



"ЛАБОРАТОРИЯ НА ЧИПЕ". МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКА ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Т.Зимина, к.ф.-м.н., В.Лучинин, д.т.н.* / cmid_leti@mail.ru

Микробиологическая экспресс-диагностика, включая определение чувствительности бактерий к антибиотикам, актуальна в связи с ростом числа и распространностью бактериальных инфекций. Автоматизированные портативные "лаборатории на чипе", обеспечивающие оперативные выращивание, анализ и оценку антибиотикорезистентности колоний патогенных бактерий, создают предпосылки к успешной борьбе с распространением устойчивых штаммов таких бактерий, определению их вида и выбору эффективной терапии.

Aнализ бактериальных инфекций, как правило, занимает нескольких суток, что не всегда приемлемо и диктует необходимость разработки новых методов оперативной диагностики. Перспективной является реализация "лабораторий на чипе" в составе портативных аналитико-диагностических систем, позволяющих ускорить анализ в десятки раз, т.е. уменьшить его продолжительность до 6–8 ч. Такие портативные системы должны функционировать как в лабораторных, так и в полевых условиях и интегрироваться в рамках современных инфокоммуникационных систем. "Лаборатории на чипе" должны легко перенастраиваться для работы с различным клиническим материалом, обеспечивать возможность оценки бактериальной обсемененности внешней среды и осуществлять поиск возбудителей различных инфекций: респираторных, желудочно-кишечного тракта, урогенитального тракта, внутрибольничных и др.

В настоящей статье представлены базовые принципы и предложения по созданию миниатюрных систем микробиологической экспресс-диагностики, которые обеспечивают выращивание, анализ и оценку антибиотикорезистентности колоний патогенных бактерий. Фактически девизом может стать положение: "От чашки Петри

LAB-ON-A-CHIP. MICROBIOLOGICAL EXPRESS DIAGNOSTICS OF PATHOGENIC BACTERIA

T.Zimina, Ph.D., V.Luchinin, D.Sc.* / cmid_leti@mail.ru

Microbiological express diagnostics, including determination of sensitivity of bacteria to antibiotics, is very topical because of the growing number and prevalence of the bacterial infections. Development of portable "laboratories on chip", which ensure cultivation, analysis and estimation of the antibiotic-resistance of the colonies of pathogenic bacteria with minimal time costs and high degree of automation create preconditions for a successful struggle against the spread of the stable strains of such bacteria, identification of their species and selection of an effective therapy.

As a rule, analysis of the bacterial infections takes several days, which is not always acceptable and dictates necessity to develop new methods of the on-line diagnosis. Very promising is realization of the "laboratories on chip" incorporated into portable analytical-diagnostic systems and allowing us to accelerate an analysis in dozens of times and reduce its duration up to 6–8 hours. Such portable systems should function both in laboratories and in the field, and be integrated into modern information-communication systems. "Laboratories on chip" should be adjusted easily to the work with various clinical materials, ensure feasibility of evaluation of the bacterial content per volume of the environment and search for various infectious agents causing respiratory, gastrointestinal, urogenital, hospital-acquired and other diseases.

This article presents the basic principles and proposals concerning the development of microsized systems of microbiological express diagnostics, which ensure cultivation, analysis and estimation of antibiotic-resistance of the colonies of pathogenic bacteria. Actually its motto can be: "From Petri Cup to nanomatrixes of porous anode aluminum oxide".

PROBLEMS OF MICROBIOLOGICAL EXPRESS DIAGNOSTICS

Analysis of the microbiological tests includes isolation of the microbial cells, accumulation of a biomass and

* С.-Петербургский электротехнический университет им. В.И. Ульянова (Ленина) «ЛЭТИ»

* S.-Petersburg Electrotechnical University named after V.I.Ulyanov (Lenin) (LETI)



к наноматрицам пористого анодного оксида алюминия".

ПРОБЛЕМЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ

Анализ микробиологических проб включает изоляцию микробных клеток, накопление биомассы и идентификацию штаммов таких клеток, определение их количества и чувствительности к антибиотикам. Это необходимо для диагностики инфекционных заболеваний и назначения антибактериальной терапии. Проблема особенно актуальна в связи с ростом заболеваемости населения инфекционными бактериальными заболеваниями и увеличением числа устойчивых штаммов патогенных бактерий. Традиционное микробиологическое исследование трудоемко, длительно (2–7 дней) и может проводиться только в специализированных учреждениях.

