

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ РОЗРОБКИ ЕКСПРЕС-МЕТОДУ ВИЯВЛЕННЯ ЕНТЕРОВІРУСІВ У ВОДІ МЕТОДОМ ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ

З.С. Клестова¹, А.Ю. Ющенко¹, О.Ф. Блоцька¹, В.П. Маслов², Ю.В. Ушенін²,
Г.В. Дорожинський², С.О. Кравченко², Г.В. Дорожинська^{3*}

¹Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, Київ, Україна

²Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України, Київ, Україна

³КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

*Corresponding author: annakushnir30@ukr.net

Received 7 February 2019; Accepted 18 March 2019

Проблематика. У питній воді внаслідок антропогенного забруднення та низки інших факторів можуть бути присутні такі збудники, як ентеровіруси та інші віруси з водним фактором передачі. Ентеровіруси здатні викликати в людей ураження органів і систем різного ступеня тяжкості, що проявляються низкою клінічних симптомів. Для детекції вірусів застосовують відповідні методи досліджень, проте вони довготривалі та потребують спеціальних тест-систем і обладнання, що є суттєвим недоліком санітарно-вірусологічних досліджень якості питної води.

Мета. Вивчити принципову можливість використання явища поверхневого плазмонного резонансу (ППР) для виявлення у воді ентеровірусів (на прикладі тешовірусу свиней першого серотипу) і розробити на його основі новий експрес-метод їх детекції.

Методика реалізації. Для реалізації експресного виявлення збудників вірусних захворювань у воді методом ППР використовували прилад “Плазмон-6”, розроблений в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України. Дослідження взаємодії антигену вірусу та специфічної сироватки у воді виконували в Державному науково-контрольному інституті біотехнологій і штамів мікроорганізмів.

Результати. Теоретично обґрунтовано та експериментально доведено принципову можливість використання ППР для виявлення у дистильованій і питній воді ентеровірусів (на прикладі тешовірусу свиней) та розроблено експрес-метод їх детекції. Показано, що при виявленні збудника в дистильованій воді відгук ППР-сенсора в 1,57 разу більший, ніж у питній воді, що може бути пов'язано із впливом іонного складу води на взаємодію антигену з антитілом. Розроблений метод надає можливість у реальному часі відслідковувати зміни в досліджуваному середовищі, істотно скорочує тривалість виявлення ентеровірусів та не потребує використання дорогих живильних середовищ і реактивів.

Висновки. Теоретично обґрунтовано та експериментально доведено можливість застосування методу ППР і приладу “Плазмон-6”, що його реалізує, для експресного виявлення ентеровірусів у дистильованій і питній воді.

Ключові слова: ентеровіруси; поверхневий плазмонний резонанс; вода; виявлення збудника; експресний метод.

Вступ

Однією із сучасних глобальних проблем людства є незадовільний стан водних ресурсів та недостатня санітарія, які стають причиною приблизно 90 % випадків смертей від діарейних захворювань у всьому світі [1]. Добре відомо, що бактерії та найпростіші є збудниками багатьох діарейних захворювань, пов'язаних зі споживанням небезпечної питної води, але не менш значущими патогенами є віруси, які знаходяться в ній та негативно впливають на здоров'я людини. Всесвітня організація охорони здоров'я визначає такі патогенні для людей ві-

руси з водним фактором передачі. Це кишкові віруси: аденовіруси, астровіруси, віруси гепатиту А та Е, ротавіруси, норовіруси та інші каліцивіруси, а також ентеровіруси, включаючи віруси Коксаки А, Коксаки В та поліомієліту [2, 3]. Кишкові віруси викликають гострі гастроентерити, що зазвичай супроводжуються діареєю, блювотою, лихоманкою, болям у животі. Інші можуть бути причиною більш важких захворювань, включаючи енцефаліт, менінгіт, міокардит (ентеровіруси) та ураження печінки (віруси гепатиту А та Е) [2]. Ентеровіруси мають дуже низькі інфікуючі дози і викликають спалахи інфекційних захворювань, пов'язаних із забруд-

ненням питної води [4]. У багатьох країнах світу, в т.ч. і в Україні, спостерігається чітка тенденція до росту числа захворювань ентеровірусної етіології в структурі дитячих інфекційних захворювань [5–7], що корелює зі збільшенням частоти виявлення ентеровірусів у відкритих водоймах і стічних водах [8, 9]. Для профілактики отруєнь застосовуються препарати для знезараження індивідуальних запасів води, які зазвичай ефективні лише при мікробному забрудненні, але неефективні відносно вірусів, зокрема ентеровірусів [10, 11]. Досі, на жаль, немає регуляторних актів із визначення вірусів у питній воді в Україні [12].

