

МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ВИРУСОВ И БИОСЕНСОРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

© 2019 г. О.И. Гулий*, **, Б.Д. Зайцев***, О.С. Ларионова**, И.А. Бородина***

**Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
410049, Саратов, просп. Энтузиастов, 13*

***Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова,
410012, Саратов, Театральная пл., 1*

****Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН,
410019, Саратов, ул. Зеленая, 38*

E-mail: guliy_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 13.03.2019 г.

После доработки 13.03.2019 г.

Принята к публикации 03.09.2019 г.

Приводится краткий обзор современных методов обнаружения вирусов, в том числе на примере бактериофагов. Уделено внимание скрининговым методам для определения вирусов при анализе большого количества образцов, которые позволяют избежать серьезных затрат при детекции вирусов. Одним из наиболее востребованных направлений в микробиологии является разработка биосенсорных методов определения вирусов, в том числе на основе методов электрофизического анализа. Интерес к биосенсорным системам для обнаружения вирусов в водных растворах обусловлен их простотой, быстротой, экономичностью и относительно высокой чувствительностью. Показана перспективность применения электроакустических датчиков при разработке биосенсорных методов определения вирусов.

Ключевые слова: детекция вирусов, бактериофаги, антитела, биосенсоры.

DOI: 10.1134/S0006302919060073

Детекция вирусных частиц имеет большое практическое значение, поскольку вирусные инфекции на сегодняшний день остаются одной из глобальных проблем современности. Для определения и идентификации вирусов используют различные подходы, такие как микробиологические и биохимические тесты, методы генной инженерии и иммунологические методы.

Существующие методы определения вирусных частиц можно разделить на следующие группы:

1) Детекция (идентификация, определение концентрации, размеров и иных физико-химических свойств) вирусных частиц (вирионов) и определение вирусной инфекционности;

2) Определение вирусных антигенов;

3) Определение вирусных нуклеиновых кислот [1].

Несмотря на значительное число разработанных методов детекции вирусных частиц, их практическое использование затруднено из-за сложности, дороговизны и малого числа существую-

щих измерительных приборов. Кроме этого, даже при наличии измерительных приборов велика доля ручных операций, требующих высокой квалификации обслуживающего персонала. Поэтому разработка новых и эффективных экспресс-методов для решения вопросов быстрого анализа вирусных частиц является актуальной. Приборная реализация этих методов должна обеспечивать высокую точность измерений, а измерения должны проводиться в автоматическом режиме персоналом средней квалификации. Важным критерием при разработке новых методов определения вирусов является их универсальность и возможность использования для различных объектов. Бактериофаги являются прекрасной моделью для разработки систем детекции вирусов, а инструментом для распознавания вирусов могут служить специфичные им антитела и микробные клетки [2]. Для детекции вирусов используется довольно широкий спектр методов, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки [1,3–6].

В работе представлен краткий обзор современных методов, используемых для определения ви-

Сокращения: АСМ — атомно-силовая микроскопия, ПЦР — полимеразная цепная реакция.

русов, в том числе на примере бактериофагов. Особое внимание уделено перспективам применения методов электроакустического анализа для определения вирусов.

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ

Бактериофаги являются самой многочисленной группой среди вирусов, характеризующейся высоким уровнем генетического разнообразия. Используемые методы обнаружения бактериофагов условно можно разделить на качественные и количественные. Большинство качественных методов обнаружения вирусов в исследуемом материале основаны на принципе бактериофагии Д'Эрелля, когда анализируемый материал засевают совместно с чувствительными микробными клетками на жидкие и плотные питательные среды. К качественным методам можно отнести следующие: метод прямого выделения бактериофагов из анализируемого материала; выделение бактериофагов путем обогащения «без подсева»; выделение бактериофагов посредством обогащения с подсевом.

К качественным микробиологическим методам можно также отнести и пробы определения бактериофагов на плотных питательных средах по методу Отто и методу Фюрта; а также индикацию бактериофагов в жидкой питательной среде [7,8].

Для количественного определения содержания вируса (титра) предложены различные методы и подходы, но наиболее доступным является подсчет негативных колоний бактериофага на газоне индикаторной культуры по Грациа (метод бляшек) и титрование фага в жидкой питательной среде, предложенное Аппельманом [7,9,10].

Одной из доступных форм количественного определения вируса является подсчет количества вирусных «бляшек» (стерильных пятен) на моно-слое клеток культуры. Дульбекко и Фогт модифицировали данный метод и показали возможность его применения для определения вирусов животных. Разработанный метод бляшек по Дульбекко имеет несколько модификаций.

В том случае, когда вирусы не вызывают гибель клеток, инфекционность определяют методами трансформации, гемадсорбции или интерференции. К примеру, ряд онкогенных вирусов, которые способны лизировать культуру клеток одного вида, могут «трансформировать» другие типы клеток без их лизиса. В результате такие трансформированные клетки приобретают свойства злокачественных клеток и становятся явно отличимыми от клеток, не инфицированных вирусом.

