

Д.В.Уткин, Н.А.Осина, В.Е.Куклев, П.С.Ерохин, С.А.Щербакова, В.В.Кутырев

БИОСЕНСОРЫ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

В обзоре представлены функциональные характеристики основных видов биосенсоров: электрохимических, пьезоэлектрических и оптических. Приведены примеры использования биосенсоров для детекции патогенных биологических агентов. Обсуждаются вопросы, связанные с перспективами конструирования биосенсоров для лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней.

Ключевые слова: биосенсоры, иммуносенсоры, индикация, особо опасные инфекционные болезни.

Одной из наиболее важных задач обеспечения национальной безопасности Российской Федерации и здоровья населения страны является защита от особо опасных инфекционных болезней, к которым относятся чума, сибирская язва, туляремия, холера, вирусные геморрагические лихорадки. Определяющим фактором предупреждения распространения особо опасных инфекций является раннее и быстрое обнаружение возбудителя и своевременное проведение противоэпидемических мероприятий [7]. Задача мониторинга особо опасных инфекционных болезней определяет необходимость разработки высокочувствительных средств индикации патогенов, базирующихся на достижениях современной науки и техники, характеризующихся высокой избирательностью, быстродействием, низкой себестоимостью, доступностью и малыми габаритными размерами. Таким требованиям удовлетворяют биосенсорные системы, созданные с применением новейших технологий.

Биосенсор или биологический датчик – это устройство безреагентного анализа соединений. Биосенсор состоит из биологически чувствительного элемента (рецептора), физического преобразователя и рабочего раствора. Биологический компонент биосенсора может включать ферменты, ткани, микроорганизмы, антитела, антигены, ДНК, РНК, иммобилизованные на специальном физическом носителе. Биосенсоры, содержащие антитела или антигены, называют иммуносенсорами, имеющие ДНК или олигонуклеотиды, – геносенсорами. Биосенсоры, способные быстро и воспроизводимо восстанавливаться являются многократными. С помощью многократных биосенсоров осуществляют прямой мониторинг увеличения или уменьшения концентрации определяемого биологического агента. Биосенсоры, которые не могут быть воспроизводимо и быстро восстановлены, называют одноразовыми, к их числу относятся биотесты и биоиндикаторы [5]. Потенциальное использование одноразовых биосенсоров, особенно в мониторинге состояния окружающей среды, в большей степени ориентировано на системы предупреждения и получения сигнального ответа, не требующие точного определения концентрации ПБА.

Принцип действия биосенсоров основан на

взаимодействии биологического компонента с исследуемым материалом и на регистрации этого взаимодействия с помощью физического преобразователя (трансдьюсера) биохимического сигнала в электрический [5]. Достоинства биосенсоров заключаются в способности преобразовывать различные виды энергии, в высокой избирательности, высокой чувствительности, возможности обнаружения ионных примесей, простых и сложных неорганических и органических молекул, возможности многократного использования. Биосенсоры характеризуются быстродействием (время отклика составляет от нескольких минут до 1 ч), в то время как специфическая индикация микроорганизмов с использованием иммуноферментного анализа составляет 3–4 ч (таблица).

По виду преобразователя выделяют четыре основные группы биосенсоров: электрохимические, пьезоэлектрические, калориметрические и оптические [2]. Для обнаружения микроорганизмов в основном используют электрохимические, пьезоэлектрические и оптические биосенсоры [15].

Принцип действия **электрохимических биосенсоров** основан на измерении электрического тока, возникающего в результате окисления или восстановления электрохимически активных веществ на поверхности рабочего электрода (амперометрические биосенсоры) или на измерении разности потенциалов между двумя электродами – рабочим и электродом сравнения при постоянном токе (потенциометрические биосенсоры). В меньшей степени распространены другие виды электрохимических биосенсоров – кондуктометрические и импедансометрические [5].