З метою індикації та ідентифікації вірусів у воді в санітарній вірусології найчастіше використовують класичні вірусологічні методи, зокрема виділення та ідентифікацію ентеровірусів у реакції нейтралізації в живих системах. Експресні методи досліджень, такі як імуноферментний аналіз (ІФА), метод флуоресціюючих антитіл (МФА) і методи молекулярно-генетичної діагностики (ЗТ-ПЛР), розроблені недостатньо, що пов'язано з великим різноманіттям та високою варіабельністю ентеровірусів. Зважаючи на те що ентеровіруси дуже стійкі в довкіллі, а їх інфікуюча доза для людини становить 10–100 інфекційно активних вірусних частинок, розробка методичних підходів до індикації ентеровірусів в об'єктах довкілля, зокрема в питній воді, а також приладів для її проведення залишається сьогодні надзвичайно актуальною проблемою. У зв'язку з цим особливого значення набувають експериментально-теоретичне обґрунтування, розробка і застосування експрес-методів контролю якості питної води та мобільних невеликих за розмірами і вагою портативних систем для виявлення збудників ентеровірусних інфекцій у ній.

Одним із перспективних оптичних методів для аналізу різноманітних сполук і мікрооб'єктів та процесів, що відбуваються на молекулярному рівні, є рефрактометричний метод на основі явища поверхневого плазмонного резонансу (ППР). Вагомими перевагами цього методу порівняно з ІФА, МФА, ЗТ-ПЛР є: можливість вивчення процесів молекулярної взаємодії в нанорозмірних шарах у реальному часі; малий об'єм проби досліджуваної речовини (менше 10 мкл); відсутність потреби використання маркерів та флуоресцентних міток для досліджуваної речовини (аналіту) [13]. У приладах на основі явища ППР (ППР-приладах) переважно використовуються хімічні

та біологічні сенсори, які складаються з чутливого елемента і фізичного перетворювача. Біологічний сенсор відрізняється від хімічного наявністю на поверхні чутливого елемента біологічно активної речовини (рецептора), яка відповідає за селективність сенсора при аналізі взаємодій між біологічними об'єктами.

На основі попередніх досліджень якості питної води [14, 15] було доведено, що метод ППР дає можливість визначити як органічні, так і неорганічні домішки і може бути використаний для контролю ефективності процесу очищення води. Тому на основі цих результатів була запропонована концепція щодо можливості використання методу ППР для визначення патогенних мікроорганізмів у питній воді.

Мета роботи: вивчити принципову можливість використання явища ППР для виявлення у воді ентеровірусів (на прикладі тешовірусу свиней) і розробити на його основі новий експрес-метод їх детекції.

Матеріали і методи

Робота виконана спільно з Державним науково-контрольним інститутом біотехнологій і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ) у відділі біотехнології і контролю якості вірусних препаратів.

Для проведення дослідження було використано такі біологічні матеріали, хімічні реагенти (реактиви), обладнання.

Культури клітин. Перещеплювані субстрат-залежні, чутливі до тест-вірусу культури клітин із колекції Національного центру штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ, м. Київ): нирки поросяти – (РК-15), нирки новонародженого сирійського хом'ячка (ВНК-21) та клон 13 цієї ж лінії. Клітини культивували стандартним методом у посівній концентрації 200000 клітин/см³ у СО₂-інкубаторі при +37 °С, 5 %-ному вмісті СО₂ та вологості 88 % із подальшим контролем якості клітинних моношарів при мікроскопічному дослідженні. Всі культури клітин були тестовані на відсутність контамінації малоактивною мікрофлорою в тіогліколевому середовищі та м'ясо-пептонному бульйоні.

Живильні середовища, сироватки, допоміжні розчини. Для культивування використовували ростове живильне середовище “DMEM High Glucose”, w/L – Glutamine, w/o Sodium Pyruvate, Sterile Filtered (Biowest, США, серія S17885L0102, придатне до 26.07.2019) з додаванням фетальної сироватки крові великої рогатої худоби “Fetal

Bovine Serum Premium” (Biowest, США, серія S14317S181B, придатної до 28.01.2021) до 10% з додаванням антибіотиків: пеніциліну 100 Од/см³, стрептоміцину 100 мкг/см³, гентаміцину.

Як підтримувальне використовували аналогічне ростовому середовищу без сироватки.

Для зняття клітин з поверхні субстрату використовували суміш розчинів версену (0,02%, виробництва ДНКІБШМ, придатного до 27.05.2019) та трипсину (“Trypsin 0,25%”, w/o Calcium, w/o Magnesium, w/o Phenol Red, Sterile Filtered; виробник Biowest, USA, серія S16067L0910, придатного до 27.04.2020) (1:5).

