабораторіях. В таких аналізаторах використовували проточну систему попереднього розведення зразків.

Всі наведені в Таблиці аналізатори мають <u>подібні характеристики</u>, тому що більшість з них базується на <u>однакових техніці та принципах.</u>

На сьогодняшній день це найбільш прості у використанні та дешеві лабораторні аналітичні методи аналізу. Всі результати вимірювань зберігаються в пам”яті аналізатора, можуть бути роздруковані і відправлені у зовнішню лабораторну базу даних. Більшість параметрів аналізатора зазвичай можна програмно змінювати, наприклад, границі патологічних значень (для автоматичного повторного вимірювання), протоколи, мова спілкування з оператором та ін. Аналізатори дозволяють проводити повторні динамічні спостереження (зокрема, „цукровий профіль”), вони незамінні при експрес-діагностиці в реанімаційних відділеннях.

Портативні аналізатори для використання за домашніх умов

При створенні аналізаторів для діагностики за домашніх умов необхідно було врахувати наступні вимоги:

- ✔ **мала тривалість аналізу;**
- ✔ **невеликі розміри приладу; простота у використанні;**
- ✔ **дешевизна як самого приладу, так і його чутливого елементу;**
- ✔ **аналітичні характеристики, що дозволяють отримати достовірні результати.**

Для зменшення тривалості аналізу необхідно було насамперед перейти до роботи з цільною нерозведеною кров'ю, виключаючи тим самим будь-які процедури, що передували аналізу. Вперше подібного роду датчики розробили та ввели в практику на фірмі Genetic International в Англії (потім MediSense, зараз в складі Abbott Laboratories).

Abbott Laboratories

Сенсор складався з одноразової електродної смужки з іммобілізованою <u>глюкозооксидазою</u>, модифікованою фероценом. Для проведення аналізу краплю крові, попередньо взяту з пальця, наносили на робочу ділянку сенсора, який потім вставляли в невеличкий прилад. Аналіз тривав 30 с, що було швидше, ніж за допомогою фотометричних смужок. Похибка вимірювань була приблизно 4 %, що також було значно менше, аніж за вимірювань паперовими тест-смужками.

<u>Glucometer Elite</u>, що виробляється <u>Bayer Diagnostics</u> для аналізу глюкози, оснований на електрохімічному визначенні розчинного медіатора фериціаніду та використовує при роботі принцип „капілярного заповнення” сенсора зразком крові. Але в цих приладах часто відбувається спонтанна реакція фериціаніду з інтерферуючими речовинами, такими як аскорбінова і сечова кислоти, що впливає на величину відгуку, а відповідно вносить похибку у вимірювання концентрації глюкози. До того ж, вартість одного вимірювання є досить високою.

FreeStyle Papillon Mini

Амперометричний сенсор.
Фермент – глюкозодегідрогеназа.
При использовании FreeStyle Papillon™ Mini требуется самая маленькая в мире капля крови – 0,3 мкл. Возможность добавления капли крови на тест-полоску в течение 60 секунд - анализ начнется только при наличии достаточного количества крови,
Память на 250 результатов с датой и временем анализа, быстрый результат в среднем всего за 7 секунд,
Измерение с малой разностью потенциалов гарантирует, что точность анализа не будет зависеть от наличия в крови наиболее распространенных интерферентных веществ, таких как мочевая кислота, аспирин или парацетамол.

Приклади інших портативних приладів

Medtronic MiniMed

Home Diagnostics

Johnson & Johnson LifeScan

Johnson & Johnson OneTouch

<u>i-STAT Co.</u> виробляє портативний прилад для аналізу глюкози, сечовини і різних іонів, який складається зі змінного <u>картриджа</u> й <u>аналізатора</u>. Картридж являє собою демонстрацію новітніх досягнень мікросистемних технологій і комбінує компоненти мікроелектронної кремнієвої, мікропроточної, біосенсорної та плівкової технологій. Інтеграція напівпровідникової технології з електрохімічними та біохімічними принципами знайшла своє відображення в створенні мікросенсорного масиву з високими аналітичними характеристиками. Цей сенсорний масив, який є основною частиною картриджа, представляє собою набір тонкоплівчастих електродів і в залежності від речовини, що визначається, може функціонувати в режимі амперометричного, потенціометричного чи кондуктометричного.

