

ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА МАЛЯРИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ МЕТОДОМ ЛАТЕРАЛЬНОГО ПРОТОЧНОГО ИММУНОАНАЛИЗА С ПРИМЕНЕНИЕМ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК ИЗ ТЕЛЛУРИДА КАДМИЯ

© 2023 г. Х. Чаухан*, А. Джаривала*, В. Кхерадж*,#

*Физический факультет Национального технологического института Сардара Валлабхая,
Сурат, Гуджарат, 395007 Индия

#E-mail: vk@phy.svnit.ac.in

Поступила в редакцию 24.06.2022 г.

После доработки 11.07.2022 г.

Принята к публикации 12.07.2022 г.

Латеральный проточный иммуноанализ — это простой, дешевый и быстрый диагностический инструмент для определения болезней по таким анализам, как антитела, паразиты и другие интересующие биомаркеры. Однако многие его модификации могут определить инфекции лишь качественно. Также типичный латеральный проточный иммуноанализ, основанный на визуальной оценке тест-полоски, страдает от низкой чувствительности в случае легких форм инфекций или их ранних стадий и может вызывать ложноотрицательную интерпретацию результатов. Здесь мы приводим результаты применения квантовых точек из теллурида кадмия, покрытых тиогликолевой кислотой в качестве метки для усиления люминесценции и, таким образом, чувствительности детектирования для диагностики малярии. Химический путь синтеза квантовых точек из теллурида кадмия, покрытых тиогликолевой кислотой, был систематически оптимизирован с помощью анализа оптических свойств квантовых точек. Эти оптимизированные квантовые точки из теллурида кадмия, покрытого тиогликолевой кислотой, были конъюгированы с антималярийными антителами против белка HRP2 из *P. falciparum* и затем были включены в устройства для латерального проточного иммуноанализа. В дальнейшем был разработан код обработки изображений для количественного подсчета малярийных паразитов как отношения интенсивности контрольной и опытной линий иммуноанализа. Результаты сравнивались с результатами стандартного проточного иммуноанализа, проведенного с использованием коллоидного золота. Было продемонстрировано, что чувствительность обнаружения малярийной инфекции при низких концентрациях малярийного паразита существенно улучшена благодаря усиленной люминесценции контрольной и опытной линий под ультрафиолетовым освещением, вызванной использованием квантовых точек из теллурида кадмия, покрытых тиогликолевой кислотой. Также было показано, что подсчет концентрации паразита на основе обработки изображения может уменьшить вероятность ложноотрицательных результатов при низкой концентрации паразита и помочь в проведении ранней диагностики малярии.

Ключевые слова: CdTe, квантовые точки, нанотехнология, латеральный проточный иммуноанализ, малярия, диагностика.

DOI: 10.31857/S0006302923030237, EDN: FTTHTS

Методики диагностики на месте показали свою важность в области медицинской диагностики для раннего обнаружения болезней [1]. Они играют жизненно важную роль, особенно в случаях высококонтагиозных заболеваний, поскольку способствуют обнаружению патогена на ранней стадии и сдерживанию дальнейшего распространения инфекции. Также во время эпиде-

мий диагностика на месте облегчает быстрый скрининг большей части населения и помогает административному персоналу в разработке мер противодействия эпидемии. Одной из технологий диагностики на месте, которой с недавних пор уделяется значительное внимание, является флуоресцентный метод латерального проточного иммуноанализа [2–4]. Основанные на флуоресценции биорецепторы широко используются в иммуноанализе и ферментативных методах с

Сокращения: ЛПИ — латеральный проточный иммуноанализ, КТ — квантовые точки, ТГК — тиогликолевая кислота.

применением иммуносорбентов (ИФА/ELISA) для детекции биомаркеров [5, 6].

Латеральный проточный иммуноанализ (ЛПИ) широко используется для качественного обнаружения с применением антител различных аналитов, таких, как бактериальные антигены, различные вирусы, лекарственные препараты, нуклеиновые кислоты и другие биомаркеры [7].

Обычно в ЛПИ используют такие репортеры, как коллоидное золото, окрашенные красители или частицы латекса, которые генерируют видимый сигнал при связывании соответствующего аналита [7]. Подобные тест-системы имеют очевидные преимущества в результативности, портативности и стабильности, что делает их подходящими для диагностики на месте. Однако обычные системы иммуноанализа на основе коллоидного золота имеют ряд присущих им ограничений, таких как отношение количества золота и связавшегося антитела, количество эффективных сайтов связывания и сравнительно низкая видимость тестовой и контрольной полос для невооруженного взгляда. Эти проблемы влияют на чувствительность метода, особенно в случае детекции малых концентраций аналитов. Масштабные исследования проводятся с целью увеличить чувствительность детекции с помощью увеличения интенсивности люминесценции [8, 9].

Учеными было предпринято несколько попыток увеличить чувствительность латерального проточного иммуноанализа. Один из таких подходов заключается в интеграции различных сигнальных молекул (меток, репортеров), таких как флуорофоры, коллоидный углерод, наночастицы серебра и полупроводниковые квантовые точки (КТ) [10–12]. Диспергируемые в воде КТ появились как возможная эффективная замена иммуноанализу с применением коллоидного золота. КТ широко применяются в получении изображений клеточных структур, в иммунологических методах обнаружения рака [13] и биосенсорных устройствах. Они также применяются для внутриклеточной сигнализации при изучении белок-белковых взаимодействий [14–16].