Моношар клітин вирощували в полістиролових культуральних флаконах об’ємом 50 см³ та 96-лункових культуральних планшетах (Greiner Bio-One GmbH).

Усі роботи проводили в умовах спеціальних боксових приміщень, із використанням ламинарних шаф другого класу біобезпеки, з дотриманням вимог асептики й антисептики.

Тест-вірус. Як тест-вірус використовували ентеровірус свиней, штам *Teschovirus A* “Дніпровський 34”, люб’язно наданий для дослідницьких цілей Інститутом сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН (м. Чернігів, автори штаму: С.В. Дерев’яно, В.І. Сорока, А.О. Бокун, Л.В. Божок, Т.О. Бова, Н.В. Бабич). Цей штам вірусу виділений на території України з головного мозку 2-місячного поросяти, хворого на ензоотичний енцефалоїеліт (хворобу Тешена) свиней. Штам задепоновано в депозитарії Національного центру штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ за № 486. Також цей штам зберігається в колекції штамів ентеровірусів свиней Інституту ветеринарної медицини НААН. За паспортними даними цей штам накопичували попередньо в перещеплюваних лініях культур клітин нирки ембріона свині (СНЕВ) та нирки новонародженого сирійського хом’ячка (ВНК-21). Для досліджень використовували очищений вірус із культуральної рідини. Контроль чистоти очищеного антигену вірусу проводився спектрофотометрично, електронно-мікроскопічно і в непрямому варіанті ТІФА з антитілами до білків культури клітин СНЕВ.

Для досліджень на приладі “Плазмон” був використаний вірус, пасажований і титрований нами у ДНКІБШМ після зберігання протягом 1 року за мінусової температури (–70 °С) на рівні 3 пасажу в перещеплюваних культурах клітин ВНК-21, клон 13 і РК-15). Інфекційну активність визначали титруванням вірусу в

культурах клітин за мікрометодом. Титр вірусу розраховувався за методом Ріда і Менча і визначався в тканинних цитопатогенних дозах у 1,0 см³ (ТЦД₅₀/см³). Титр вірусу в культурах клітин ВНК-21, клон 13 і РК-15 становив $8,5 \pm 0,058 \lg$ ТЦД₅₀/см³, визначений за двома повторами ($n = 2$).

Гіперімунна сироватка. Використовувалась гіперімунна сироватка крові кроля до тест-вірусу – вірусу з титром 1:2048 (11 log₂ ВНА₅₀/см³), визначеним у реакції нейтралізації (РН) стандартним методом [16]. Сироватка крові була надана Інститутом сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН.

Реагенти. Для утворення й активації функціоналізованої поверхні чутливих елементів ППР-сенсора приладу “Плазмон” застосовували такі реагенти: 11-меркаптоундеканову кислоту (Merck, США), 11-меркаптоундеканол (Merck, США), 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодіїмід (EDC) (Merck, США), N-гідроксисукцинімід (NHS) (Merck, США), буфер MES у дистильованій воді (100 мг/мл) (Merck, США).

Прилад “Плазмон-6” (рис. 1), розроблений в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України [13], використовувався для дослідження взаємодії антигену тест-вірусу і антитіл гіперімунної сироватки методом ППР.

Основні характеристики приладу “Плазмон-6” наведені в табл. 1.

ППР-сенсор приладу “Плазмон-6” містить напівпровідниковий лазер з довжиною хвилі випромінювання 650 нм із р-поляризацією, скляну напівпентапризму, на робочій грані якої через імерсійну рідину розміщено скляну пластинку з металевим чутливим елементом і фотоприймач, що вимірює інтенсивність відбитого лазерного випромінювання від межі розділу скло–метал. Чутливий елемент являє собою шар золота товщиною 50 ± 2 нм з адгезійним



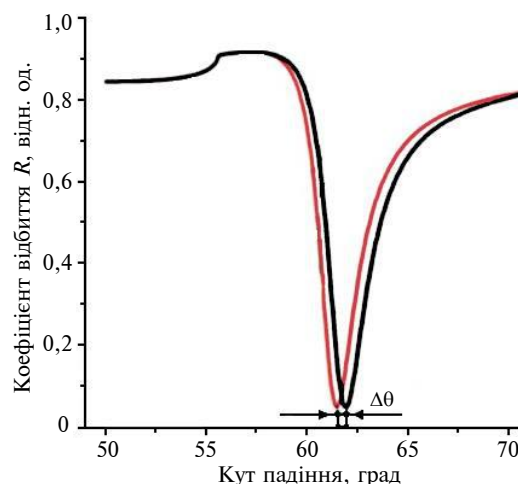
Рисунок 1: Зовнішній вигляд приладу “Плазмон-6” із ППР-сенсором