Работы по созданию экспрессных методов микробиологического анализа ведутся в целом ряде лабораторий. Известны автоматические и полуавтоматические инструментальные способы микробиологического анализа, реализуемые с помощью стационарных приборов, однако они продолжительны и требуют первичного накопления клеток. Сравнение характеристик промышленных приборов и описанных в настоящей статье устройств приведено в таблице.

Наиболее длительной стадией культурального микробиологического анализа является выращивание микроорганизмов на питательных средах. Именно этот этап требует усовершенствования для повышения скорости анализа. Длительность его определяется необходимостью накопления видимых колоний с явными характеристиками (рис.1). После первичного инкубирования и накопления материал вручную отбирается для дальнейших исследований, включающих идентификацию, выделение и накопление чистой культуры патогена,

identification the strains of such cells, and determination of their quantity and sensitivity to antibiotics. This is necessary for diagnostics of the infectious diseases and prescription of an antibacterial therapy. The problem is especially important in connection with the growing number of the diseases caused by bacteria and an increase of the number of stable strains of the pathogenic bacteria. The traditional microbiological examination is labor-consuming, takes too much time (2–7 days) and can be done only in special establishments.

The work for development of the express-methods of a microbiological analysis is going on in a number of laboratories. Well-known are automatic and semi-automatic instrumental methods of microbiological analysis implemented with the help of stationary devices, however, they are time-consuming and require a primary accumulation of cells. Comparison of the characteristics of the industrial devices and descriptions are given in the Table.

The longest stage of a culture microbiological analysis is cultivation of microorganisms in nutrient media. Exactly this stage demands improvement, if we are to increase the speed of the analysis. Its duration is determined by the necessity of accumulation of the visible colonies with obvious characteristics (fig.1). After its primary incubation and accumulation, the material is selected manually for the further research work, including identification, isolation and accumulation of a pure pathogen culture, and also for testing its sensitivity to antibiotics.

Well-known is a semi-automatic method of a microbiological analysis (column 2 of the Table), which envisages inoculation of biological samples in Petri cups with a nutritious medium, incubation of samples for accumulation of the colonies of the microbial cells, isolation of certain colonies and examination of their sensitivity to antibiotics by the method of Kirby-Bauer.

Many operations are done manually, which reduces considerably the speed of the process. The applied incubator is expensive and has big dimensions, therefore the method is not applicable outside of large laboratories. Besides, the

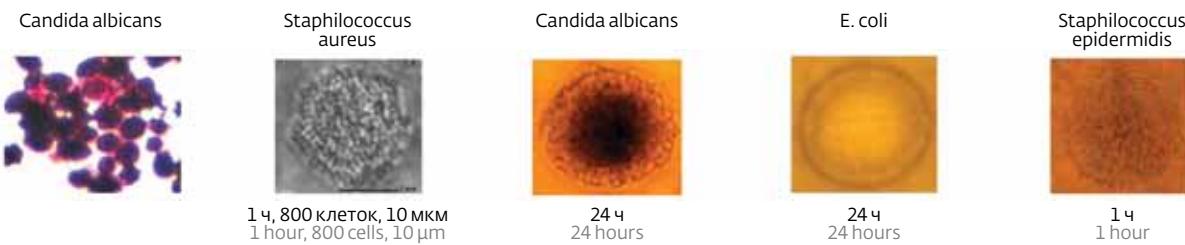


Рис.1. Клетки и колонии патогенов
Fig.1. Cells and colonies of pathogens



Сравнение характеристик систем микробиологического анализа и разрабатываемой "лаборатории на чипе"
Comparison of the characteristics of the systems for microbiological analyses and the developed lab-on-a-chip