В целом КТ представляют собой смешиваемые с водой люминесцентные полупроводниковые нанокристаллы. Они могут эффективно связывать разные молекулы для применения в иммуноанализе. Вследствие высоких значений собственной люминесцентной активности они могут проявлять значительно большую чувствительность, чем коллоидное золото [12, 17, 18]. Существует ряд бинарных полупроводящих соединений, которые обладают подобными желательными оптоэлектронными свойствами. Сульфид кадмия (CdS) — один из активно изучаемых материалов для таких приложений. Однако недавно фокус внимания сместился в сторону теллурида кадмия

(CdTe). CdTe — это халькогенидное соединение с высокой интенсивностью фотолюминесценции [19]. Квантовые точки из CdTe размером в десятки нанометров особенно интересны в контексте иммуноаналитических приложений, поскольку синее смещение их максимума эмиссии фотолюминесценции, зависящее от размера, сдвигает пик люминесценции в видимую область электромагнитного спектра. Ранние работы по синтезу CdTe-КТ датируются концом 1980-х годов. Одними из пионеров в этой области были авторы работы [20], которые сообщили о синтезе CdTe-КТ напрямую в водном растворе с использованием перхлората кадмия и теллурида натрия как предшественников. В качестве стабилизатора реакций они использовали гексаметафосфат натрия. Авторами работы [21] латеральная проточная система на основе CdTe-квантовых точек была разработана во время работы по детекции шигатоксина типа II. Чтобы провести сравнительный анализ, они также метили антитела наночастицами золота и показали, что антитела, помеченные CdTe-КТ, имеют предел детекции 5 нг/мл, в то время как для ЛПИ на основе наночастиц золота нижний предел обнаружения составил 25 нг/мл. Таким образом, было показано, что КТ могут существенно улучшить чувствительность ЛПИ. Однако в литературе до сих пор недостаточно данных о применении CdTe-КТ для ЛПИ с другими антителами. Это особенно важная проблема, поскольку конъюгация различных типов биомолекул с CdTe-КТ — серьезная задача, требующая тщательной оптимизации. Например, насколько нам известно, до сих пор не было сообщений об ЛПИ на основе CdTe-КТ для обнаружения возбудителя малярии.

Малярия — это, возможно, одно из самых смертоносных заболеваний, в особенности в тропических и субтропических регионах. Согласно Всемирному докладу по малярии 2020 г., в 2019 г. было обнаружено 229 миллионов случаев малярии в 87 странах мира, из них полмиллиона случаев были смертельными. 94% случаев имели место в Африке [22]. Диагностика малярии на месте в африканских сельских регионах до сих пор очень затруднена вследствие ряда ограничений, таких как дефицит ресурсов, инфраструктуры и отсутствие квалифицированного медицинского персонала. В таких случаях быстрая диагностика на основе латерального проточного анализа может иметь огромное влияние на результативность борьбы с малярией, поскольку такие тесты, предположительно, будут достаточно надежными и простыми в обращении [23].

Однако в случае таких распространенных заболеваний, как малярия, улучшение чувствительности может быть жизненно важно, а использование CdTe-КТ могло бы значительно увеличить чувствительность детекции, что позволит обеспе-

чить раннюю диагностику заболевания и поможет в снижении смертности вследствие своевременного лечения. Ниже будут приведены данные о синтезе CdTe-квантовых точек и их последующей конъюгации с антималярийными антителами к белку HRP2 из *P. falciparum*, а также об их использовании в латеральной проточной иммуноаналитической платформе для ранней диагностики малярии на месте.

В дополнение к ранней диагностике результат количественного подсчета возбудителя инфекции мог бы стать очень важным параметром в принятии правильных решений в выборе терапии заболевания. Количественная оценка патогена также могла бы помочь в периодическом наблюдении за процессом выздоровления пациентов с помощью частого тестирования и отслеживания графика выздоровления. В данной статье мы также приводим данные по подсчету возбудителя инфекции *Malaria falciparum* с помощью определения относительных интенсивностей контрольного и опытного пиков в ЛПИ на основе CdTe-КТ через обработку изображений. Полученные с помощью ЛПИ на основе CdTe-КТ результаты сравниваются с современным «золотым стандартом детекции», которым на сегодняшний день являются системы ЛПИ на основе коллоидного золота.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Пентагидрат хлорида калия ($\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (98%), борогидрид натрия (NaBH_4) ($\geq 98\%$) и цитрат натрия (99%) были приобретены в компании SRL Chemical (Индия). Порошок металлического теллура (99.8%), N-гидроксисукцинимид и этилендиамидаминопропилкарбодиимида гидрохлорид (98%) были приобретены в Sigma Aldrich (Индия). Тиогликолевая кислота (ТГК) (80%) и бычий сывороточный альбумин ($\geq 98\%$) были закуплены в Loba Chemie и MP Bio-medical (Индия) соответственно. Нитроцеллюлозная мембрана приобретена в MDI Membrane (Индия). Фосфатно-солевой буферный раствор, ЛПИ на основе коллоидного золота, антималярийные антитела против белка HRP2 *P. falciparum* и образцы крови с возбудителем малярии были получены от IRIS Nanotech (Индия). Все реактивы, использованные в работе, были либо аналитической чистоты, либо максимально возможной степени чистоты из доступных. Синтез и измерения проводили с применением в качестве растворителя деионизированной воды MilliQ (Millipore, США).