У методов, основанных на подсчете количества «бляшек», есть ограничения, поскольку бактериофаг может вызывать образование слишком маленьких негативных колоний или колонии образуются довольно медленно, что значительно затрудняет определение титра фага путем подсчета негативных колоний. Чтобы преодолеть этот недостаток, в нижний слой агар добавляют краситель, например генцианвиолет. При этом негативные колонии будут менее окрашенными, так как краситель будет диффундировать только в живые клетки [8].

Преимуществом вышеперечисленных методов является то, что для их проведения не требуется дорогостоящее оборудование. К недостаткам следует отнести тот факт, что не все бактериофаги (например, умеренные) способны образовывать негативные колонии и вызывать просветление бактериальной суспензии, как и не все бактериофаги хозяева могут образовывать сплошной рост газонном [11].

ПРЯМЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ

К прямым методам определения бактериофагов можно отнести электронную микроскопию, которая популярна среди вирусологов и является одним из необходимых этапов в процедуре исследования вирусов [12].

Г. Акерманн и М. Хэлдал [13] при помощи электронной микроскопии идентифицировали ряд водных вирусов изометрической, плеоморфной и нитевидной формы. К. Ашелфорд с соавт. [14] применили метод трансмиссионной электронной микроскопии для подсчета общего количества бактериофагов почв. Для контроля эффективности подсчета использовали тестовый бактериофаг, выделенный из *Serratia quinivorans*. Концентрация вирусных частиц, определенная методом прямого подсчета, оказалась в 350 раз больше концентрации, рассчитанной при помощи классического метода бляшек.

Использование электронной микроскопии для детекции вирусов ограничивается тем, что количество вирусов в анализируемом образце должно составлять не менее 10^6 вирусных частиц в 1 мл. Чтобы повысить чувствительность данного метода, исследователи применяют подложки с повышенными адсорбционными свойствами. Например, А.К. Сироткин [15] разработал метод обнаружения вирусов с помощью электронной микроскопии, модифицировав подложки синтетическими полимерами. Им было выявлено сродство поверхностных антигенов вирусов к аминокислотным последовательностям синтетических полимеров. В результате эффективность обнаружения вирусных частиц увеличилась на 25%.

К недостаткам метода электронной микроскопии можно отнести тот факт, что данная процедура занимает много времени и для ее проведения требуется подготовка квалифицированных специалистов [16]. К тому же некоторые вирусы очень трудно различить по морфологии в пределах одного семейства, что затрудняет их идентификацию. Данный недостаток может быть устранен с помощью метода иммунной электронной микроскопии, основанной на образовании иммунных комплексов при добавлении к вирусным частицам специфической сыворотки. Кроме того, метод иммунной электронной микроскопии более чувствителен [3].

Прогресс в изучении вирусов был достигнут и благодаря использованию для детекции и визуализации вирусов атомно-силовой микроскопии (АСМ). При помощи данного метода вирусы могут исследоваться в жидкой среде в естественном состоянии, а сам метод обладает высокой разрешающей способностью (от нанометров до сотен микрометров). При этом можно получить сведения о высоте, структуре и поверхностных свойствах вирусных частиц и нет необходимости использовать метки [17,18].

АСМ может применяться для количественной и качественной оценки вирусных частиц и позволяет отличать целые вирионы от пустых вирусных капсидов. На основе АСМ предлагается создание биочипов для детекции вирусов и бактерий. При этом предлагается использовать разнообразные сенсорные покрытия с использованием антител [19].

При помощи АСМ группой американских исследователей была продемонстрирована возможность идентификации бактериофага fd, парвовирусов и вирусов Коксаки без использования каких-либо контрастирующих веществ или меток. В этом случае чувствительность метода составила 10^8 БОЕ/мл [20]. Методом АСМ показана возможность детекции бактериофага M13KO7, при этом чувствительность метода также составила 10^8 БОЕ/мл [21].

Возможности использования АСМ были продемонстрированы на примере детекции ряда вирусов, содержащихся в водных пробах, с учетом их морфологических характеристик (формы и размера). Были использованы три модельных объекта — вирус полиомиелита, ротавирус и аденовирус [22], были определены размеры вирусов и получены их АСМ-изображения.

Несмотря на все преимущества, метод АСМ имеет и недостатки. Требуется оптимизация пробоподготовки образцов, размер поля сканирования ограничивается малыми размерами, зонд может повреждать поверхность образца в случае контактного режима работы, требуется разработ-

ка и совершенствование автоматизированных систем анализа результатов [17].

К экспресс-методам количественного определения бактериофагов можно отнести и эпифлуоресцентную микроскопию. Данный метод является более быстрым по сравнению с электронной микроскопией [23]. В основу метода положено свойство некоторых красителей поглощать свет при определенной длине волны, а при связывании с нуклеиновыми кислотами — излучать свет с большей длиной волны. В результате свет, испускаемый ярко окрашенными частицами, значительно превышающими фактический размер вирусных частиц, делает возможным их подсчет при гораздо меньшем увеличении по сравнению с неокрашенными вирусными частицами [12]. Недостатком метода является то, что для полного окрашивания вирусных частиц красителем требуется 48 ч, к тому же не исключено возникновение помех при использовании фиксаторов на основе альдегидов [24]. Кроме того, метод эпифлуоресцентной микроскопии не дает представления об инфекционной способности бактериофагов. Более того, для получения достоверных результатов требуется сократить время между обработкой образца и его анализом в ходе микроскопирования, поскольку вирусные частицы разрушаются с течением времени.