Характеристики прибора Characteristics of the devices	Способ Кирби–Бауэра Method of Kirby–Bauer	Автоматический прибор VITEK 2 compact 60 Automatic device VITEK 2 compact 60	"Лаборатория на чипе" Lab-on-a-chip
Состав измерительного комплекса Composition of the measuring complex	Чашки Петри с питательной средой, набор дисков, импрегнированных антибиотиками, микробиологический инкубатор с охлаждением KB-23 (Binder, Германия), биологический микроскоп Petri cups with a nutrient medium, a set of disks impregnated with antibiotics, a microbiological incubator with cooling KB-23 (Binder, Germany), and a biological microscope	Считывающий прибор, одноразовые карточки для анализа микробных клеток, персональный компьютер A reading device, disposable cards for the analysis of the microbial cells, personal computer	Портативный автоматический считающий прибор с модулями пробоподготовки, инкубирования и роста бактерий, идентификации, определения жизнеспособности, микроКомпьютером, а также системами навигации и связи A portable automatic device with the modules of sample preparation, incubation and growth of bacteria, identification, determination of viability and also with navigation and communication systems
Условия эксплуатации Service conditions	Специализированная лаборатория (ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025-2000) Specialized laboratory (GOST R ISO/MEK 17025-2000)	Специализированная лаборатория (ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025-2000) Specialized laboratory (GOST R ISO/MEK 17025-2000)	Автономные условия, не требуется аккредитация по ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025-2000 Autonomous conditions, accreditation in accordance with GOST R ISO/MEK 17025-2000 is not required
Назначение Purpose	Исследование чувствительности микроорганизмов к антибиотикам Examination of sensitivity of microorganisms to antibiotics	Идентификация бактерий и дрожжей. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам Identification of bacteria and yeast. Determination of sensitivity of microorganisms to antibiotics	Обработка проб, создание условий для роста микроорганизмов, дифференциация и учет их количества, определение чувствительности микроорганизмов к препаратам Processing of samples, creation of conditions for the growth of microorganisms, differentiation and account of their quantity, determination of sensitivity of microorganisms to preparations
Способ считывания информации по идентификации Method of reading information by identification	Отсутствует Not available	Колориметрия Colorimetry	Распознавание образов по трем и более признакам Recognition of images by three and more signs
Считывание информации по чувствительности к антибиотикам Reading of information on sensitivity to antibiotics	Ручной способ измерения просвета вокруг дисков, импрегнированных антибиотиками с помощью линейки Manual method of measurement of the gap around the disks, impregnated by means of a ruler	Турбидиметрия Turbidimetry	Микротурбидиметрия, положение границы в микроканале: видеокамера, распознавание образов Microturbidimetry, position of a border in a microchannel: videocamera, recognition of images
Габариты, мм Dimensions, mm	433×516×618	590×715×6725	<150×200×200
Вес, кг Weight, kg	44	75	<3
Мощность, Вт Power, W	340	1025	30
Количество модулей Number of modules	3	2	1
Уровень автоматизации Level of automation	Низкий Low	Высокий High	Высокий High



Характеристики прибора Characteristics of the devices	Способ Кирби–Бауэра Method of Kirby–Bauer	Автоматический прибор VITEK 2 compact 60 Automatic device VITEK 2 compact 60	"Лаборатория на чипе" Lab-on-a-chip
Производительность, образцов/сутки Productivity, samples/day	40	60	20
Время одного анализа, ч Time required for one analysis, h	48–72	26–34	6–8
Идентификация Identification	Не производится Not available	До вида Up to a species	До вида Up to a species
Количество антибиотиков Number of antibiotics	6 (на одну чашку Петри) 6 (per one Petri cup)	20	20
Достоверность, % Reliability, %	95	90	90
Гибкость переналадки Flexibility of readjustment	Да Yes	Нет No	Да Yes
Эксплуатационные расходы на пробу, руб. Operating costs per one sample, rubles.	1000	1000	350

а также постановку теста на чувствительность к антибиотикам.

Известен полуавтоматический метод микробиологического анализа (колонка 2 таблицы), в котором используется посев биологических образцов в чашки Петри с питательной средой, инкубация проб для накопления колоний микробных клеток, выделение отдельных колоний и исследование их чувствительности к антибиотикам по методу Кирби–Бауэра. Многие операции проводятся вручную, что существенно снижает скорость процесса. Применяемый инкубатор имеет высокую стоимость и большие габариты, поэтому метод принципиально не подходит для работы вне крупных лабораторий. Кроме того, данный метод фактически непригоден для автоматизации и требует значительного количества расходных материалов.