Приготовление CdTe квантовых точек. Для приготовления CdTe-квантовых точек 1.5 ммоль/л пентагидрата хлорида кадмия ($\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) растворяли в 100 мл воды. Затем добавляли ТГК до

концентрации 10 ммоль/л при перемешивании на магнитной мешалке. После добавления ТГК раствор становился слегка мутным. Для доведения pH до 10.0 добавляли NaOH (0.1 моль/л) до тех пор, пока раствор не становился прозрачным. Полученный раствор доводили до кипения в трехгорлой колбе. Этот раствор обозначали как Sol-A. Далее в отдельной емкости добавляли 30 мг NaBH_4 к 0.6 мл деионизированной воды, а затем сразу же добавляли 20 мг порошка теллура. Далее раствор нагревали при 50°C в течение 15 мин, пока раствор NaHTe не приобретал фиолетовый цвет. Этот раствор затем добавляли к кипящему раствору Sol-A при интенсивном перемешивании, смесь кипятили 120 мин для осуществления реакции. В течение процесса малую aliquоту раствора периодически отбирали с интервалом в 20 мин для исследования эффекта времени реакции на размер частиц. Это важный этап для оптимизации контроля размера и, следовательно, оптических свойств получаемых квантовых точек. Из этих образцов были получены CdTe-квантовые точки, покрытые ТГК, с разными оптическими свойствами, которые были обозначены как QD20M, QD40M, QD60M, QD80M, QD100M и QD120M соответственно, как показано на врезке на рис. 1 (образцы под ультрафиолетовым облучением, размещены слева направо). Приготовленные образцы КТ хранились при 2–8°C для дальнейшего использования. Для осаждения этих квантовых точек 20 мл полученного раствора помещали в 50 мл химический стакан. К данному раствору добавляли 20 мл смеси метанол-вода в соотношении 3:1, после чего смесь инкубировали 30 мин для прохождения реакции. КТ осаждались за 30 мин, осадок отбирали в отдельную пробирку. Процесс повторяли трижды для удаления избытка тиогликолевой кислоты из системы. Осадок ресуспендировали в 20 мл фосфатного буферного раствора (10 ммоль/л) с pH 7.4. Этот раствор позже обрабатывали ультразвуком с помощью погружного ультразвукового зонда в течение 30 мин на ледяной бане. Обработанные квантовые точки хранили при 2–8°C для дальнейшего использования.

Конъюгация квантовых точек с антималярийными антителами. В отдельной емкости разводили исходный раствор антималярийных антител против белка HRP2 *P. falciparum* в фосфатно-солевом буферном растворе (10 ммоль/л) до конечной концентрации 5 мг/мл. К этому раствору добавляли 0.2 мг этилендиамидаминопропилкарбодиимида гидрохлорида. Затем к раствору добавляли 0.6 мг N-гидроксисукцинимид для достижения финальной концентрации в 5 ммоль/л. К этому раствору антималярийных антител прибавляли 5 мл приготовленных CdTe-квантовых точек и тщательно смешивали растворы. Смесь инкубировали 60 мин для прохождения реакции и затем

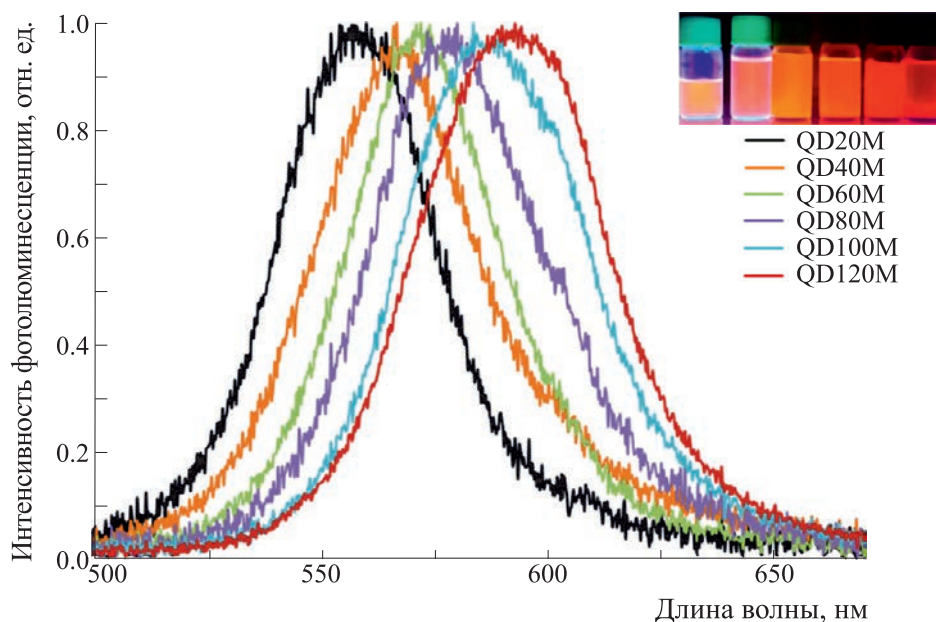


Рис. 1. Спектры фотолюминесценции свежеприготовленных CdTe-КТ, покрытых ТГК, полученные при различных временах реакции. На врезке показаны суспендированные КТ под ультрафиолетовым освещением, отмеченные как QD20M, QD40M, QD60M, QD80M, QD100M и QD120M (слева направо).