Для аналізу краплю крові розміщують в спеціальному відділі картриджа. Всередині картриджа в резервуарі з фольги знаходиться калібрувальний розчин з відомою концентрацією необхідного субстрату. Спочатку - тестовий етап, на якому калібрувальний розчин проходить через сенсорний масив для установчого вимірювання. Після цього використаний розчин виводиться до невеликого резервуару для відходів всередині картриджа за допомогою повітряного міхура, який також знаходиться всередині. Потім на сенсорний масив поступає зразок крові, який після вимірювання також виводиться до резервуару для відходів. Система i-STAT починає аналіз в той момент, коли картридж вставляється до портативного аналізатора або до модуля для аналізу крові в системі моніторингу пацієнтів Omnicare фірми Hewlett Packard (Palo Alto, CA, США). Результати виводяться на екран впродовж 2 хвилин, похибка визначення – 1-3 %.

Портативні аналізатори для діагностики за домашніх умов

Компанія	Країна	Модель	Речовина
Abbott Laboratories, Illinois, IL	США	MediSense ExacTech MediSense Precision FreeStyle Papillon	глюкоза глюкоза глюкоза
Bayer Corporation, Leverkusen	Німеччина	Glucometer Elite	глюкоза
i-STAT Corporation, Princeton, NJ	США	i-STAT G3+	глюкоза, кисень
Roche Diagnostics, Basel	Швейцарія	Advantage Meter	глюкоза
Johnson & Johnson, Brunswick, NJ	США	LifeScan OneTouch	глюкоза
Home Diagnostics Inc., Fort Lauderdal FL	США	Prestige IQ	глюкоза
MedTest Systems, College Park, MD	США	Medisensor 2001	глюкоза
Inverness Medical Technology Inc., Inverness	Шотландія	Excel G	глюкоза

Останні досягнення в галузі розробки і створення портативних аналізаторів для широкого використання спрямовані на створення приладів „безболісного аналізу”, в яких зразок крові береться не з пальця, а з менш болісної частини тіла (наприклад, з передпліччя чи стегна).

Перші успішні варианти були розроблені фірмою Amira Medical (Scotts Valley, CA, США). Їхня система AtLast представляла собою комбінацію приладу для отримання проби з глюкозним аналізатором і пройшла маркетингову апробацію наприкінці 1998 р. за допомогою 510(k) процесу, що сьогодні в США є обов’язковим при впровадженні приладів в галузі охорони здоров’я. AtLast робить маленький розріз на шкірі, використовуючи мікроскальпель, з’єднаний зі спеціальним механізмом відбору проби. Для аналізу необхідно всього 2 мкл крові, яка капіляром поступає на датчик. Система може адаптуватись до різних типів шкіри. AtLast отримала дуже високі оцінки спеціалістів і користувачів і була нагороджена в 2000 р. престижною премією Medical Desighn Excellence Award.

В листопаді 2001 р. фірма Roche Diagnostics викупила Amira Medical і почала виробництво свого продукту під торговою маркою Accu-Check, який поєднав в собі „know-how” Amira Medical та аналізатори фірми Roche.

Наступною компанією, якій вдалося пройти апробацію і в листопаді 2000 р. отримати 510(k) допуск, була Abbott Laboratories з її біосенсорним продуктом під торговою назвою Sof-Tac. Принцип його роботи подібний до системи AtLast.