К **амперометрическим биосенсорам** относят портативное электронное устройство «электронный нос» [19]. Прибор представляет собой тонкую кремниевую пластинку с нанесенными сенсорами для распознавания молекул, с помощью которой можно быстро и точно анализировать газовые смеси и обнаруживать бактерии в воздухе. Принцип его действия похож на функционирование биологических рецепторов запахов. Перспективно применение «электронного носа» для идентификации возбудителей заболе-

Сравнительные характеристики биосенсоров и тест-систем для иммуноферментного анализа

Группа	Чувствительность, м.к./мл	Время анализа, мин	Преимущества	Недостатки	Источник
Потенциометрические биосенсоры	$2,5 \cdot 10^4$	30–45	Простота, надежность	Медленный отклик, чувствительность к электрическим шумам	[15]
Амперометрические биосенсоры	$1 \cdot 10^5$	55	Низкая стоимость, малые габариты, стабильность отклика	Низкая чувствительность, низкая селективность	[22]
Пьезоэлектрические биосенсоры	$1 \cdot 10^5$	5–10	Быстрота, стабильность отклика	Низкая чувствительность, ошибка неспецифического связывания	[20, 21]
Биосенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса	$1 \cdot 10^4$	40	Высокая чувствительность, бесконтактность	Оптические помехи, необходимость применения фотоприемников	[25]
Волоконно-оптические биосенсоры	$5 \cdot 10^4 - 5 \cdot 10^5$	1–3	Быстрота отклика, малое влияние электрических помех	Необходимость применения фотоприемников	[13, 14]
Иммуноферментные тест-системы	$1 \cdot 10^6$	180–240	Специфичность	Длительность анализа, необходимость использования меток, хромогена	[22]

ваний, передающихся воздушно-капельным способом. Многие виды бактерий, такие как *Escherichia coli*, *Proteus*, *Pseudomonas* идентифицируются с помощью «электронного носа». Он позволяет диагностировать туберкулез или язвенную болезнь, вызванную *Helicobacter pylori*, по запаху слюны [15].

Амперометрические биосенсоры используют для детекции *E. coli* в воде [15], *Salmonella typhimurium* [23], *Plasmodium falciparum* [24], выявления обсемененности продуктов бактериями, обнаружения возбудителей особо опасных инфекционных болезней – сибирской язвы [15], холеры [22, 26], бруцеллеза [18, 27].

Среди **потенциометрических биосенсоров** выделяют ион-селективные электроды: pH-электроды и полевые транзисторы, которые используют для анализа ионов образующихся в растворе. Наибольшее распространение в диагностике инфекционных болезней получили светоуправляемые потенциометрические биосенсоры LAPS (от англ. light-addressable potentiometric sensors). Метод LAPS сочетает в себе фильтрацию исследуемого материала через нитроцеллюлозную мембрану, сэндвич-иммуноанализ и светоуправляемый биосенсор. Наличие бактерий регистрируют по изменению pH на мембране. LAPS-биосенсоры применяют для обнаружения *E. coli* O157:H7 в воде [15], стафилококкового энтеротоксина, вируса болезни Ньюкасла, возбудителя бруцеллеза *Brucella melitensis* [17].

Электрохимические биосенсоры характеризуются низкой стоимостью, малыми габаритными размерами, стабильностью отклика. К недостаткам электрохимических биосенсоров следует отнести чувствительность к колебаниям температуры, pH и излучениям (таблица).

Пьезоэлектрические биосенсоры чувствительны к изменению массы на поверхности физического носителя (гравиметрические биосенсоры); плотности, вязкости среды, частоты колебаний акустических волн. В последнее время в пьезоэлектрических биосенсорах все чаще используют пьезоэлектрические кристаллы, которые генерируют и передают акустическую волну с одной стороны кристалла на другую

(англ. bulk acoustic wave sensors – объемно-волновые сенсоры) или по одной грани кристалла (англ. surface acoustic wave sensors – сенсоры поверхностных акустических волн). На основе акустических биосенсоров разработаны иммуносенсоры для обнаружения *Salmonella typhimurium*, вируса герпеса [15]. При этом на поверхности кварцевого резонатора, покрытого золотой пленкой, иммобилизируют специфические антитела. Антитела связывают белки микробных клеток, при этом масса на поверхности увеличивается, а резонансная частота колебаний акустических волн уменьшается на тысячные доли процента, что и фиксирует биосенсор. В ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» разработан способ детекции биологических макромолекул с помощью пьезоэлектрических биосенсоров. Способ включает иммобилизацию слоев макромолекул на поверхности кварцевого резонатора, помещенного в вакуум, и последовательную регистрацию резонансных частот после нанесения каждого биослоя [3]. С использованием специфических иммуноглобулинов и антигенов *Francisella tularensis* разработаны пьезоэлектрические биосенсоры для обнаружения возбудителя туляремии в воде, молоке [21] и противотулярийных антител в сыворотке животных [20]. Диагностика туляремии в первые дни болезни представляет значительные трудности. Поэтому раннее выявление сывороточных антител к возбудителю является основанием для постановки правильного диагноза и проведения своевременного адекватного лечения. Пьезоэлектрические биосенсоры позволяют обнаружить специфические противотулярийные антитела на 1–3-и сутки после заражения в течение 10 мин [20]. Пьезоэлектрические биосенсоры отличаются от электрохимических быстрым откликом (5–10 мин), но, в то же время, они обладают низкой чувствительностью и наличием ложноположительных ответов в результате неспецифического связывания с пьезокристаллом.