ДЕТЕКЦИЯ БАКТЕРИОФАГОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

Применение флуоресцентных красителей получило распространение в методе проточной цитометрии, с помощью которой можно быстро обнаружить и подсчитать количество вирусов, обладающих различными размерами, морфологией и типами генома. Проточная цитометрия представляет собой аналитический метод, в котором специальная система с помощью гидрофокусировки формирует струю из последовательно пролетающих исследуемых частиц. При прохождении частиц через лазерный луч измеряются их оптические характеристики: величины светорассеяния, аутофлуоресценции (либо флуоресценции, если частицы предварительно окрасили), временного профиля оптических сигналов. Эти данные собираются датчиками, обрабатываются при помощи компьютера и на их основании получают сведения о размерах и свойствах частиц [25].

Для обнаружения и распознавания широкого спектра различных вирусов впервые метод проточной цитометрии был применен в работе К. Бруссард с соавт. [26]. Исследователи, используя проточный цитометр, оснащенный стандартным аргон-ионным лазером, показали возможность определения вирусов, принадлежащих таким семействам, как *Baculoviridae*, *Herpesviridae*,

Myoviridae, Phycodnaviridae, Picornaviridae, Podoviridae, Retroviridae и *Siphoviridae*.

Цитологические методы для детекции вирусов на сегодняшний день применяются достаточно редко, но, тем не менее, при ряде инфекций по-прежнему используются при исследовании материалов биопсии, мазков и др. К примеру, так оценивают состояние тканей печени при диагностике хронических гепатитов [27].

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУСОВ

К распространенным методам определения вирусов относятся и иммунологические методы, основанные на определении вирусных антигенов. Серологическая диагностика позволяет идентифицировать вирус даже в том случае, когда выделение вирусных частиц из образца не дает никаких результатов. Один из наиболее распространенных методов — метод иммуноферментного анализа (enzyme-linked immunosorbent assay — ELISA). В основу метода положено явление взаимодействия «антиген—антитело». Для визуализации данного взаимодействия используют фермент в качестве метки, а затем анализируют сигнал физико-химическими методами. Существует большое количество вариантов этого метода. Метод иммуноферментного анализа обладает высокой чувствительностью и быстротой анализа. Недостатком метода является возможность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов, а также необходимость использования метки [28].

Другой разновидностью серологических методов является реакция иммунофлуоресценции, основанная на использовании антител, связанных не с ферментом, а с красителем, например флуоресцеинизотиоцианатом. Принцип метода был разработан А. Кунсом в 1942 г. [29]. Различают разновидности метода — прямой и непрямой [30]. Методика иммунофлуоресценции отвечает критериям высокой чувствительности и специфичности, метод относительно дешев, прост в выполнении, не требует специального дорогостоящего оборудования, позволяет быстро получить результат (в течение 30–50 мин), но требует исполнения опытным и компетентным лабораторным работником. К недостаткам метода относится низкая достоверность для мелких объектов, поскольку вирусы остаются за пределами разрешающей способности микроскопа [30]. Для успешного проведения реакции иммунофлуоресценции требуется достаточно высокая концентрация вирусных частиц в образце, причем даже незначительная его контаминация способна давать неспецифическое свечение [3].

Для диагностики вирусов успешно применяется метод иммунохроматографического анализа,

достоинствами которого являются быстрота проведения и легкость применения [31].

Радиоиммунный анализ основан на введении в один из компонентов реакции радиоактивной метки и ее дальнейшей детекции радиоспектрометром. При этом для визуализации взаимодействия «антиген—антитело» в качестве метки используются не красители и ферменты, а радиоактивные соединения. Радиоиммунный анализ является высокочувствительным и специфичным методом и в настоящее время часто применяется для определения гормонов. Имеются данные о применении этого метода для ранней диагностики туберкулезной инфекции и определения вируса лейкоза у мышей. К недостаткам метода стоит отнести высокую стоимость применяемого оборудования (гамма-счетчиков) и использование радиоактивных веществ [3].

Для типирования вирусов традиционно применяется реакция связывания комплемента. В основу метода положен принцип связывания образующегося иммунного комплекса «антиген—антитело» глобулярными белками системы комплемента. Реакция связывания комплемента проводится в два этапа. На первом этапе происходит специфическое взаимодействие между антигеном и антителом. На втором — к образовавшемуся комплексу через Fc-фрагмент антитела присоединяется комплемент. В случае если специфическое взаимодействие между антигеном и антителом не происходит, комплемент остается не связанным. Однако реакция связывания комплемента обладает недостаточно высокой чувствительностью и является сложной при проведении стандартизации реагентов [30].

В вирусологических лабораториях для серологической идентификации ряда вирусов широко используется реакция торможения гемагглютинации. Суть метода заключается в способности противовирусных антител предотвращать агглютинацию эритроцитов гемагглютинидами вирусов. Если же в сыворотке крови отсутствуют специфические противовирусные антитела, то происходит агглютинация эритроцитов вирусными белками. В противном случае антитела нейтрализуют вирус. Использование метода может быть ограничено из-за наличия в сыворотке крови людей неспецифических ингибиторов вирусов, а также естественных антител — агглютининов [32].