Sof-Tac досить простий у використанні, завбільшки з плеєр і, за твердженням виробників, зовсім безболісний для пацієнтів. Так само, як у випадку AtLast, дані можуть зберігатися в пам'яті аналізатора і завантажуватись звідти у комп'ютер.

Компанія Johnson & Johnson також отримала у 2000 р. 510(k)-допуск для свого сенсорного продукту OneTouch Ultra серії LifeScan, який було випущено на ринок у лютому 2001 р.

Для аналізу за допомогою цього датчика необхідно лише 1 мкл крові з плеча, принцип роботи такий самий, як у AtLast та Sof-Tac. При клінічній апробації 78 % пациентів підтвердили, що такий тест зовсім безболісний, або, принаймні, значно менш болісний, ніж отримання проби крові з пальця. Як і всі описані вище портативні системи, цей аналізатор значно зручніший при персональному моніторингу населення на діабет.

Системи для *in vivo* моніторингу в клінічних умовах

При створенні аналізаторів для *in vivo* вимірювань в клінічних умовах необхідно було врахувати наступні вимоги:

- ✔ **можливість автоматичних вимірювань кожні кілька хвилин;**
- ✔ **високі аналітичні характеристики приладів, а саме точність, надійність, відтворюваність даних, сумісність з людським організмом;**
- ✔ **мала тривалість аналізу;**
- ✔ **висока операційна стабільність.**

Над розробкою подібних систем працювало декілька дослідницьких груп та фірм.

Наприклад, описано модифіковану двохелектродну систему з сенсором голкоподібної форми для підшкірної імплантації собакам. Система базувалась на електроді Кларка і для встановлення базового значення потрібно було не менше 30 хвилин.

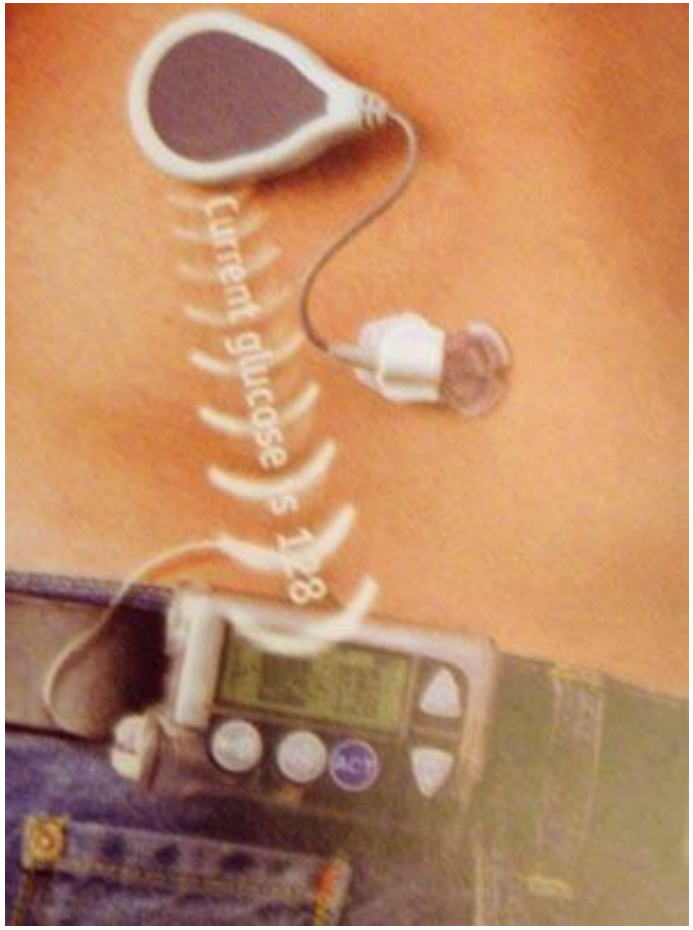
Іншими авторами було запропоновано застосувати два трьохелектродні датчики для визначення поглинання кисню в процесі окислення глюкози. Автори також використовували каталазу для збільшення терміну життя сенсорів. Імплантовані в організм різних собак сенсори демонстрували добру чутливість і тривалість життя близько 15 тижнів.