Таблиця 1: Основні технічні характеристики приладу “Плазмон-6”

Параметр	Одиниця вимірювання	Значення параметра
Діапазон вимірювання кута падіння	кут.град	38–70
Роздільна здатність по куту	кут.с	± 3
Час вимірювання резонансної характеристики	с	≤ 2
Кількість оптичних каналів	–	2
Додатковий канал для вимірювання потенціалу	Вольт	± 5
Підключення до комп'ютера	–	USB порт

підшаром хрому товщиною 4 ± 2 нм. На його поверхню через сепараторну прокладку з політетрафторетилену товщиною 0,1 мм встановлено вимірювальну кювету з поліметилметакрилату, що мала два канали об'ємом по 5 мкл із патрубками для введення та виведення біоматеріалу, активаторів та буферного розчину. Прилади серії “Плазмон” дають змогу в реальному часі спостерігати за зміною кутового положення резонансної характеристики ППР – залежності інтенсивності відбитого лазерного світла, вираженого через коефіцієнт відбиття R , від кута його падіння на межу скло–метал (рис. 2). Кутовий зсув резонансної характеристики $\Delta\theta$ виникає внаслідок зміни показника заломлення досліджуваного середовища при проходженні відповідних реакцій на поверхні чутливого елемента, а прилад дає можливість працювати з рідкими середовищами в діапазоні показників заломлення від 1,33 (дистильована вода) до 1,41.

Чутливі елементи ППР-приладу “Плазмон-6” виготовлено за технологією відповідно до способу [17]. Для функціоналізації металевої поверхні чутливі елементи одноразово занурювали в суміш розчинів 11-меркаптоундеканової кислоти ($0,88 \pm 0,01$ мг/см³) в абсолютному етиловому спирті (20 об. %) і 11-меркаптоундеканола ($0,22 \pm 0,01$ мг/см³) в абсолютному етиловому спирті (60 об. %) та витримували в герметичній ємності зі скла за температури 25 ± 1 °C протягом 12-ти год. Після витримки чутливі елементи промивали спочатку абсолютним етиловим спиртом, а потім дистильованою водою, занурюючи у відповідні рідини в чашці Петрі та витримуючи протягом 10 хв у кожній.

**Рисунок 2:** Залежність інтенсивності відбитого лазерного світла, вираженого через коефіцієнт відбиття R , від кута його падіння на межу скло–метал ППР-сенсора

Потім чутливі елементи встановлювали у вимірювальну двоканальну кювету приладу “Плазмон-6”. Біоматеріал по черзі прокачували через один канал вимірювальної кювети перистальтичним насосом зі швидкістю 10 мкл/хв для розчинів, що містили антигени й антитіла, та зі швидкістю 50 мкл/хв для фізіологічного розчину при відмиванні. Така швидкість була вибрана для мінімізації перепадів тиску в кюветі та забезпечення ламінарного руху рідини.

Перед проведенням дослідів здійснювали активацію функціонального покриття розчином EDC та NHS у буфері MES та N-гідроксисукциніміду (NHS) у співвідношенні 1:3 (EDC/NHS) протягом 15 хв. Потім іммобілізували очищений вірус, суспендований у дистильованій або питній воді, і в кінці прокачували розчини антитіл для зв'язування їх із рецептором. Другий канал був референтним для компенсації впливу зовнішніх факторів, таких як зміна температури навколишнього середовища. Через нього прокачували фізіологічний розчин. Усі дослідження проводилися за кімнатної температури (22 ± 1 °C). Нами було використано антиген із титрами $8,5 \pm 0,33$ Ig та $7,5 \pm 0,25$ Ig ТЦД₅₀/см³, тобто без розведення та з розведенням у 10 разів. Також була використана специфічна сироватка з титром специфічних антитіл до дослідного вірусу $11 \log_2$ ВНА₅₀/см³ та в розведенні (1:100 – $4,4 \log_2$ та 1:1000 – $1 \log_2$ ВНА₅₀/см³). Антиген і сироватка були розведені у дистильованій та питній воді. Методика проведення експерименту узагальнена в табл. 2. Дослідження проводилось у 3 етапи: 1) активація поверхні чутливого елемента; 2) іммобілізація антигену вірусу на чутливому елементі; 3) зв'язу-