Микробиологический анализатор VITEK 2 Compact 60 французской фирмы bioMérieux (колонка 3 таблицы) проводит автоматическую идентификацию патогенных микробных клеток и определение их чувствительности к антибиотикам на отдельных микробиологических карточках для каждого типа анализов. Для работы требуется предварительное накопление и выделение штамма патогенной бактерии. Время анализа составляет, по данным производителя оборудования, до одних суток, а с учетом предварительного накопления патогенных микробных клеток занимает двое и более суток. Этот стационарный и дорогостоящий прибор предназначен в первую очередь для крупных централизованных

given method is actually unsuitable for automation and demands a considerable amount of active storage.

VITEK 2 Compact 60 microbiological analyzer from French company bioMérieux (column 3 of the Table) identifies the pathogenic microbial cells automatically and determines their sensitivity to antibiotics on separate microbiological cards for each type of analyses. For its operation a preliminary accumulation and isolation of the strain of the pathogenic bacteria are required. According to the manufacturer of the equipment, the period of analysis is about one day, and with account of the preliminary accumulation of the pathogenic microbial cells it takes two and more days. This stationary and expensive device is intended, first of all, for big centralized microbiological laboratories. In this device the preliminary accumulation and sorting of the cells with isolation of the pathogenic or diagnostically significant strains are not automated. Thus, this device cannot solve the above tasks.

Achievements in nano- and microtechnologies, and miniaturization in the instrumental analysis opened new prospects for development of lab-on-a-chip microanalytical systems of a new generation. These are micro-sized hybrid devices manufactured with application of 2D and 3D technologies. Development of such systems allows us to lower the material- and energy intensity of the products, their costs and to raise the productivity of the analysis.

Micro - and nanotechnologies ensure precision shaping and geometrical complementarity of components at a molecular level, an increase without additional costs of the speed of analysis, and also control of mass-transfer and an automatic microscale control of the stages of analysis



микробиологических лабораторий. В приборе не автоматизированы предварительное накопление и сортировка микробных клеток с выделением патогенных или диагностически значимых штаммов. Таким образом, этот прибор не позволяет решать поставленные выше задачи.

Достиженияnano- и микротехнологий и миниатюризация в инструментальном анализе открыли возможности создания нового поколения микронализитических систем "лаборатории на чипе" (lab-on-a-chip), представляющих собой миниатюрные гибридные устройства, изготавляемые с помощью 2D- и 3D-технологий. Разработка таких систем позволяет снизить материало- и энергоемкость изделий, их стоимость, повысить производительность анализа. Микро- и нанотехнологии обеспечивают прецизионное формообразование и геометрическую комплементарность компонентов на молекулярном уровне, повышение без дополнительных затрат скорости анализа, а также управление массопереносом и автоматическое регулирование в микромасштабе стадий анализа в интегрированных функциональных модулях и подсистемах. Перенос биологических объектов может осуществляться с помощью проточного анализа с использованием микрофлюидики.

При современном методе культивирования и анализа индивидуальных культур клеток, после предварительной очистки пробы они помещаются в ростовые ячейки для одновременного роста при заданных условиях (влажность, температура, состав жидкой среды) с получением индивидуальных микроколоний. Метод реализуется с применением ячеек очень малого размера, сформированных с помощью микротехнологий, чтобы обеспечить рост индивидуальных клеток, размер которых сопоставим с размером ростовой зоны. Суспензия клеток помещается в ростовые зоны после разделения на отдельные достаточно малые объемы для обеспечения роста гомогенной культуры в каждом объеме. После этого проводится их посев и инкубирование в отдельных микролунках, имеющих цилиндрическую форму и отделенных друг от друга расстоянием не менее 1,8 мм. Общая для всех индивидуальных микроколоний поверхность между микролунками имеет водонепроницаемое покрытие. Во время инкубирования к культурам поступают необходимые питательные вещества через мембранные с размером пор от десятков нанометров до единиц микрон. Однако в данном способе не решена задача быстрого отделения индивидуальных микроколоний и их переноса во внешние устройства идентификации и сортировки. Метод сложен и не приспособлен для экспресс-анализа, а соответствующее устройство не может

in the integrated functional modules and subsystems. Transfer of biological objects can be carried out by means of a flowing analysis with the use of microfluids.