Куделка зі співавторами імплантували підшкірно щурам більше 22 тонкоплівкових металевих глюкозних електродів, після 90 хв. стабілізації 30 % сенсорів залишались в робочому стані після 8 днів роботи.

Першими спробували комерціалізувати систему подібного роду на фірмі Miles Laboratories (Elkhart, IN, США). В такій системі була необхідною зовнішня циркуляція крові за допомогою двох внутрішньо судинних катетерів з ферментним сенсором і система введення інсуліну, контрольованого за допомогою комп'ютера. Проте великі габарити і потреба великої кількості крові обмежили використання цієї системи виключно дослідницькою сферою.

Фірма <u>MiniMed</u> (Norrthridge, CA, США), викуплена пізніше <u>Medtronic</u> (Minneapolis, США), була першою, якій вдалося комерціалізувати реальну систему для постійного *in vivo* моніторингу глюкози при використанні в клінічних умовах.

Наступною спробувала впровадити подібну техніку компанія <u>Cygnus Inc</u>. (Redwood City, CA, США), яка анонсувала свій продукт в березні 2001 р.



Система для постійного моніторингу глюкози (Continuous Glucose Monitoring System – CGMS) фірми MiniMed дозволяє вимірювати глюкозу кожні 5 хв протягом 72 годин імплантації. Сенсором є мініатюрний електрод, що знаходиться всередині маленької голки, за допомогою якої він вводиться під шкіру. Після видалення голки сенсор прикріплюється до маленького пластикового диску розміром з невелику монетку, яка утримує його в жорсткому положенні. Система моніторингу з' єднується з інсуліновою помпою, в результаті отримуємо повністю замкнуту систему, що носить назву Paradigm Real Time (722).

Це є новинкою 2006 року, вона вперше була представлена на виставці в Афінах у вересні 2005 р (в рамках 41 річної конференції EASD 2005.

Перспективи застосування подібного роду техніки дуже високі, але існує ряд перепон, що стримують її швидкий успішний розвиток. Перш за все, не всі пацієнти згодні на введення в організм подібних *in vivo* систем. Крім того, не всі лікарі ще повністю довіряють таким новітнім системам і віддають перевагу традиційним підходам.

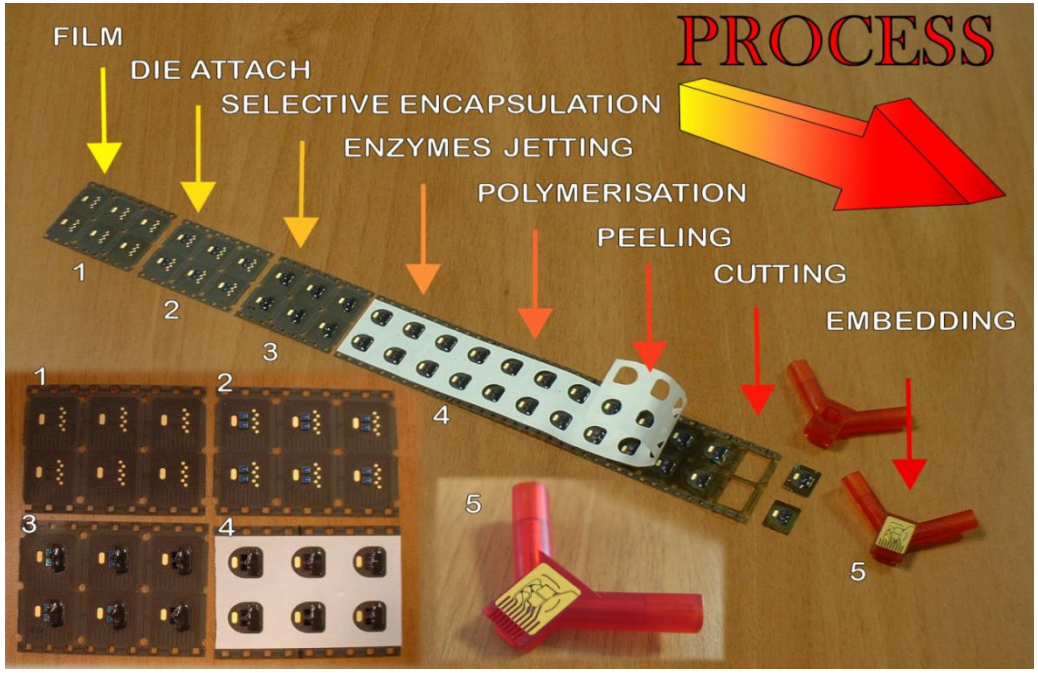
Аналізатори для харчової промисловості, біотехнологічного виробництва і екологічного моніторингу