Таблиця 2: Методика проведення експерименту

Етап	Реактив	Тривалість, хв	Швидкість, мкл/хв	Кут ППР, град	Концентрація
1	Дистильована вода	10	60	62,492	Провідність 2 ± 1 мкСм·см
	Буфер MES	12	60	63,717	100 мг/мл у дистильованій воді
	NHS/EDC	12	60	64,74	60/20 мг/мл у MES
	Буфер MES	7	60	63,817	100 мг/мл у дистильованій воді
	Дистильована та питна вода	20	60	62,639	Провідність 2 ± 1 та 450 ± 1 мкСм·см відповідно
2	Антиген вірусу	38	10	62,839	Титр $7,5 \pm 0,25$ lg, ТЦД ₅₀ /см ³
	Дистильована та питна вода	22	10	62,801	Провідність 2 ± 1 та 450 ± 1 мкСм·см відповідно
3	Дистильована та питна вода	7	10	62,800	Провідність 2 ± 1 та 450 ± 1 мкСм·см відповідно
	Сироватка з антитілами	45	10	63,136	$1 \log_2$ ВНА ₅₀ /см ³ (розведена у 1000 разів)
	Дистильована вода	30	10	63,035	Провідність 2 ± 1 мкСм·см

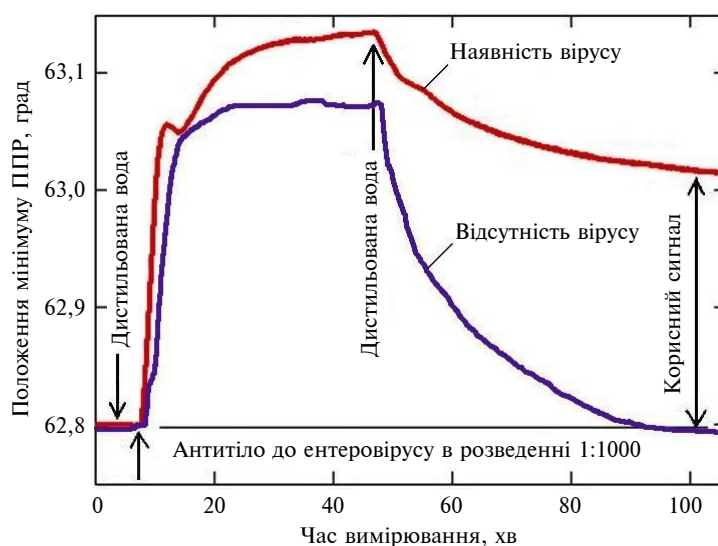
вання антигену з антитілами та подальше відмивання дистильованою водою. В табл. 2 вказані тривалості складових етапів, швидкості прокачування біоматеріалу через вимірювальну кювету приладу, концентрації реагентів і значення кутового положення мінімуму резонансної характеристики (кут ППР) для кожного реагенту.

Утворення комплексу антигену з антитілом на поверхні сенсора визначалось за кутовим зсувом мінімуму резонансної характеристики ППР у часі. Після взаємодії протягом

45 хв чутливий елемент промивали дистильованою водою для вилучення сироватки, що не зв'язалася з антигеном.

Результати

Показана кінетика взаємодії антигену з антитілом у випадку наявності та відсутності вірусів у дистильованій воді (рис. 3). За відсутності вірусу кутове положення резонансної характеристики поверталось до початкового значення. Найбільший кутовий зсув спостерігався



Рисуюнок 3: Кінетика взаємодії антигену зі специфічним антитілом у випадку наявності та відсутності вірусів у дистильованій воді. Титри: специфічних до вірусу антитіл у дослідному зразку сироватки – $1 \log_2$ ВНА₅₀/см³ (за розведення 1:1000), антигену – $7,5 \pm 0,25$ lg ТЦД₅₀/см³

при взаємодії антигену з титром $7,5 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ із нерозведеною сироваткою у дистильованій воді (рис. 4). За наявності вірусу в дистильованій воді вимірне значення кутового зсуву становило 720 ± 10 кут.с.

Для подальших досліджень було визначено за доцільне використовувати розведення антигену з титрами $7,5 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ та зі специфічною сироваткою з рівнем специфічних антитіл $11 \log_2 \text{ВНА}_{50}/\text{см}^3$ відповідно, оскільки саме такі концентрації дають змогу уникнути неспецифічного зв'язування з рецепторами функціональної поверхні. Досліджували взає-

модію антигену і специфічних антитіл сироватки у різних рідинах, а саме у дистильованій та питній воді. Значення рН для дистильованої води – 6,88, для питної – 7,84. Було використано антиген з титром $7,5 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ та сироватку специфічну з титром $11 \log_2 \text{ВНА}_{50}/\text{см}^3$. На рис. 5 показано порівняння кінетики взаємодії антиген–антитіло у дистильованій та у питній воді.