Реакция пассивной гемагглютинации основана на том, что на поверхности эритроцитов фиксированы антигены возбудителя, при этом их агглютинация происходит только в присутствии специфичных к данному возбудителю антител [3].

Реакция обратной пассивной гемагглютинации в основе имеет принцип, противоположный пассивной гемагглютинации, при этом индикатором является агглютинация эритроцитов, которые бы-

ли подвергнуты сенсibilизации специфическими антителами, в присутствии вирусных антигенов. Данная реакция широко применяется для определения HBs-антигена крови. Также существует другая разновидность метода гемагглютинации — реакция непрямой гемагглютинации [3].

МЕТОД ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУСОВ

Довольно широко используют методы выделения нуклеиновой кислоты вируса и ее детекции с помощью весьма надежного метода — полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР позволяет детектировать присутствие даже незначительных количеств вирусной нуклеиновой кислоты в материале посредством значительного увеличения определенных участков вирусных генов. Метод является высокочувствительным и был впервые предложен К. Муллисом в 1983 г. При помощи фрагмента ДНК-полимеразы он предложил амплифицировать ДНК в ходе многократных циклов ее репликации, используя затравки-праймеры, комплементарные участку ДНК. Метод был на тот момент довольно трудоемким и требовал для проведения много времени. Позже, с развитием приборного обеспечения и открытием термостабильного фермента Taq-полимеразы, появилась возможность автоматизации метода [33].

Методом ПЦР можно обнаружить не только ДНК-содержащие вирусы, но и вирусы, содержащие РНК (методом обратной транскрипции). Посредством проведения реакции обратной транскрипции получают комплементарную ДНК (кДНК), которая и используется в реакции амплификации [5]. Главным фактором, ограничивающим широкое применение методики ПЦР в реальном времени, является высокая стоимость аппаратуры.

МЕТОДЫ ЭЛЕКТРОФИЗИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И БИОСЕНСОРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСОВ

Для детекции вирусных частиц все чаще применяются биосенсоры, обладающие различной конструкцией и механизмом действия. Биосенсоры позволяют значительно уменьшить время проведения анализа благодаря относительной простоте проведения процедур и, как показывают литературные данные, являются довольно чувствительными и требуют минимальной предварительной обработки исследуемого материала.

Биосенсоры, как правило, состоят из двух компонентов — чувствительного биологического элемента и системы детекции. Биологический элемент может быть каталитическим и некаталитическим. К каталитическим элементам можно отнести ферменты и ткани, к некаталитическим —

рецепторы и нуклеиновые кислоты. Система детекции может быть оптической, калориметрической, акустической, электрической и др. Существует возможность комбинирования всех возможных элементов, что говорит о возможности создания огромного числа разнообразных биосенсорных систем [34].

М. Лос с соавт. [35] для быстрого обнаружения фаговой инфекции и явления лизогении предложили использование электрохимического биочипа. Принцип метода заключается в захвате молекул-мишеней (либо нуклеиновых кислот, либо белков) на чипе с использованием зонда, который соединен с ферментом, катализирующим реакцию окисления-восстановления. Электрический сигнал, появляющийся в результате этой реакции, измеряется с помощью микроэлектрода. В работе были использованы два вида биочипов — для обнаружения нуклеиновых кислот бактериофагов (с использованием ДНК-зондов) и для обнаружения вирионов (с использованием специфических антител). Авторы продемонстрировали возможность обнаружения фагов M13, P1, T4 и λ в течение короткого времени (25–50 мин) и в количестве от 10^4 до 10^7 частиц.

Разработан оптический иммунодатчик для обнаружения биомаркера неструктурного белка 1 денге в клинических образцах, полученных на ранних стадиях инфекции. Принцип действия основан на определении антигена неструктурного белка 1 на основе иммунофлуоресценции с использованием изотиоцианата флуоресцеина, конъюгированного с IgG-антителом. Датчик характеризуется высокой воспроизводимостью (относительное стандартное отклонение составило 2%), хорошей стабильностью в течение 21 суток при 4°C, предел детекции равнялся $15 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$ [36].

В работе [37] при помощи биосенсора из тонких пленок нанопористого кремния показана возможность обнаружения бактериофага MS2. Преимущества нанопористого кремния заключаются в простоте его изготовления и чрезвычайно высокой площади поверхности материала, что делает его идеальной основой для изготовления датчиков. Методом ковалентной биоконъюгации на пористых пленках были иммобилизованы антитела, а затем в систему вводили меченые красителем бактериофаги MS2. В ходе измерения флуоресценции была установлена возможность обнаружения вирусных частиц в количестве $2 \cdot 10^7$ БОЕ/мл.

В работе [38] приведены данные по применению электрохимического биосенсора (геносенсора и иммуносенсора) для определения вируса птичьего гриппа.

На примере детекции бактериофага T7 предложено использование колориметрического иммуносенсора, изготовленного на основе наночастиц золота, ковалентно связанных со специфиче-

ными антителами на бактериофаг T7 [39]. Описанная модель иммуносенсора, благодаря образованию иммунных комплексов бактериофага с антителами и наночастицами золота, позволяет быстро, просто и селективно детектировать вирус. В результате можно невооруженным взглядом наблюдать изменение окраски раствора от красной до фиолетовой. При этом авторы делают вывод, что данный способ может быть использован для детекции практически любых вирусов.