A modern method of cultivation and analysis of individual cultures of cells envisages the following: after a preliminary cleaning of samples they are placed into the growth cells for a simultaneous growth in certain conditions (humidity, composition of the liquid environment) with obtaining of individual microcolonies. The method is realized with application of cells of very small size generated by means of microtechnologies in order to ensure growth of the individual cells, the size of which is comparable with the size of the growth zones.

Suspension of the cells is placed into the growth zones after division into separate rather small volumes in order to ensure growth of a homogeneous culture in each volume. After that they are placed and incubated in separate microcups of cylindrical form and separated from each other by the distance not less than 1.8 mm. The surface common for all the individual microcolonies between the microcups has a water-repellent covering.

During the incubation period the cultures are supplied with the necessary nutrients through the membranes with the sizes from tens of nanometers up to units of microns. However in the given method the problem of a quick separation of individual microcolonies and their transfer to the external devices for identification and sorting is not solved. The method is complicated and not adapted to an express analysis, and the corresponding device cannot be used in a portable form because of its complex design and low durability of the dosers. The design does not envisage isolation and identification of the pathogenic strains for the purpose of their accumulation and examination of sensitivity to the antibacterial preparations.

The most promising is the method employing a plate from a porous anode aluminum oxide, on the surface of which zones for the growth of microorganisms are formed. These zones are limited by the walls of a polymeric net, which is formed by lamination with subsequent photolithography and plasma etching. Due to the capillary force the nutritive solution filters through the pores coupled with an agar layer of the plate from porous anode aluminum oxide.

Then the microbial cells are moved manually and are distributed by the growth zones. Incubation is implemented at 37°C or in other required anaerobic conditions with a supervision of the growth of the colonies by means of a microscope. After achievement of the sufficient size the colonies of microbial cells are separated from the zones of growth and manually transferred to the external means of identification. The main drawbacks of the method are manual operations of transfer of the cells

использоваться в портативном приборе из-за сложной конструкции и низкой прочности дозаторов. Конструкция не предусматривает выделение и идентификацию патогенных штаммов с целью их накопления и исследования чувствительности к антибактериальным препаратам.

Наиболее перспективным представляется метод с использованием пластины из пористого анодного оксида алюминия, на поверхности которой сформированы зоны для роста микроорганизмов. Эти зоны ограничены стенками полимерной сетки, которая образована ламинарированием с последующей фотолитографией и плазменным травлением. Питательный раствор просачивается за счет капиллярных сил через поры сопряженной со слоем агар-агара пластины из пористого анодного оксида алюминия. Далее микробные клетки подаются вручную и распределяются по зонам роста. Инкубация проводится при 37°C или иных заданных анаэробных условиях при наблюдении за ростом колоний с помощью микроскопа. После достижения достаточного размера, колонии микробных клеток отсоединяются от зон роста и вручную переносятся во внешние средства идентификации. Основные недостатки метода – ручное выполнение операций подачи клеток в зоны роста, "отсоединения" выросших колоний и их переноса в средства идентификации.

МИКРОАНАЛИТИЧЕСКИЕ ПРИБОРЫ НА ОСНОВЕ ПОРИСТОГО АНОДНОГО ОКСИДА АЛЮМИНИЯ

Рассмотрим конструкцию портативного анализатора (рис.2а) и предложенный для "лаборатории на чипе" метод выращивания колоний микробных клеток, который позволяет создать условия для выращивания, отрыва и переноса микроколоний. Для его осуществления использовался пористый анодный оксид алюминия.

Чип (рис.2б) для микробиологического экспресс-анализа имеет следующие конструктивно-технологические особенности:

- подача питательного раствора в зоны роста колоний микробных клеток выполняется снизу вверх за счет перепада давления через отверстия в пластине и пористые мембранны (рис.3). Такое решение позволяет контролировать величину подачи, а также автоматизировать процесс (например, используя насос);
- суспензия микробных клеток автоматически насосом подается на верхнюю поверхность пластины и равномерно распределяется в зонах роста;
- условия для роста микроорганизмов в виде колоний создаются при жестком контроле параметров