За наявності вірусу в питній воді вимірне значення кутового зсуву становило 140 ± 10 кут.с, тобто в 1,57 рази менше, ніж аналогічні значення для дистильованої води.

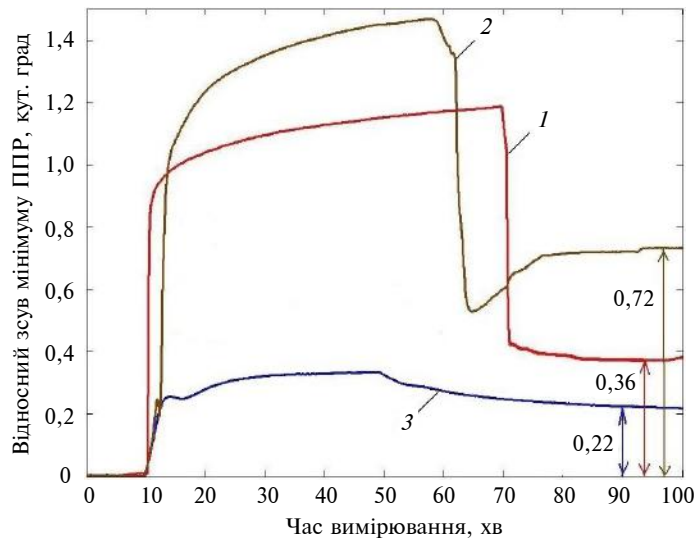


Рисунок 4: Кінетика зв'язування антигену зі специфічним антитілом за різних рівнів їх титрів: 1 – антиген із титром інфекційної активності $8,5 \pm 0,33 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, специфічні антитіла $11 \log_2 \text{ВНА}_{50}/\text{см}^3$; 2 – антиген із титром інфекційної активності $7,5 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, специфічні антитіла $11 \log_2 \text{ВНА}_{50}/\text{см}^3$; 3 – антиген із титром інфекційної активності $7,5 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, специфічні антитіла $1 \log_2 \text{ВНА}_{50}/\text{см}^3$

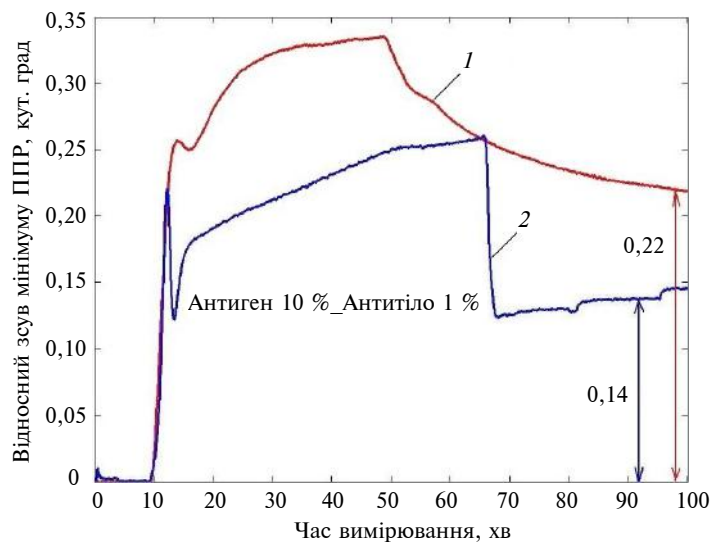


Рисунок 5: Кінетика взаємодії у дистильованій (1) та у питній (2) воді антигену з антитілом із титрами відповідно: антиген із титром інфекційної активності $7,5 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, специфічні антитіла $1 \log_2 \text{ВНА}_{50}/\text{см}^3$

Обговорення

Ефективність профілактики інфекцій людини і тварин, спричинених вірусами з водним фактором передачі, залежить від їх своєчасного виявлення у воді, в т.ч. і в питній. Найчастіше з цією метою використовують класичні вірусологічні методи, виділення та ідентифікацію ентеровірусів у реакції нейтралізації в живих системах. Цей метод і на сьогодні є еталонним, однак він трудомісткий, потребує використання культури клітин, дорогих живильних середовищ, існує небезпека контамінації культур клітин сторонньою мікрофлорою. В результаті тривалість діагностичних досліджень збільшується до 30 діб. Експресні методи досліджень, такі як ІФА, МФА і ЗТ-ПЛР, розроблені не достатньо. Останні досягнення молекулярної біології дали можливість розробити деякі тест-системи для ідентифікації тешо-, ентеровірусів свиней методом ЗТ-ПЛР, проте вони мають досить істотні відмінності в чутливості (0,627–0,984) і специфічності (0,89–1,0) при тривалості досліджень 8 год [18]. Тому розробка методичних підходів до індикації ентеровірусів в об'єктах довкілля, зокрема в питній воді, а також приладів для її проведення дасть змогу уникнути недоліків зазначених методів.