выдерживали 24 часа при 2–8°C. Бычий сывороточный альбумин в концентрации 10 мг/мл использовали для блокировки связывания и инкубировали 60 мин при постоянном перемешивании. Конъюгированные квантовые точки центрифугировали при 12000 g в течение 2 ч и собирали осадок, а затем ресуспендировали его в фосфатно-солевом буферном растворе (10.0 ммоль/л). Конечный объем доводили до 5 мл, чтобы поддерживать постоянную концентрацию комплексов «квантовые точки–антитела» на уровне 1 мг/мл.

Изготовление латерального проточного иммуноанализатора. Антималерийные антитела против белка HRP2 *P. falciparum* в концентрации 2.0 мг/мл распределяли по нитроцеллюлозной мембране в количестве 0.9 мкл/мм. Нанесенный раствор антител высушивали при 37°C в течение 2 ч. Одновременно с этим конъюгированный раствор квантовых точек с антителом распыляли на подложку для конъюгата из стекловолокна в концентрации 1.4 мкл/мм и высушивали при 37°C в течение 4 ч. Полученные полоски нарезали и собирали в латеральном проточном устройстве.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ CdTe-КД, покрытых тиогликолевой кислотой. Покрытые ТГК CdTe-квантовые точки были охарактеризованы по их поглощению и фотолюминесценции. Размер квантовых точек как функция от времени реакции рассчитывался численно из измеренных длин волн пиков фотолю-

минесценции. Конъюгация антималерийного антитела к квантовым точкам была подтверждена с помощью инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием (FTIR-спектроскопии).

На рис. 1 показаны спектры фотолюминесценции покрытых ТГК CdTe-КТ, полученных при различных временах реакции. Спектры регистрировали в диапазоне длин волн от 500 до 700 нм при комнатной температуре на спектрофотометре USB4000-XR1-ES (Ocean Optics, США) при длине волны возбуждающего света 400 нм. Интенсивность фотолюминесценции всех образцов была нормализована в целях сравнения. Как показано на рис. 1, все образцы продемонстрировали очень выраженные и достаточно симметричные пики в спектрах испускания фотолюминесценции в диапазоне от 560 нм до 590 нм. Эти эмиссионные пики возникают вследствие экситонных переходов [24, 25] и являются характерными признаками CdTe-КТ, а их достаточно симметричная гауссова форма с малой шириной на половине высоты позволяет утверждать, что суспендированные в растворе квантовые точки имеют узкое распределение по размеру.

Из рис. 1 очевидно, что по мере увеличения времени реакции пик эмиссии фотолюминесценции сдвигается в более длинноволновую область. Это достаточно хорошо коррелирует с видимой окраской раствора, как показано на врезке на рис. 1. Красное смещение пика эмиссии фотолюминесценции с увеличением времени реакции

Таблица 1. Расчетный размер CdTe-КТ, покрытых ТГК

Время реакции, мин	Положение пика фотолюминесценции, нм	D , нм
20	560	3.34
40	565	3.38
60	570	3.43
80	580	3.50
100	585	3.54
120	590	3.58

Примечание. Размер рассчитан на основе положения пика фотолюминесценции согласно уравнению (1) как функция от времени реакции.

может быть отнесено к зависящему от размера эффекту конфайнмента в квантовых точках. По мере протекания реакции в смеси растворов при температуре кипения частицы CdTe увеличиваются в размере. Следовательно, с увеличением времени реакции процесс приводит к возникновению квантовых точек большего размера из CdTe, покрытых ТГК, и соответствующая шири-

на запрещенной зоны материала квантовых точек уменьшается [24–27].

Этот сдвиг пика эмиссии фотолюминесценции был применен для оценки размера CdTe-квантовых точек, покрытых ТГК, с использованием эмпирического уравнения, выведенного авторами работы [28] через аппроксимацию экспериментальных данных полиномиальной функцией:

$$D = (9.8127 \cdot 10^{-7})\lambda^3 - (1.7147 \cdot 10^{-3})\lambda^2 + 1.0064\lambda - 194.84, \quad (1)$$

где D — средний размер КТ из образца в нанометрах, а λ — центральная длина волны первого пика экситонной эмиссии фотолюминесценции соответствующего образца. С использованием вышеприведенного уравнения был определен средний размер КТ в каждом образце и выражен как функция времени реакции в табл. 1.

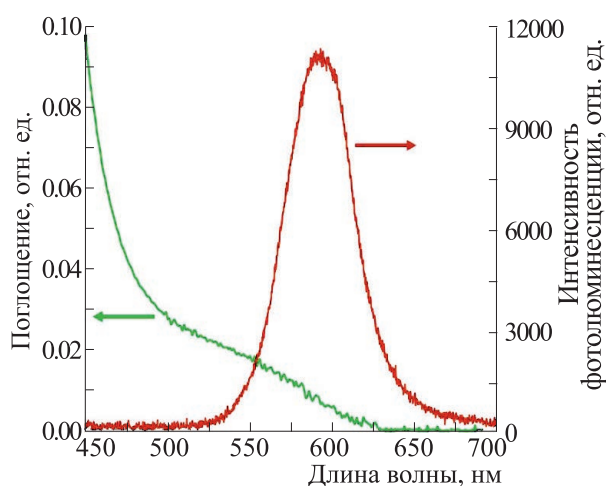


Рис. 2. Спектр поглощения и спектр фотолюминесценции свежеприготовленных CdTe-КТ, покрытых ТГК, для образца QD 120M.