На примере бактериофага PhiX17 и клеток *E. coli* WG5, чувствительных к данному фагу, был продемонстрирован быстрый метод обнаружения вирусных частиц в образце при помощи целноклеточного биосенсора (*whole-cell biosensor*). На поверхности металлического электрода была сформирована биопленка из клеток кишечной палочки. Инфекция клеток биопленки специфичным бактериофагом приводит к их лизису и изменению импеданса на поверхности микроэлектрода. Это изменение регистрировали при помощи импедансной спектроскопии. Метод является простым и позволяет детектировать бактериофаги до тех пор, пока на чипе есть чувствительные к нему клетки [40].

В конце 60-х годов XX века Е. Кретчманном была показана возможность возбуждения поверхностных плазмонов поляризованным светом, что послужило толчком к развитию метода поверхностного плазмонного резонанса. Спустя 10–20 лет при использовании явления плазмонного резонанса рядом исследователей была показана возможность применения метода для исследования биологических объектов, в том числе и вирусов. Преимуществом данной технологии является возможность наблюдать практически любые межмолекулярные взаимодействия в режиме реального времени, не используя специальных меток [41]. Поверхностный плазмонный резонанс представляет собой явление, возникающее на границе раздела фаз, например, «стеклянная призма – металлическая пленка». Часть луча света, проходящего через призму и падающего под определенным углом на поверхность металла, распространяется в металлической пленке в виде затухающей электромагнитной волны, которая вызывает коллективные колебательные движения свободных электронов. Эти колебательные движения электронов – поверхностный плазмон – распространяются не только в металлической пленке, но и выходят за слой металла и экспоненциально убывают с увеличением расстояния от поверхности диэлектрика (призмы). Связывание изучаемого объекта с поверхностью металлической пленки приводит к изменению диэлектрической проницаемости и, следовательно, к изменению угла резонанса. Изменение угла резонанса можно отслеживать в режиме реального времени, получая информацию о кинетике взаимодействий, возникающих на поверхности металлической пленки [41,42].

Поверхностный плазмонный резонанс можно отнести к экспресс-методам. Например, в работе [42] была показана возможность обнаружения бактериофагов кишечной палочки при помощи двухканального микрофлюидного сенсора в режиме реального времени. На золотую пленку, используя авидин в качестве лиганда, наносили биотинилированные клетки *Escherichia coli* WG5. Имобилизованные таким образом клетки бактерий использовали как мишени для селективного детектирования колифагов. После добавления к данной системе бактериофагов, выделенных из сточных вод, наблюдалось их связывание с клетками. Чувствительность данного метода составила 10^2 БОЕ/мл при времени инкубации 120 мин.

Все чаще находят свое применение в биологии и медицине методы электроакустического анализа, поскольку эти методы характеризуются высокой чувствительностью, точностью измерений, а также минимальным временем для проведения анализа [43]. Акустические биосенсоры могут быть выполнены на основе пьезоэлектрических кристаллов, таких как кварц, ниобат лития или танталат лития, поскольку они характеризуются высокой химической устойчивостью. Кроме того, такие датчики универсальны и в принципе могут обнаружить различные биомолекулы. Датчики на основе акустических волн классифицируются в соответствии с генерируемыми ими волнами, такими как объемные или поверхностные акустические волны. Акустические волны, возбуждаемые в пьезоэлектрической среде, представляют собой привлекательную технологию для создания целого семейства датчиков, характеризующихся высокой чувствительностью, быстротой проведения анализа, дешевизной и небольшими размерами [43,44]. Например, описана возможность детекции бактериофагов с помощью биосенсоров, изготовленных из кристаллов кварца (SiO_2). Как правило, поверхность такого кристалла покрывают специфическими антителами. При адсорбции веществ на поверхности кристалла меняется резонансная частота колебаний, что и регистрируется биосенсором (пьезоэлектрическим датчиком) [45–47]. Помимо SiO_2 в качестве резонатора используют титанат бария, сегнетову соль, турмалин и др.

О. Тамарин и соавт. [48], используя упругие волны с горизонтальной поперечной поляризацией в слоистой среде (волны Лява), показали возможность обнаружения бактериофага M13 в режиме реального времени. Авторы на подложке из оксида кремния проводили необратимую имобилизацию антител на бактериофаг M13, затем проводили иммунореакцию между бактериофагом M13 и антителами, специфичными к M13, и

осуществляли анализ образовавшейся многослойной поверхности при помощи волн Лява. В качестве контроля для подсчета титра бактериофага частицы, связавшиеся с антителами на поверхности датчика, элюировали, изменяя рН раствора. При этом количество БОЕ оценивали микробиологическими методами.

Некоторые методы основаны на использовании в качестве рецептора антител или мембран, нанесенных на поверхность пьезоэлектрического звукопровода или резонатора [49]. Так, например, используя иммобилизацию соответствующих антивирусных антител на поверхности резонатора был разработан иммуносенсор для селективной детекции вирусов герпеса в человеческой крови [50], а также в природных водоемах (реки, сточные воды, канализация) без предварительной обработки анализируемого субстрата [51].