Прилади серії “Плазмон” дають можливість у реальному часі спостерігати хімічні та біохімічні реакції, які перебігають поблизу поверхні чутливого елемента ППР-сенсора (до 0,5 мкм). Межа детектування приладу становить 10 кут.с, що відповідає зміні показника заломлення на величину $3 \cdot 10^{-5}$, або адсорбції білка масою 1 пг на поверхні чутливого елемента площею 1 мм² [19]. Нами проведено експериментально-теоретичне обґрунтування та оцінювання принципової можливості використання явища ППР та приладу “Плазмон” для детекції наявності ентеровірусів у воді.

У роботі використано проби дистильованої та питної води, контаміновані тешовірусом. Вибір тешовірусу як тест-вірусу при проведенні досліджень обумовлений тим, що він є типовим представником родини *Picornaviridae* і за своєю будовою та фізико-хімічними властивостями не відрізняється від ентеровірусів, патогенних для людини. Він добре культивується у стандартних клітинних культурах із високим титром накопичення збудника в культуральній рідині, проте не є патогенним для людини, що дає можливість проводити дослідження в лабораторіях загального режиму.

Досліджувані проби дистильованої та питної води перебували в однакових умовах і були контаміновані тешовірусом з визначеним інфекційним титром. Утворення комплексу тест-вірусу зі специфічним антитілом гіперімунної сироватки на поверхні чутливого елемента визначалось за величиною кутового зсуву, що детектувався приладом “Плазмон” після промивання сенсорного чутливого елемента. Кутовий зсув є корисним сигналом, гранична величина якого свідчить про наявність або відсутність комплексу антигену зі специфічним антитілом і, відповідно, про наявність або відсутність вірусу в досліджуваній пробі води.

Експериментальні дослідження показали позитивний результат з виявлення вірусного антигену у воді методом ППР за різних розведень як інфекційно активного вірусу, так і специфічних антитіл імунної сироватки. Було визначено оптимальні їх співвідношення. Найкращі результати виявлення тест-вірусу отримали при застосуванні дистильованої води порівняно з питною за однакових температурних умов. Встановлено, що значення кутового зсуву для взаємодії антиген–антитіло в питній воді менше, ніж значення при аналогічних дослідженнях у дистильованій воді, що можна пояснити наявністю домішок або негативного впливу лужного рН питної води на алкантіолове покриття чутливого елемента ППР-сенсора. Таким чином, виявлення антигену в питній воді ускладнюється наявністю домішок.

Результати проведених досліджень з використанням приладу “Плазмон-6” дають змогу позитивно оцінити можливість застосування методу ППР для виявлення ентеровірусів у воді (на прикладі тешовірусу свиней). Перевага запропонованого методу порівняно з класичними вірусологічними і навіть експресними методами детекції вірусів у воді полягає в тому, що з'являється можливість у реальному часі спостерігати та вивчати взаємодію антигену вірусу, що виявляється, з антитілом діагностичної сироватки, при цьому час дослідження скорочується з кількох діб до менш ніж години і не потрібне використання високовартісних реагентів. Разом із цим метод ППР може бути застосований для виявлення інших патогенних вірусів за умов використання високоспецифічних імунних сироваток до них.

Таким чином, проведені дослідження теоретично обґрунтовують та експериментально доводять принципову можливість використання ППР для виявлення ентеровірусів (на при-

кладі тешовірусу свиней) у дистильованій і питній воді та дають можливість запропонувати експрес-метод їх детекції з використанням приладу “Плазмон-6”. Показано, що при виявленні збудника у дистильованій воді відгук ППР-сенсора в 1,57 разу більший, ніж у питній воді, що може бути пов’язано із впливом іонного складу води на взаємодію антигену з антитілом.

Висновки

Теоретично обґрунтована і експериментально доведена можливість застосування методу ППР і приладу “Плазмон-6”, що реалізує

цей метод, для експресного виявлення ентеровірусів у дистильованій та питній воді. Запропонований метод дає змогу в реальному часі відслідковувати зміни в досліджуваному середовищі, скорочує тривалість виявлення ентеровірусів та не потребує використання дорогих живильних середовищ і реактивів.

Подальші дослідження дадуть можливість підвищити чутливість та специфічність запропонованого методу. В перспективі метод ППР може бути використаний для виявлення інших патогенних вірусів за умов використання високоспецифічних імунних сироваток до них.