Показано, что время реакции влияет на размер КТ более или менее линейно, как ясно из табл. 1, а это значит, что значительная степень управляемости размером КТ может быть достигнута путем простого контроля времени реакции.

Целью данной статьи было использовать CdTe-КТ, покрытые ТГК, для усиления чувствительности детекции систем латерального проточного иммуноанализа. Для этой цели желательно, чтобы эмиссия люминесценции в контрольной и опытной полосках под ультрафиолетовым облучением находилась как можно дальше от фиолетовой области видимого спектра. Это важно, поскольку стекловолокно, использованное в качестве матрицы для ЛПИ, демонстрирует сильное отражение света в сине-фиолетовой области, а цвет опытной и контрольной полоски должны существенно отличаться от фоновой эмиссии под ультрафиолетовым светом. Исходя из этого, для дальнейших экспериментов мы выбрали образец QD120M с CdTe-квантовыми точками, покрытыми ТГК, с максимумом эмиссии фотолюминесценции в 590 нм. Спектры поглощения образца QD120M регистрировали в диапазоне от 450 нм до 700 нм при комнатной температуре и записывали в одних осях со спектром фотолюминесценции, как показано на рис. 2. Резкое начало поглощения хорошо коррелирует с пиком эмиссии фотолюминесценции. Это подтверждает наличие ха-

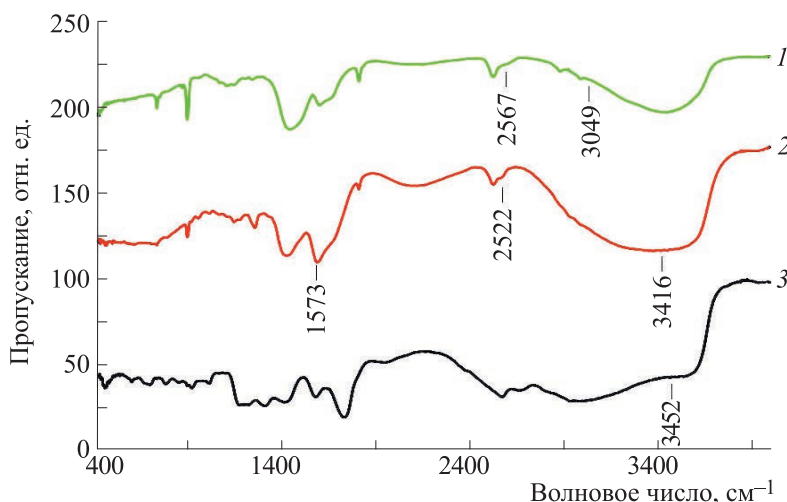


Рис. 3. FTIR-спектры, записанные для тиогликолевой кислоты (спектр 1); CdTe-КТ, покрытых ТГК (спектр 2); в) CdTe-КТ, покрытых ТГК, конъюгированных с антималярийными антителами (спектр 3).

рактерного экситонного перехода CdTe-КТ, что согласуется с литературными данными [25]. Полученные квантовые точки затем использовали для конъюгации с антималярийными антителами к белку HRP2 *P. falciparum*.

Конъюгация антималярийных антител к белку HRP2 *P. falciparum* с CdTe-КТ, покрытыми ТГК, была охарактеризована с помощью FTIR-спектроскопии и идентификации поверхностных функциональных групп на КТ. FTIR-спектры были получены с использованием спектрофотометра FTIR-8400S (Shimadzu, Япония).

На рис. 3 представлен FTIR-спектр, зарегистрированный для ТГК, CdTe-КТ, покрытых ТГК, и CdTe-КТ, покрытых ТГК, конъюгированных с антималярийными антителами против белка HRP2. На рис. 3а пики при волновых числах 2567 и 3049 указывают на наличие тиоловой ($-SH$) и карбоксильной ($-COOH$) функциональных групп соответственно [29]. FTIR-спектр CdTe-КТ образца QD120M показан на рис. 3б, пик тиоловой группы с волновым числом 2522 в этом случае значительно ослаблен, что позволяет утверждать, что тиоловая группа ТГК связана с поверхностью CdTe-КТ. Интенсивные широкие полосы при 3416 см^{-1} и 1573 см^{-1} относятся к колебаниям ($-OH$)- и ($-NH_2$)-групп соответственно [30]. Сдвиг пика карбоксильной группы с волновым числом 3416 указывает на то, что карбоксильная группа ориентирована в сторону от поверхности КТ. На рис. 3в показан FTIR-спектр CdTe-КТ, покрытых ТГК и конъюгированных с антималярийными антителами против белка HRP2 *P. falciparum*. Пик карбоксильной группы отсутствует, в то время как расширение пика ($-OH$)-группы с волновым числом 3452 указывает на образование карбодиимидной связи между

($-COOH$)-группой КТ и ($-NH_2$)-группой антител. Таким образом, мы подтвердили ковалентную связь между CdTe-КТ, покрытыми ТГК, и антималярийными антителами против HRP2-белка *P. falciparum*. Покрытые ТГК CdTe-КТ, конъюгированные с антималярийными антителами против белка HRP2 *P. falciparum*, были использованы для изготовления латеральной проточной иммуноаналитической системы, как описано выше в разделе «Экспериментальная часть», а изготовленные таким образом устройства для ЛПИ были применены для анализа и подсчета количества возбудителя малярии.