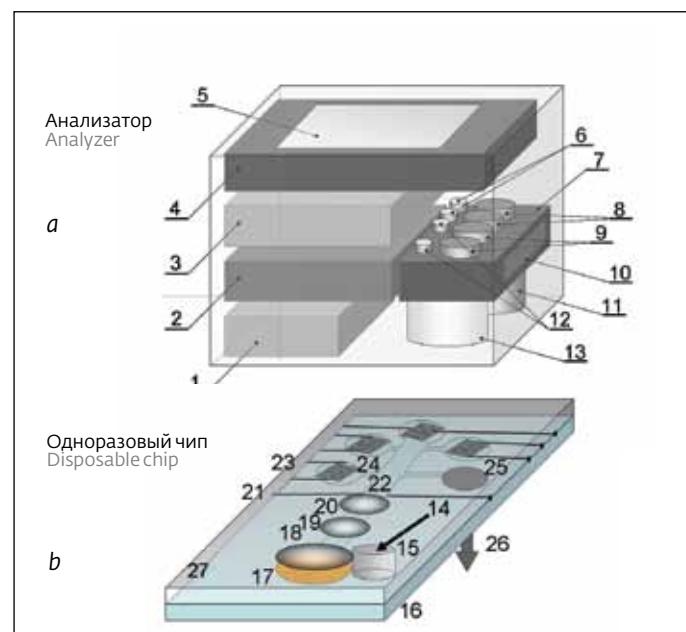


Рис.2. Конструкция портативного анализатора для микробиологического экспресс-анализа:

a) 1 – источник питания; 2 – модуль управления; 3 – модули беспроводной связи и памяти; 4 – компьютер; 5 – монитор; 6 – резервуар для образцов; 7 – инкубатор; 8 – сенсоры; 9 – КМОП-сенсор; 10 – порт для лаборатории на чипе; 11 – контейнеры для реагентов и слива; 12 – полупроводниковые источники излучения; 13 – микронасос;

b) 14 – входной резервуар для образцов; 15 – модуль для предварительной обработки проб; 16 – база; 17 – ростовая платформа; 18 – оптическое окно для безлинзового мониторинга КМОП-сенсором; 19 – оптическое окно с линзой; 20 – оптическое окно с фильтром; 21 – электроды для измерения импеданса; 22 – канал для транспорта колоний; 23 – электроды для тестирования жизнеспособности клеток; 24 – матрица лунок для тестирования жизнеспособности клеток; 25 – контейнер для слива; 26 – безопасный слив; 27 – крышка

Fig.2. Design of the portable analyzer for the microbiological express analyses: a) 1 – power source; 2 – control module; 3 – modules of wireless communication and memory; 4 – computer; 5 – monitor; 6 – reservoir for the samples; 7 – incubator; 8 – sensors; 9 – CMOS-sensor; 10 – port for the lab-on-a-chip; 11 – containers for the reagents and discharge; 12 – semiconductor sources of radiation; 13 – micropump; b) 14 – input reservoir for samples; 15 – module for preliminary processing of samples; 16 – base; 17 – growth platform; 18 – optical window for a no-lens monitoring by a CMOS-sensor; 19 – optical window with a lens; 20 – optical window with a filter; 21 – impedance measuring electrodes; 22 – channel for transfer of colonies; 23 – electrodes for testing of the cells' viability; 24 – matrix of cups for testing of the cells' viability; 25 – discharge container; 26 – safe discharge; 27 – lid