В **оптических биосенсорах** аналитический сигнал обусловлен не химическим взаимодействием определяемого компонента с чувствительным элементом, а измеряемыми физическими параметрами

ми – интенсивностью поглощения, отражения света, люминесценции объекта и т.д. Принцип действия оптических биосенсоров основан на регистрации изменений оптических свойств среды: оптической плотности (денситометрические биосенсоры), цвета (колориметрические биосенсоры), мутности (турбидиметрические биосенсоры), показателя преломления среды (рефрактометрические биосенсоры) и других свойств в результате присутствия биологического агента. В настоящее время наибольшее развитие получили оптические биосенсоры, основанные на изменении направления распространения светового потока, проходящего через оптическое волокно или треугольную призму, покрытую тонкой пленкой металла. Последние основаны на принципе поверхностного плазмонного резонанса (англ. surface plasmon resonance) [15].

Детекция межмолекулярного взаимодействия при **поверхностном плазмонном резонансе** осуществляется по изменению показателя преломления среды в результате образования комплекса антиген-антитело на резонансном слое измерительной кюветы или проточной ячейки [15]. Принцип предусматривает систему подготовки поверхностей для иммобилизации антител, антигенов, систему перемешивания сред, термостатирования кювет или проточных ячеек. На основе принципа поверхностного плазмонного резонанса разработаны биосенсоры для выявления спор возбудителя сибирской язвы [25] и холерного вибриона O1 серогруппы [16]. В практику внедрены коммерческие биосенсоры, основанные на явлении поверхностного плазмонного резонанса: «BIAcore» (Pharmacia Biosensor AB, Швеция) [15] и «IASys» (Affinity Sensor, Финляндия) [4]. Указанные биосенсорные системы являются довольно сложными и дорогостоящими.

Перспективным является использование **оптических волокон** в качестве био- и иммуносенсоров. Они характеризуются низкой себестоимостью, быстрым откликом, простотой постановки анализа. Обычно, через волокно подается излучение различных длин волн инфракрасного (ИК) спектра. Учитывая, что многие микроорганизмы обладают специфичными ИК-спектрами, волоконная ИК-спектроскопия может использоваться для выявления изменений свойств биологических объектов. Иммобилизация антител внутри волокна позволяет осуществлять специфическую индикацию. На основе оптоволокон были разработаны иммуносенсоры для выявления капсульного антигена «фракция 1» чумного микроба [10, 11, 14] и антител к нему [12], для обнаружения протективного антигена сибиреязвенного микроба [13]. Чувствительность биосенсоров составила 5–50 нг/мл белка [10], время отклика – 1 мин [14]. Оптоволоконные биосенсоры нашли свое отражение в системе обнаружения ПБА RAPTOR™ (от англ. Rapid Automatic and Portable Fluorometer Assay System - быстрая автоматическая и портативная система флуориметрического анализа) (Research

International, США) [13, 19]. Биосенсор RAPTOR™ позволяет одновременно выявлять более 4 видов поражающих агентов, в том числе *F. tularensis*, рицин, стафилококковый энтеротоксин [13]. К достоинствам оптических биосенсоров следует отнести высокую чувствительность, малое время отклика (1–3 мин), бесконтактность и малое влияние электрических помех. Оптоволоконные биосенсоры могут осуществлять индикацию микроорганизмов без применения специфических молекул – по спектральным характеристикам патогенов, они удобны в обращении, малогабаритны и имеют низкую себестоимость, поэтому они наиболее перспективны при разработке средств сигнальной индикации патогенных биологических агентов.