Проверка ЛПИ и количественные измерения с его помощью. Образцы крови, давшие положительный результат анализа на присутствие малярийного паразита *P. falciparum*, разводили кровью, не содержащей паразита, методом последовательных разведений, и для каждой известной концентрации паразита готовили образцы в трех повторностях. Образец крови с отрицательным результатом анализа на наличие паразита также проверяли в качестве контроля на кросс-реактивность и ложноположительные реакции. Таким образом, готовили четыре образца: i) кровь без малярийного паразита; ii) кровь с концентрацией паразитов 15 шт/мкл; iii) кровь с концентрацией паразитов 150 шт/мкл; iv) кровь с концентрацией паразитов 300 шт/мкл. Из каждого образца отбирали 5 мкл крови и наносили в лунку коммерчески доступного ЛПИ-устройства на основе коллоидного золота, а также в полученные в работе ЛПИ-устройства с CdTe-КТ, покрытыми ТГК. Затем добавляли 90 мкл промывочного раствора для облегчения движения образца через нитроцеллюлозную мембрану. Образцы, нанесенные на коммерческое ЛПИ-устройство на основе кол-

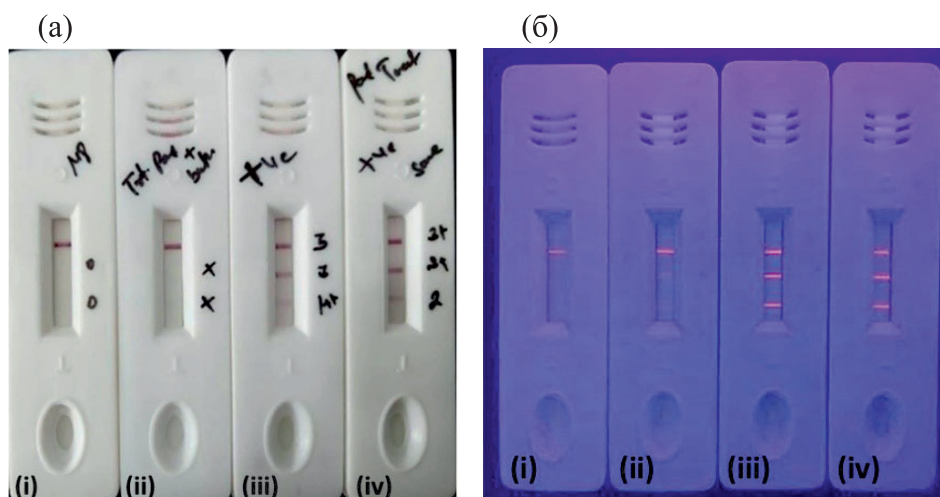


Рис. 4. Изображения ЛПИ-устройств с нанесенными образцами с известными концентрациями паразита (обозначены римскими цифрами i–iv): (a) – ЛПИ-устройство на основе коллоидного золота под нормальным белым светом; (б) – ЛПИ-устройство на основе CdTe-КТ, покрытых ТКК, под ультрафиолетовым освещением.

лоидного золота, показаны на рис. 4а, а образцы на ЛПИ-устройстве на основе полученных в работе CdTe-КТ, покрытых ТКК, – на рис. 4б. ЛПИ-устройства на основе коллоидного золота наблюдали под нормальным освещением, в то время как ЛПИ на основе CdTe-КТ, покрытых ТКК, – под ультрафиолетовым светом, чтобы визуализировать проявление контрольной и опытной линий на тест-полосках. Для количественного подсчета изображения полосок сканировали в течение 15 мин. С помощью программы LabVIEW была разработана специальная программа для обработки изображений с возможностью подсчета интенсивности контрольной и опытной линий на тест-полосках.

Для точного подсчета интенсивности контрольной и опытной линий на ЛПИ-тест-полосках выбирали интересующую нас область на изображениях, при этом и те, и другие линии выделяли с помощью прямоугольного окна выделения. Один и тот же размер интересующей нас области выбирался в контрольной и опытной линиях на всех полученных изображениях. Интенсивности контрольной и опытной линий измерялись по значениям цветов пикселей в контрольной и опытной областях с помощью правила Симпсона 3/8 с применением скрипта, написанного в LabVIEW. Использование вышеупомянутого скрипта позволило определить соотношения контрольной и опытной линий для различных концентраций паразита в обоих типах использованных ЛПИ-устройств – на основе коллоидного золота и на основе CdTe-КТ, покрытых ТКК. Эти отношения интенсивностей наносились на график как функции от концентрации паразита, что приведено на рис. 5а и 5б соответственно.