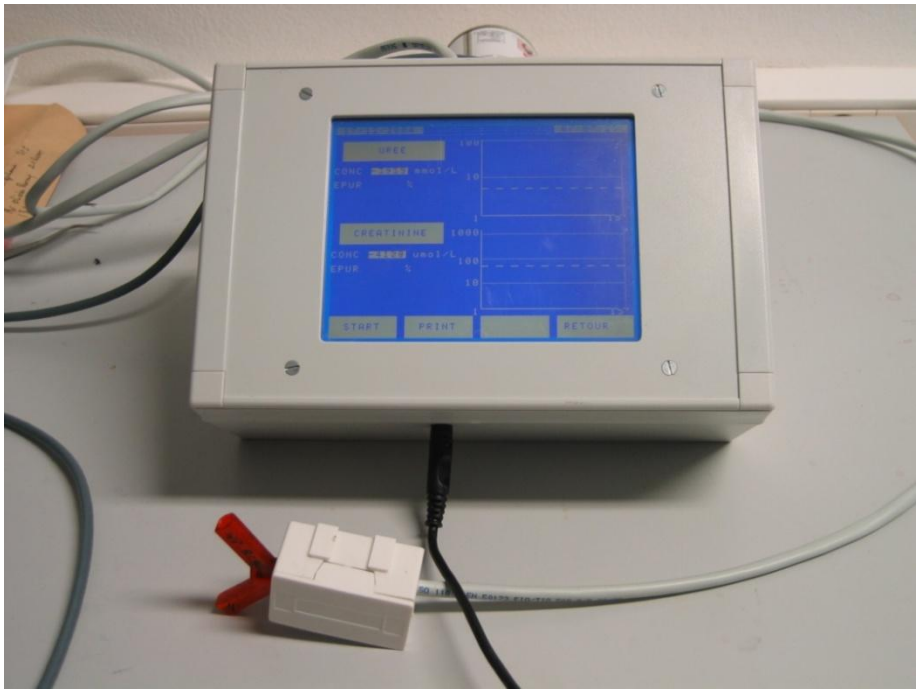
<u>Харчова промисловість та біотехнологічне виробництво</u> – це галузі, де останнім часом розпочалося впровадження біосенсорів, хоч і не так інтенсивно, як в медичній діагностиці. Найпростішим є підхід, коли для контролю процесу виробництва адаптуються відомі комерційні системи, що використовуються в медичній діагностиці. Крім того, спеціально розробляються нові системи. Існують два основні варіанти (крім „*off line*”-аналізу) використання біосенсорів для контролю процесу виробництва: „*in situ*” та „*on line*”. При безпосередньому використанні датчиків всередині біореакторів („*in situ*”) необхідно враховувати наступні фактори: сенсор повинен залишатись в робочому стані навіть після стерилізації; концентрації, які необхідно визначати в біореакторах, часто перевищують діапазон роботи сенсора; в біореакторі наявні численні інтерферуючі частинки у великій концентрації; всередині біореактора існує висока температура, що може спричинити інактивацію біологічного матеріалу.