Принципиально новым классом оптических биосенсоров являются биосенсоры на основе фотонно-кристаллических волокон с полый сердцевинкой [1, 6, 8, 9]. Принцип действия фотонно-кристаллических волноводов основан на обнаружении и идентификации биологических объектов по спектрам излучения, проходящего через полую сердцевину, заполненную исследуемым материалом, света в диапазоне длин волн от 200 нм до 1100 нм. Фотонно-кристаллические волноводы имеют каналы для заполнения рабочими растворами, введения пробы и реагентов. Суммарная площадь рабочей поверхности фотонно-кристаллического волокна в сотни и тысячи раз больше, чем у обычного оптического волокна и плазмонно-резонансной кюветы, что ведет к повышению чувствительности метода и скорости протекания реакции межмолекулярного взаимодействия. В настоящее время фотонно-кристаллические волокна рассматриваются как один из наиболее перспективных элементов волноводно-оптических датчиков физических величин. К числу основных преимуществ можно отнести защищенность от воздействия от электромагнитных полей, высокую чувствительность и надежность, воспроизводимость и широкий динамический диапазон измерений, возможность спектрального и пространственного мультиплексирования чувствительных элементов, малое время отклика на изменение измеряемой величины (1 мин), малые объемы пробы, малые габариты. В настоящее время в ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» при участии учреждений Роспотребнадзора ведется работа по конструированию биосенсоров для детекции возбудителей особо опасных инфекционных болезней на основе фотонно-кристаллических волноводов. Экспериментально установлено различие спектральных характеристик возбудителей чумы, холеры, их антигенов и специфических комплексов антиген-антитело, что позволяет проводить сигнальную индикацию микроорганизмов с использованием фотонно-кристаллических волокон. Данная работа является основой для последующей разработки комплекса средств индикации и идентификации возбудителей особо опасных инфекций для контроля биологиче-

ской безопасности при осуществлении мониторинга объектов окружающей среды.

Применение биосенсоров для сигнальной индикации возбудителей особо опасных инфекционных болезней позволит предотвратить распространение инфекции, в том числе при актах биотерроризма, снизить возможный социально-экономический ущерб от временной потери трудоспособности заболевшими гражданами за счет быстрого и своевременного проведения противоэпидемических мероприятий.

Работа выполнена по Государственному контракту № 113-Д от 11.06.2009 г. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоглазов В.И., Скибина Ю.С., Тучин В.В., Чайников М.В. Пропускание стеклянных фотонно-кристаллических волноводов с поллой сердцевиной». Письма в ЖТФ. 2005; 31(23):55–60.
2. Егоров А.А. Систематика, принцип работы и области применения датчиков. Журнал радиоэлектроники. 2009; 3:1–22.
3. Ефременко В.И., Кальной С.М., Бондаренко А.И., Швецова Н.В., авторы. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Способ детекции макромолекул биосенсорным устройством. РФ патент 2148259. 27.04.2000.
4. Иванов Ю.Д., Гнеденко О.В., Конев В.А. и др. Детекция поверхностного антигена вируса гепатита В с помощью оптического биосенсора. Вопросы медицинской химии: Научно-теоретический журнал. 2001; 47(4):419–25.
5. Карякин А.А., Уласова Е.А., Вагин М.Ю., Карякина Е.Е. Биосенсоры: устройство, классификация и функциональные характеристики. Сенсор 2002; 1:16–24.
6. Коноров С.О., Федотов А.Б., Белоглазов В.И., Скибина Н.Б., Щербак А.В., Желтиков А.М. Эволюция огибающей и фазы фемтосекундных импульсов в полых фотонно-кристаллических волокнах». Квантовая электроника. 2004; 34(1):51–5.
7. Онищенко Г.Г., редактор. Руководство по специфической индикации патогенных биологических агентов. М.: ЗАО «МП Гигиена»; 2006.
8. Слепов Н. Фотонное волокно – уже реальность. Новые типы оптических волокон. Электроника: Наука, Технология, Бизнес. 2004; 5:80–4.
9. Тучин В.В., Скибина Ю.С., Белоглазов В.И. и др. Сенсорные свойства фотонно-кристаллического волновода с поллой сердцевиной. Письма в ЖТФ. 2008; 34(15):63–9.
10. Anderson G.P., Breslin K.A., Ligler F.S. Assay development for a portable fiberoptic biosensor. ASAIJ. 1996; 42(6):942–6.
11. Anderson G.P., Jacoby M.A., Ligler F.S., King K.D. Effectiveness of protein A for antibody immobilization for a fiber optic biosensor. Biosens Bioelectron. 1997; 12(4):329–36.
12. Anderson G.P., King K.D., Cao L.K., Jacoby M., Ligler F.S., Ezzell J. Quantifying serum antiplague antibody with a fiber-optic biosensor. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1998; 5(5):609–12.
13. Anderson G.P., King K.D., Gaffney K.L., Johnson L.H. Multi-analyte interrogation using the fiber optic biosensor. Biosens. Bioelectron. 2000; 14(10–11):771–7.
14. Cao L.K., Anderson G.P., Ligler F.S., Ezzell J. Detection of *Yersinia pestis* fraction 1 antigen with a fiber optic biosensor. J Clin. Microbiol. 1995; 33(2):336–41.
15. Deisingh A. Biosensors for microbial detection. Microbiologist. 2003; 2:30–33.
16. Jyoung J.Y., Hong S., Lee W., Choi J.W. Immunosensor for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using surface plasmon resonance. Biosens. Bioelectron. 2006; 21(12):2315–9.