Как видно из рис. 4, ЛПИ-устройство на основе коллоидного золота имеет четкие опытные линии при концентрациях паразита 150 и 300 шт/мкл. Однако образец, соответствующий очень легкой форме инфекции, с концентрацией 15 шт/мкл, не демонстрировал опытную линию, что видно на рис. 4а, и этот результат может быть интерпретирован как ложноотрицательный результат визуального анализа. В сравнении с ним ЛПИ-устройство на основе CdTe-КТ, покрытых ТКК, показало слабую, но все же различимую опытную полосу под ультрафиолетовым излучением даже при столь малой концентрации паразита. Это может оказаться критически важным для диагностики у пациентов на самой ранней стадии инфекции.

Однако обработка изображений позволила успешно детектировать слабую красную опытную линию в интересующей нас области для образца 2 даже в случае ЛПИ-устройства на основе коллоидного золота, как было показано на рис. 5а. Другие образцы с более высокими концентрациями паразита показали очень значительные интенсивности сигналов инфекции, опытные полосы насыщаются при концентрациях более 150 шт/мкл в случае коллоидного золота, как показано на рис. 5а. С другой стороны, ЛПИ-устройства на основе КТ, покрытых ТКК, показали очень ясный рост отношения интенсивностей контрольной и опытной линий, как показано на рис. 5б. Кривая, показанная на рис. 5б, может использоваться не только для детекции малярийного паразита, но и для подсчета концентрации паразита при диагностике на месте без дополнительного сложного оборудования. Таким образом, квантовые точки, покрытые ТКК, пока-

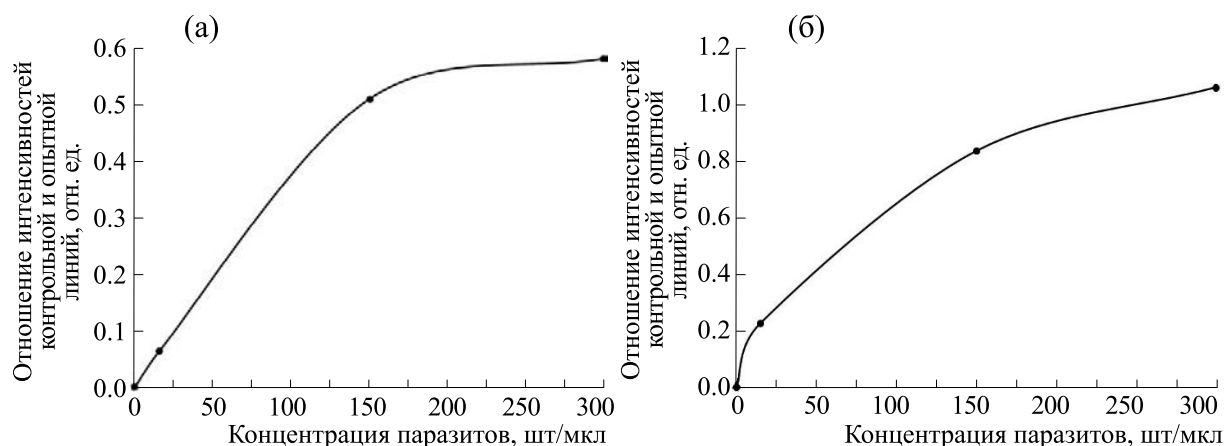


Рис. 5. Отношение измеренных интенсивностей опытной и контрольной линий для ЛПИ-устройства на основе коллоидного золота под нормальным белым светом (а) и ЛПИ-устройства на основе CdTe-КТ, покрытых ТГК, под ультрафиолетовым освещением (б).

зали многообещающие значения чувствительности при детекции малярийного паразита (*P. falciparum*) даже при очень низкой концентрации паразита, как визуально, так и после обработки изображения и количественного подсчета.

ВЫВОДЫ

В работе показаны химический путь синтеза CdTe-КТ, покрытых ТГК, и их конъюгации с антималарийными антителами против белка HRP2 из *P. falciparum*. КТ типа QD120M были выбраны из всех образцов CdTe-КТ, покрытых ТГК, для встраивания в устройства ЛПИ и последующего сравнения со стандартными ЛПИ-устройствами на основе коллоидного золота. ЛПИ-устройства на основе CdTe-КТ, покрытых ТГК, облученные ультрафиолетом, продемонстрировали значительное усиление интенсивности люминесценции и повышение чувствительности детекции малярийного паразита по сравнению со стандартными устройствами на основе коллоидного золота. Было показано, что ЛПИ-устройства на основе CdTe-КТ, покрытых ТГК, могут давать ясный сигнал даже при очень малых концентрациях паразита (15 шт/мкл). Разработанная программа для подсчета концентрации малярийного паразита на основе обработки изображения может уменьшить вероятность ложноотрицательного результата при низких концентрациях паразита и помочь в проведении ранней диагностики малярии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Департаменту науки и технологий Правительства Индии за инфраструктурную поддержку по гранту FIST, номер договора SR/FST/PS-I/2017/12.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование не получало внешнего финансирования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. X. Shi and Z. Wang, Rev. Med. Microbiol., **32** (3), 183 (2021).
2. P. Liu, Y. Zhou, M. Guo, et al., Nanoscale, **10**, 848 (2018).
3. N. H. T. Tran, K. T. L. Trinh, J. H. Lee, et al., Small, **14**, 1801385 (2018).
4. R. Fan, W. Zhang, Y. Jin, et al., Microchim. Acta, **187**, 1 (2020).
5. Y. Liang, X. Huang, R. Yu, et al., Anal. Chim. Acta, **936**, 195 (2016).
6. G. Liu, J. Zhao, S. Wang, et al., Sensors and Actuators B: Chemical, **306**, 127583 (2020).
7. S. Wang, C. Zhang, and Y. Zhang, Biosensors and Bio-detection, Ed. by A. Rasooly and K. E. Herold (Humana Press, 2009), vol. 504.
8. Y. Jeong, Y. M. Kook, K. Lee, and W. G. Koh, Biosens. Bioelectron., **111**, 102 (2018).
9. S. M. Fothergill, C. Joyce, and F. Xie, Nanoscale, **10**, 20914 (2018).
10. G. A. Posthuma-Trumpie, J. Korf, and A. Van Amerongen, Anal. Bioanal. Chem., **393**, 569 (2009).
11. X. Gao, L. P. Xu, S. F. Zhou, et al., Am. J. Biomed. Sci., **6**, 41 (2014).