Описана возможность изучения биомолекулярных взаимодействий в растворах, контактирующих напрямую с поверхностью резонатора, что значительно сокращает время, необходимое для детекции исследуемого образца. Например, с использованием резонатора с продольным электрическим полем была продемонстрирована возможность детекции эндотоксина в присутствии веществ, приводящих к сдвигу резонансной частоты [52].

Продemonстрированы возможности акустического датчика с поверхностной акустической волной для детекции вируса Эбола с возможностью его многократного использования [53]. Для обнаружения вируса гепатита В был разработан биосенсор на основе пьезоэлектрического резонатора с продольным электрическим полем [54].

Описан прототип биосенсора на основе пьезоэлектрических материалов для определения вирусной инфекции в качестве диагностического устройства для оказания помощи в чрезвычайных ситуациях, требующих быстрого и надежного тестирования на наличие патогенов, передающихся через кровь [55].

Весьма перспективными являются пьезоэлектрические резонаторы с поперечным электрическим полем, в которых отсутствует контакт исследуемого материала с металлическими электродами. Эти резонаторы используются для исследования свойств различных жидкостей, включая и биологические. Такой резонатор представляет собой пьезоэлектрическую пластину, на одной стороне которой нанесены два электрода. Исследуемая жидкость контактирует с противоположной стороной пластины. Известно, что изменение вязкости и проводимости контактирующей жидкости приводит к изменению характеристик резонатора [56]. Это позволяет проводить анализ биологических объектов непосредственно в жидкой фазе без нанесения на поверхность ре-

зонатора специфичных антител [57–61]. Для улучшения характеристик резонатора с поперечным электрическим полем и для подавления паразитных колебаний часть поверхности резонатора покрывалась специальным поглощающим покрытием [62].

Возможности разработанного датчика продемонстрированы в работах [59,61] для детекции бактериофагов с помощью специфичных антител и фаговых мини-антител непосредственно в жидкой фазе без иммобилизации антител на поверхности пьезоэлектрика. Установлено, что нижний предел детекции бактериофагов составил 10^6 фагов/мл при минимальном времени анализа ~5–10 мин. При этом степень изменения характеристик резонатора зависит от количества фаговых частиц, что открывает перспективы для проведения не только качественного, но и количественного анализа бактериофагов. Полученные зависимости показали возможность использования в качестве аналитического сигнала значение реальной или мнимой части электрического импеданса на фиксированной частоте вблизи резонанса. Возможности датчика были продемонстрированы для бактериофагов, относящихся к разным таксономическим группам бактериофагов. Например, нитчатый бактериофаг класса I M13K07 относится к семейству *Inoviridae* [57], а бактериофаги ΦA1-Sp59b и ΦA1-SR65 соответствуют семейству *Podoviridae* [59,61]. Был разработан критерий уверенной регистрации специфичного взаимодействия, который заключается в том, что изменение модуля электрического импеданса датчика должно быть не менее ~5% при добавлении в суспензию бактериофагов определенного количества антител. Преимуществами пьезоэлектрического резонатора является возможность его многократного использования. Это объясняется тем, что резонатор выполнен из кристалла ниобата лития, который является химически стойким практически ко всем химическим соединениям. Кроме того, поверхность резонатора, обработанная по 14 классу чистоты, не допускает никакой адсорбции. Поэтому после промывки резонатора на его поверхности не остаются никаких следов от суспензии, подтверждением этому является полное восстановление всех его характеристик после всех экспериментов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вирусные инфекции до сих пор представляют опасность для человечества, что стимулирует развитие новых экспресс-методов определения вирусов. Количество методов, позволяющих получать информацию о вирусной опасности, неуклонно растет. При этом основным требованием к новым методам кроме высокой чувствительности является возможность проведения анализа в

краткие сроки на большом количестве образцов, а также порой и в «полевых условиях». Анализ научной литературы, посвященной исследованию и развитию технологий в данном направлении, показывает значительный потенциал биосенсорных систем, в том числе акустических датчиков. Биосенсоры зарекомендовали себя как надежные аналитические устройства, подходящие для обнаружения вирусов. Низкая стоимость, небольшие требования к образцу и возможность миниатюризации оправдывают их растущее развитие. Основным моментом для всех датчиков является то, что датчики позволяют четко разграничивать ситуации, когда происходит взаимодействие вирусов со специфическими реагентами от контрольных экспериментов, когда такого взаимодействия не происходит. Несмотря на то что акустические датчики используются для определения микробных клеток, их применение для определения вирусов описано крайне скудно. Тем не менее датчики на основе пьезоэлектрического резонатора характеризуются отдельными преимуществами по сравнению с аналогичными методами и могут занять одно из лидирующих позиций для решения вопроса детекции вирусов. Неоспоримым достоинством акустических датчиков на основе пьезоэлектрического резонатора являются простота пробоподготовка, чувствительность, оперативность и возможность многократного использования датчика. Дальнейшая стандартизация и автоматизация метода электроакустического анализа позволит расширить круг его применения и использования в микробиологии, биотехнологии, ветеринарии, медицине, в том числе в области фаговой терапии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты №№ 19-07-00304 и 19-07-00300).