17. Lee W.E., Thompson H.G., Hall J.G., Bader D.E. Rapid detection and identification of biological and chemical agents by immunoassay, gene probe assay and enzyme inhibition using a silicon-based biosensor. Biosens. Bioelectron. 2000; 14(10–11):795–804.
18. Li Z.Z., Gong F.C., Shen G.L., Yu R.Q. Bacteria-modified amperometric immunosensor for a *Brucella melitensis* antibody assay. Anal. Sci. 2002; 18(6):625–30.
19. Lim D.V., Simpson J.M., Kearns E.A. et al. Current and Developing Technologies for Monitoring Agents of Bioterrorism and Biowarfare. Clin. Microbiol. Rev. 2005; 18(14):583–607.
20. Pohanka M., Pavlis O., Skládal P. Diagnosis of tularemia using piezoelectric biosensor technology. Talanta. 2007; 71(2):981–5.
21. Pohanka M., Skládal P. Piezoelectric immunosensor for the direct and rapid detection of *Francisella tularensis*. Folia Microbiol (Praha). 2007; 52(4):325–30.
22. Rao V.K., Sharma M.K., Goel A.K., Singh L., Sekhar K. Amperometric immunosensor for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using disposable screen-printed electrodes. Anal. Sci. 2006; 22(9):1207–11.
23. Salam F., Tohill I.E. Detection of *Salmonella typhimurium* using an electrochemical immunosensor». Biosens. Bioelectron. 2009; 24(8):2630–6.
24. Sharma M.K., Rao V.K., Agarwal G.S., Rai G.P. et al. Highly Sensitive Amperometric Immunosensor for *Plasmodium falciparum* Histidine Rich Protein-2 in the Serum of Humans with Malaria: Comparison with a Commercial Kit. J. Clin. Microbiol. 2008; 46(11):3759–65.
25. Wang D.B., Bi L.J., Zhang Z.P., Chen Y.Y., Yang R.F., Wei H.P. et al. Label-free detection of *B. anthracis* spores using a surface plasmon resonance biosensor. Analyst. 2009; 134(4):738–42.
26. Yean C.Y., Kamarudin B., Ozkan D.A., Yin L.S., Lalitha P., Ismail A. et al. Enzyme-linked amperometric electrochemical genosensor assay for the detection of PCR amplicons on a streptavidin-treated screen-printed carbon electrode. Anal. Chem. 2008; 80(8):2774–9.
27. Zhi-Zhang L., Fu-Chun G., Guo-Li S., Ru-Qin Y. Bacteria-modified amperometric immunosensor for a *Brucella melitensis* antibody assay. Anal. Sci. 2002; 18:625–30.

Об авторах:

Уткин Д.В., Осина Н.А., Куклев В.Е., Ерохин П.С., Щербак А.С., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

D.V.Utkin, N.A.Ossina, V.E.Kouklev, P.S.Erokhin, S.A.Scherbakova, V.V.Kutyrev

Biosensors: Current State and Prospects of Applying in Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

The review presents the functional characteristics of the main types of biosensors: electrochemical, piezoelectric and optical. Shown are the examples of biosensors application for pathogenic biological agents detection. The prospects of biosensors development for laboratory diagnostics of particularly dangerous infectious diseases are discussed.

Key words: biosensors, immunosensors, indication, particularly dangerous infectious diseases.

Authors:

Utkin D.V., Ossina N.A., Kouklev V.E., Erokhin P.S., Scherbakova S.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 02.11.09.