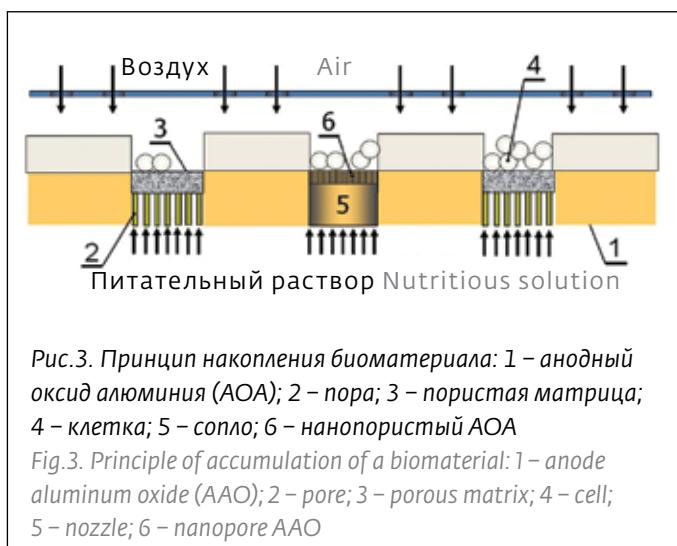


Рис.3. Принцип накопления биоматериала: 1 – анондый оксид алюминия (ААО); 2 – пора; 3 – пористая матрица; 4 – клетка; 5 – сопло; 6 – нанопористый ААО

Fig.3. Principle of accumulation of a biomaterial: 1 – anode aluminum oxide (AAO); 2 – pore; 3 – porous matrix; 4 – cell; 5 – nozzle; 6 – nanoporous AAO

среды (температуры, влажности, парциального давления кислорода);

- выполняется постоянное наблюдение за ростом колоний;
- гидрофобная пленка на поверхности пластины с отверстиями препятствует прикреплению к ней микроорганизмов, которые будут задерживаться зонами роста с повышенной концентрацией подаваемых снизу питательных веществ;
- при достижении размера 100–1000 клеток микроколонии без механических повреждений отрываются от зон роста гидроударом и в потоке переносятся во внешние средства идентификации. Используемые режимы позволяют автоматизировать отрыв колоний для их последующего переноса.

Предлагаемый способ обеспечивает соизмеримость зон роста и микроколоний, предполагая выделение чистой культуры микроорганизмов. Контроль подачи питательной среды сочетается с контролем роста колоний *in situ*.

Образование зон роста в отверстиях пористой пластины размещением в них мембран и нанесением покрытия позволяет быстро выращивать колонии без ограничения этих зон. Мембранны играют роль барьеров, задерживающих клетки в зонах роста после подачи суспензии. Отверстия в пластине выполнены в виде цилиндров с гладкими стенками ортогонально большой плоскости пористой пластины и топологически кодированы, что позволяет усовершенствовать манипулирование колониями и наблюдение за их ростом. Топологическое кодирование отверстий упрощает наблюдение посредством цифровой видеокамеры. Цилиндрическая форма отверстий и их ортогональное расположение обеспечивают снижение энергетических затрат для отрыва колоний при гидроударе. Отверстия выполнены

into the zones of growth, separation of the colonies and their transfer to the means of identification.

DEVELOPMENT OF MICROANALYTICAL DEVICES ON THE BASIS OF POROUS ANODE ALUMINUM OXIDE

Let us see the design of a portable analyzer (fig.2a) and proposed for the lab-on-a-chip method of growing colonies of microbial cells, which allows us to create conditions for cultivation, separation and transfer of the microcolonies. For its realization porous anode aluminum oxide was used.

The chip (fig.2b) for the microbiological express analysis has the following design-technological specific features:

- The supply of a nutritive solution to the zones of growth of colonies of the microbial cells is carried out from below upwards due to a differential pressure through the apertures in the plate and porous membranes (fig.3). Such a solution allows us to control the volume of supply and also to automate the process (using a pump, for example);
- Suspension of the microbial cells is automatically pumped to the top surface of the plate and distributed evenly in the growth zones;
- The conditions for the growth of the microorganisms in the form of colonies are created under a strict control of the parameters of the environment (humidity, partial pressure of oxygen);
- Constant supervision of the growth of the colonies is carried out;
- The waterproof film on the surface of the plate with apertures prevents attachment to it of microorganisms, which will be detained by the zones of growth with a higher concentration of the nutritive substances supplied from below;
- When the size of 100–1000 of the cells is achieved, the microcolonies without any mechanical damage are separated from the zones of growth by a hydroblow and with a stream are transferred to the external means of identification. The applied modes allow us to automate the separation of the colonies for their subsequent transfer.

The proposed method ensures a commensurability of the zones of growth and microcolonies, envisaging isolation of a pure culture of microorganisms. The control of supply of a nutrient medium is combined with the control of the growth of colonies *in situ*. Formation of the zones of growth in the apertures of the porous plate by placing of membranes in them and deposition of a coating allows us to grow up colonies quickly without limiting of these zones. The membranes play the role of the barriers detaining the cells in the zones of growth after a suspension is supplied.