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. J. Carter and V. Saunders, *Virology: principles and applications* (John Wiley & Sons Ltd, London, 2007).

2. A. Lesniewski, M. Los, M. Jonsson—Niedziółka, et al., *Bioconjugate Chem.* **25**, 644 (2014).
3. Н. Н. Носик и В. М. Стаханова, *Клин. микробиология и антимикробная химиотерапия* **2** (2), 70 (2000).
4. F. N. Dultsev, R. E. Speight, M. T. Fiorini, et al., *Anal. Chem.* **73** (16), 3935 (2001).
5. K. P. O'Connell, J. R. Bucher, P. E. Anderson, et al., *Appl. Environ. Microbiol.* **72** (1), 478 (2006).
6. J. H. Lee, D. W. Domaille, and J. N. Cha, *ACS Nano* **6** (6), 5621 (2012).
7. А. С. Лабинская, *Микробиология с техникой микробиологических исследований* (Медицина, М., 1978).
8. В. В. Алексеев, *Медицинские лабораторные технологии. Руководство по клинической лабораторной диагностике*, под ред. А. И. Карпищенко (ГЭОТАР-Медиа, М., 2013).
9. М. Адамс, *Бактериофаги* (Медгиз, М., 1961).
10. Э. Каттер, *Бактериофаги. Биология и практическое применение*, под ред. Э. Каттер и А. М. Сулаквелидзе (Научный мир, М., 2012).
11. M. H. V. van Regenmortel and B. W. J. Mahy, *Encyclopedia of General Virology* (Acad. Press, San Diego, 2010).
12. A. M. Kropinski and M. R. J. Clokie, *Bacteriophages: Methods and protocols*, Ed. by M. R. J. Clokie and A. M. Kropinski (Humana Press, LLC, New Jersey, 2009), V. 1.
13. H. W. Ackermann, *Res. Microbiol.* **154** (4), 245 (2003).
14. K. E. Ashelford, M. J. Day, and J. C. Fry, *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 285 (2003).
15. А. К. Сироткин, Дисс. ... канд. биол. наук (Санкт-Петербург, 2004).
16. H.-W. Ackermann and M. Heldal, in *Manual of Aquatic Viral Ecology*, Ed. by S. W. Wilhelm, M. G. Weinbauer, and C. A. Suttle (ASLO, 2010), pp. 182–192.
17. И. В. Сафенкова, А. В. Жердев и Б. Б. Дзантиев, *Успехи биол. химии* **52**, 281 (2012).
18. Yu. G. Kuznetsov, A. J. Malkin, R. W. Lucas, et al., *J. Gen. Virol.* **82** (9), 2025 (2001).
19. А. Н. Никиян и Е. Б. Татлыбаева, *Вестн. Оренбургского гос. ун-та* **6** (167), 112 (2014).
20. S. R. Nettikadan, J. C. Johnson, C. Mosher, and E. Henderson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311** (2), 540 (2003).
21. C. Qi, Y. Lin, J. Feng, et al., *Virus Res.* **140** (1–2), 79 (2009).
22. Т. Е. Игнатюк, И. А. Голутвин, Н. С. Насикан и др., *Вопр. вирусологии* **48** (6), 17 (2003).
23. M. M. Ferris, C. L. Stoffel, T. T. Maurer, and K. L. Rowlen, *Anal. Biochem.* **304** (2) 249 (2002).
24. K. Wen, A. C. Ortmann, and C. A. Suttle, *Appl. Environ. Microbiol.* **70** (7), 3862 (2004).
25. J. J. McSharry, *Microbiol. Rev.* **7** (4) 576 (1994).
26. C. P. D. Brussaard, D. Marie, and G. Bratbak, *J. Virol. Methods* **85** (1–2), 175 (2000).
27. C. Bergeron, J. Ordi, D. Schmidt, et al., *Am. J. Clin. Pathol.* **133** (3) 395 (2010)/
28. А. М. Егоров, А. П. Осипов, Б. Б. Дзантиев и Е. М. Гаврилова, *Теория и практика иммуноферментного анализа* (Высш. шк., М., 1991).