12. I. Y. Goryacheva, P. Lenain, and S. De Saeger, *Trends Analyt. Chem.*, **46**, 30 (2013).
13. O. A. Aladesuyi and O. S. Oluwafemi, *Nano-Structures & Nano-Objects*, **24**, 100568 (2020).
14. Z. Li, P. Huang, J. Lin, et al., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **10**, 4859 (2010).
15. Z. Wang, J. Ruan, and D. Cui, *Nanoscale Res. Lett.*, **4**, 593 (2009).
16. D. Cui, B. Pan, H. Zhang, et al., *Anal. Chem.*, **80**, 7996 (2008).
17. M. Sajid, A. N. Kawde and M. Daud, *J. Saudi Chem. Soc.*, **19**, 689 (2015).
18. H. Yang, D. Li, R. He, et al., *Nanoscale Res. Lett.*, **5**, 875 (2010).
19. J. Zhang, Y. Wei, S. Qiu, and Y. Xiong, *Spectrochim. Acta, Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, **247**, 119107 (2021).
20. U. Resch, H. Weller, and A. Henglein, *Langmuir*, **5**, 1015 (1989).
21. T. Lu, K. D. Zhu, C. Huang, et al., *Analyst*, **145**, 76 (2020).
22. *World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges* (World Health Organization, Geneva, 2020). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, <https://www.who.int/publications/i/item/9789240015791>.
23. D. Bell, C. Wongsrichanalai, and J. W. Barnwell, *Nat. Rev. Microbiol.*, **4**, 682 (2006).
24. A. L. Rogach, L. Katsikas, A. Kornowski, et al., *Ber Bunsen Phys Chem.*, **101**, 1668-70 (1997).
25. N. Liu and P. Yang, *Luminescence*, **29** (6), 566 (2014).
26. S. Subramanian, S. Ganapathy, M. Rajaram, and A. Ayyaswamy, *Materials Chemistry and Physics*, **249**, 123127 (2020).
27. R. Carcione, F. Limosani, and F. Antolini, *Crystals*, **11** (3), 253 (2021).
28. W. W. Yu, L. Qu, W. Guo, and X. Peng, *Chem. Mater.*, **15**, 2854 (2003).
29. T. Kondratenko, O. Ovchinnikov, I. Grevtseva, et al., *Materials*, **13**, 909 (2020).
30. J. Tashkhourian, G. Absalan, M. Jafari, and S. Zare, *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, **152**, 119 (2016).

Luminescent Diagnostics and Quantitative Assessment of Malaria Based on a Lateral Flow Immunoassay with CdTe Quantum Dots

H. Chauhan*, A. Jariwala*, and V. Kheraj*

*Department of Physics, Sardar Vallabhbhai National Institute of Technology (SVNIT), Surat 395007, Gujarat, India

A lateral flow immunoassay (LFI) is a simple, low-cost and rapid diagnostic tool to identify various diseases by detecting analytes such as antibodies, parasites, or other relevant biomarkers. However, most LFIs can only confirm the presence or absence of a target analyte being applied as qualitative diagnostic tools. In addition, the conventional LFIs, which require visual inspection of the test line, may demonstrate insufficient sensitivity for the mild form or early detection of infections and for this reason, the result can be falsely negative. This study presents the results of employing thioglycolic acid capped CdTe quantum dots as a probe to enhance luminescence and subsequently detection sensitivity in LFIs for diagnosis of malaria. The chemical route synthesis of thioglycolic acid capped CdTe quantum dots was optimized systematically by probing optical properties of the quantum dots. These optimized quantum dots of thioglycolic acid capped CdTe have been conjugated with the anti-malaria antibodies against HRP2 protein (*P. falciparum*) and were then incorporated into LFIs. Further, an image processing code has been developed to carry out the quantification of malaria parasites in terms of the ratio on intensities of control and test lines on the LFIs. The results have been compared with those obtained using the standard, colloidal gold based LFIs. It has been demonstrated that sensitivity and lower detection limits of malaria under low parasite concentration increase significantly due to enhanced luminescence of control and test lines under UV light, owing to the presence of thioglycolic acid capped CdTe quantum dots. It has also been shown that the image processing based quantification of malaria will likely minimize the chances of false negative results under low parasite concentration and assist in early diagnosis of malaria.

Keywords: CdTe, quantum dots, nanotechnology, lateral flow immunoassay, malaria, diagnostics