The apertures in the plate are made in the form of cylinders with smooth walls orthogonal to the big plane



в виде сопел, определяющих скорость потока и его однородность. Возможно регулирование размера сопла и конфигурации мембраны, поддерживающей колонии микроорганизмов. Размер пор мембранные, не пропускающих микробные клетки, обеспечивает стерильность нижней емкости, что обуславливает одноразовое использование устройства.

Таким образом, описанное миниатюрное устройство обеспечивает автоматизацию подачи питательного раствора, отделения и переноса колоний бактерий.

МОБИЛЬНОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ

Итак, авторами предложены конструкция микронализитического прибора и способ выращивания колоний микробных клеток, которые имеют следующие особенности:

- подача питательного раствора снизу вверх через пористую пластину из анодного оксида алюминия в сформированные на ее верхней поверхности зоны роста колоний клеток;
- подача микробных клеток на верхнюю поверхность пористой пластины из анодного оксида алюминия;
- создание контролируемых условий роста колоний;
- наблюдение за ростом колоний;
- отсоединение колоний микробных клеток от зон роста и перенос их во внешние средства идентификации.

Способ реализован в устройстве, содержащем пористую пластину из анодного оксида алюминия со сформированными на ее верхней поверхности зонами роста колоний. Нижняя поверхность пластины сопряжена с устройством для выращивания колоний микробных клеток при подаче питательного раствора. Мембранные изготовлены из анодного оксида алюминия, а крышка верхней емкости снабжена центральным окном с закрепленным в нем оптическим стеклом для наблюдения за ростом колоний.

Создание миниатюрных мобильных устройств для экспресс-идентификации патогенов и определения их чувствительности к антибиотикам с использованием "лаборатории на чипе" позволяет оперативно выбирать тактику лечения инфекционных заболеваний, повысить ее эффективность, децентрализовать микробиологический анализ, сделав его доступным для населения, в том числе удаленных районов. Низкая стоимость и доступность анализа создают предпосылки для повышения оперативности лабораторной диагностики при обнаружении и лечении инфекционных заболеваний. ■

of the porous plate and they are topologically coded, which allows us to improve manipulation of the colonies and observation of their growth. The topological coding of the apertures simplifies observation by means of a digital videocamera. The cylindrical form of the apertures and their orthogonal arrangement ensures saving of power during separation of the colonies with a hydroblow.

The apertures are made in the form of nozzles, which determine the speed of a stream and its uniformity. Adjustment is possible of the size of the nozzles and of the configuration of the membrane supporting the colonies of microorganisms. The size of the pores of the membranes, which do not let through the microbial cells, ensures sterility of the bottom capacity because of a disposable type of the device. Thus, the described microsized device ensures automation of supply of a nutritive solution, separation and transfer of the colonies of bacteria.

MOBILITY AND FUNCTIONALITY

So, the authors offer a design of a microanalytical device and a method of cultivation of colonies of microbial cells, which have the following specific features:

- Supply of a nutritive solution from below upwards through a porous plate from anode aluminum oxide to the formed on its top surface zones of the growth of the colonies of cells;
- Supply of the microbial cells to the top surface of the porous plate from anode aluminum oxide;
- Creation of controllable conditions for the growth of the colonies;
- Supervision of the colonies' growth;
- Detachment of the colonies of the microbial cells from the zones of growth and their transfer to the external means of identification.

The method is implemented in a device containing a porous plate from anode Al_2O_3 with zones formed on its top surface for the growth of colonies. The bottom surface of the plate is coupled with the device for cultivation of the colonies of microbial cells with supply of a nutritive solution. The membranes are made from anode Al_2O_3 and the cover of the top capacity is supplied with a central window with an optical glass fixed in it for a supervision of the growth of the colonies.

Development of microsized mobile devices for an express identification of pathogens and determination of their sensitivity to antibiotics with the lab-on-a-chip allows to choose operatively the tactics for treatment of infectious diseases, to raise its efficiency, to decentralize the analysis, making it affordable for the population, including in the remote areas. The low cost and availability of the analysis create preconditions for increasing the efficiency of the diagnostics during detection and treatment of the infectious diseases. ■