29. A. H. Coons, H. J. Creech, R. N. Jones, and E. Berliner, *J. Immunol.* **45**, 159 (1942).
30. W. B. Cherry, In *Manual of clinical microbiology*, 3rd Ed., Ed. by E. H. Lennette, A. Balows, W. J. Hausler, Jr., et al., (Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., 1980), pp. 501–508.
31. R. C. Wong and H. Y. Tse, *Lateral Flow Immunoassay* (Humana Press, New Jersey, 2009).
32. R. H. Yolken, D. A. Lennette, T. F. Smith, and J. L. Waner, In *Manual of Clinical Microbiology*, 7th Ed., Ed. by P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, et al. (Am. Soc. Microbiol., Washington D.C., 1999), pp. 843–846.
33. О. С. Антонова, Г. Е. Рудницкая, А. Н. Тупик и др., *Науч. приборостроение* **21** (4), 5 (2011).
34. Э. Тернер, И. Карубе, Дж. Уилсон и др., в кн. *Биосенсоры: основы и приложения* (Мир, М., 1992), сс. 457–487.
35. M. Los, J. Los, and G. Wegrzyn, *Microb. Cell Factories* **5**, S38 (2006). DOI: 10.1186/1475-2859-5-S1-S38.
36. N. T. Darwish, S. D. Sekaran, Y. Alias, and S. M. Khor, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **149**, 591 (2018). DOI: 10.1016/j.jpba.2017.11.064.
37. A. M. Rossi, L. Wang, V. Reipa, and T. E. Murphy, *Biosens. Bioelectron.* **23** (5), 741 (2007).
38. I. Grabowska, K. Malecka, U. Jarocka, et al., *Acta Biochim. Pol.* **61** (3), 471 (2014).
39. A. Lesniewski, M. Los, M. Jonsson–Niedziółka, et al., *Bioconjugate Chem.* **25**, 644 (2014).
40. X. Muñoz–Berbel, C. García–Aljaro, and F. J. Muñoz, *Electrochim. Acta* **53**, 5739 (2008).
41. N. J. De Mol, M. J. E. Fischer, *Surface Plasmon Resonance. Methods and Protocols* (Humana Press, N.-Y., 2010).
42. C. Garcia–Aljaro, X. Munoz–Berbel, A. T. A. Jenkins, et al., *Appl. Environ. Microbiol.* **74** (13), 4054 (2008).
43. E. Don, O. Farafonova, S. Pokhil, et al., *Sensors* **16** (1), 96 (2016). DOI: 10.3390/s16010096.
44. M. Pohanka, *Int. J. Electrochem. Sci.* **12**, 496 (2017).
45. E. Uttenthaler, M. Schräml, J. Mandel, and S. Drost, *Biosens. Bioelectron.* **16** (9–12), 735 (2001).
46. M. R. Gajendragad, K. N. Y. Kamath, P. Y. Anil, et al., *Veterinary Microbiol.* **78**, 319 (2001).
47. S. Kurosawa, J. W. Park, H. Aizawa, et al., *Biosens. Bioelectron.* **22** (4), 473 (2006).
48. O. Tamarin, S. Comeau, C. Déjous, et al., *Biosens. Bioelectron.* **18** (5–6), 755 (2003).
49. D. S. Ballantine, R. M. White, S. J. Martin, et al., *Acoustic Wave Sensors: Theory, Design, and Physicochemical Applications* (Acad. Press, San Diego, 1997).
50. B. Koenig and M. Graetzel, *Anal. Chem.* **66**, 341 (1994).
51. M. Bisoffi, B. Hjelle, D. C. Brown, et al., *Biosens. Bioelectron.* **23** (9), 1397 (2008).
52. H. Muramatsu, E. Tamiya, M. Suzuki, and I. Karube, *Anal. Chim. Acta* **217**, 321 (1989).
53. J. T. Baca, V. Severns, D. Lovato, et al., *J. Virol.* **78**, 4330 (2004).
54. L. Zhou, M. Liu, L. Hu, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **27**, 341 (2002).
55. M. Bisoffi, *J. Clin. Microbiol.* **51** (6), 1685 (2013).
56. B. D. Zaitsev, A. M. Shikhabudinov, A. A. Teplykh, and I. E. Kuznetsova, *Ultrasonics* **63**, 179 (2015).
57. B. D. Zaitsev, I. E. Kuznetsova, A. M. Shikhabudinov, et al., *Trans. Ultrason., Ferroel and Freq. Contr.* **59** (5), 963 (2012).
58. О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, И. Е. Кузнецова и др., *Биофизика* **61** (1) 60 (2016).
59. О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, И. А. Бородин и др., *Биофизика* **62** (3), 472 (2017).
60. О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, А. В. Смирнов и др., *Прикл. биохимия и микробиология*. **53** (6), 642 (2017).
61. О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, И. А. Бородин, et al., *Talanta* **178**, 743 (2018).
62. Б. Д. Зайцев, И. Е. Кузнецова, А. М. Шихабудинов и А. А. Васильев, *Письма в журн. тех. физики* **37** (11), 27 (2011).

Virus Detection Methods and Biosensor Technologies

O.I. Guliy*, **, B.D. Zaitsev*, O.S. Larionova**, and I.A. Borodina*****

*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences,
prosp. Entuziastov 13, Saratov, 410049 Russia

** Saratov State Vavilov Agrarian University, Teatralnaya pl. 1, Saratov, 410012 Russia

***Saratov Branch of Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences,
ul. Zelenaya 38, Saratov, 410019 Russia

This paper provides a brief overview of the modern and classical virus detection methods using bacteriophages as an example. Great attention has been paid to screening assays for the detection of viruses while analyzing a large number of samples, due to these approaches the overall cost savings for the laboratory is significant. One of the most high-demand tendencies in microbiology is the development of rapid and sensitive biosensors for detection of viruses, on the basis of the methods of electrophysical analysis. The interest in biosensor systems for virus detection in aqueous solutions is due to their simplicity, cost-effectiveness, and relatively high sensitivity. The prospects of using electro-acoustic sensors in the development of biosensor methods for determining viruses are shown.

Keywords: virus detection, bacteriophages, antibodies, biosensors