Такі умови не дозволили поки що розробити успішний комерційний варіант сенсора для безпосереднього використання всередині біореактора. В літературі описано ферментний електрод для аналізу глюкози під час процесу ферментації тіста. Аналізатор складався з двох частин. Внутрішня частина мала ферментний датчик з чотирьох робочих електродів, модифікованих 1,1-діметилфероценом, на три з яких була іммобілізована глюкозооксидаза. Стерильність досягалась зовнішньою полікарбонатною мембраною з розміром пір 0,015 мкм на електродах і металевою мембраною з розмірами пір 2 мкм, закритою зовнішнім кожухом. Сенсор міг калібруватися „*in situ*” потоком калібрувального розчину між кожухом і ферментними електродами і показував операційну стабільність 4 дні, впродовж яких його чутливість впала лише на 15 %.

В основному всі системи, що застосовуються на сьогодні, працюють в так званому <u>квазі-безперервному</u> режимі аналізу. В цьому випадку аналізатор зв’язується з системою відбирання проб, пробу періодично відбирають з біореактора та аналізують.

Hemodia


PROCESS
FILM
DIE ATTACH
SELECTIVE ENCAPSULATION
ENZYMES JETTING
POLYMERISATION
PEELING
CUTTING
EMBEDDING
1
2
3
4
5


START
PRINT
RETOUR

Аналізатори для контролю процесу виробництва та якості продуктів

Компанія	Країна	Модель	Речовина
Yellow Springs Instr., Ohio, OH.	США	YSI 2700	глюкоза, лактоза етанол, цукроза
Analox Instruments Ltd, London	Англія	GM6	глюкоза, лактат, етанол, глицерин
Biometra, Gottingene	Німеччина	OLGA	глюкоза, етанол
Seres, Aix-en-Provence	Франція	ENZYMAT	глюкоза, лактат
Solea-Tacussel, Villeurbanne	Франція	Glucoprocesseur	глюкоза, лактат
Oriental Electric Co., Ltd	Японія	Freshness Meter	свіжість риби
Toyo Jozo Co.	Японія	Biosensor	холестерол, фосфоліпіди

В галузі моніторингу довкілля насамперед використовують мікробіальні амперометричні сенсори, зокрема, при аналізі стічних вод визначають біохімічно окислювані компоненти (БОК). Але така оцінка триває близько 5 днів, тому датчикі неможливо застосувати для постійного контролю. Сенсори для експрес-визначення БОК розроблені на основі іммобілізованих клітин *Bacillus subtilis* і *Trishosporon cutaneum*.

Іншими авторами описано датчик для визначення бактеріального складу розчинів. Прилад базується на властивості медіаторів (наприклад, р-бензохінону) видаляти електрони з дихального шляху мікроорганізмів. Переокислення медіатора на електроді є прямим індікатором активності бактерій у розчині. Цей прилад було комерціалізовано фірмою Biosensori Iritech S.p.a (Італія) і названо Midas Pro. На сьогоднішній день це, мабуть, єдиний комерційний прилад на основі біосенсорів в галузі екології.

Більшість з комерційних пристроїв використовує амперометричні біосенсори на базі електрохімічних перетворювачів, що є найкраще вивченими.

Дослідження роботи різних типів перетворювачів та порівняння їхньої ефективності для реєстрації фізико-хімічних сигналів, генерованих при взаємодії біоселективного елементу з аналізованою сполукою, в залежності від умов проведення експериментів, матеріалу, форми і розмірів електродів, значно покращило б перспективи комерціалізації всіх класів електрохімічних біосенсорів та зробило б їх конкурентоспроможними порівняно з іншими приладами завдяки високій чутливості та селективності, простоті у використанні та швидкості аналізу, а також широкого діапазону речовин, що можуть бути детектовані.