References

- [1] Gall AM, Mariñas BJ, Lu Y, Shisler JL. Waterborne viruses: a barrier to safe drinking water. *PLoS Pathog.* 2015;11(6):e1004867. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004867
- [2] WHO. Guidelines for drinking-water quality. 4th ed. Geneva: WHO Press; 2011.
- [3] Melnichenko OM, Mushtuk IU, Marchenko MI, Tashuta VS, Dremuh YuU, Klestova ZS. Enterovirus and their role in infectious pathology. *Veterynarna Biotekhnolohia.* 2014;24:105-14. Available from: http://nbuv.gov.ua/UJRN/vbtb_2014_24_22
- [4] Fong TT, Lipp EK. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005;69(2):357-71. DOI: 10.1128/mmbr.69.2.357-371.2005
- [5] Martynova GP. Enterovirus (nepolio) infection in children. *Sibirskoe Meditsinskoe Obozrenie.* 2014;3:100-5.
- [6] Sorokina MN, Skripnichenko NV. Viral encephalitis and meningitis in children: a guide for doctors. Moscow: Meditsina; 2004. 416 p.
- [7] Shevtsova NP, Golubeva MV. Neurological manifestations of enterovirus infection. *Detskie Infektsii.* 2004;3:49-52.
- [8] Doan SI, Bondarenko VI, Zadorozhnaya VI. Characteristic of enterovirus contamination of open water reservoirs. *Voda i Vodoochisni Tehnologiyi.* 2005;4:32-5.
- [9] Doan SI. Epidemiological analysis of the incidence of enterovirus infections, taking into account clinical manifestations, age and territorial distribution. *Zaporozhskiy Meditsynskiy Zhurnal.* 2006;2:62-7.
- [10] Rotbart HA. Meningitis and encephalitis. *Human enterovirus infections.* Washington: ASM Press;1995. p. 271-89.
- [11] Ischanova IL, Sagynbaeva BA, Umarova RA, et al. Modern clinical course of serous meningitis of enteroviral etiology. *Vestnik Yuzhno-Kazhstanskoy Meditsynskoy Akademii.* 2006;2:58-9.
- [12] DSanPiN 2.2.4-171-10. Hygienic requirements for drinking water intended for human consumption. Kyiv: Ministry of Justice of Ukraine; 2010. No. 452/17747.
- [13] Dorozinsky GV, Maslov VP, Ushenin YuV. Sensory devices based on surface plasmon resonance. Kyiv: Politekhnik; 2016. 264 p.
- [14] Bezruk ZD, Radov DG, Maslov VP, Dorozinsky GV, Dorozinska HV, Konchenko AV. Investigation of regularities of water purification by freezing method. *Naukovyi Visnyk Kharkivskoho Politekhnichnoho Instytutu.* 2016;50:137-41.
- [15] Dorozinska HV, Maslov VP, Dorozinsky GV. Modeling the SPR-sensor response to low concentrations of water nanosuspensions. *J Multidisciplinary Eng Sci Stud.* 2017;3(8):2007-11.
- [16] Romanenko VF, Soroka VI, Pruss OG. Recommendations for the diagnosis and control of enzootic encephalomyelitis (Teshen disease) of swine. Chernihiv; 1999. 16 p.
- [17] Dorozinsky GV, DoroshenkoTP, Maslov VP. Influence of technological factors on sensitivity of analytical devices based on surface plasmon resonance. *J Sensor Technol.* 2015;5(2):54-61. DOI: 10.4236/jst.2015.52006
- [18] Jiménez-Clavero MA, Fernández C, Ortiz JA, Pro J, Carbonell G, Tarazona JV, et al. Teschoviruses as indicators of fecal contamination of water. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(10):6311-5. DOI: 10.1128/aem.69.10.6311-6315.2003
- [19] Stenberg EB, Persson B, Roos H, Urbaniczky C. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radio labelled proteins. *J Colloid Interface Sci.* 1991;143(2):513-26. DOI: 10.1016/0021-9797(91)90284-f

З.С. Клестова, А.Ю. Ющенко, О.Ф. Блоцкая, В.П. Маслов, Ю.В. Ушенин, Г.В. Дорожинский, С.А. Кравченко, А.В. Дорожинская

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ РАЗРАБОТКИ ЭКСПРЕСС-МЕТОДА ВЫЯВЛЕНИЯ ЭНТЕРОВИРУСОВ В ВОДЕ МЕТОДОМ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА

Проблематика. В воде в результате антропогенного загрязнения и ряда других факторов могут присутствовать такие возбудители, как энтеровирусы и другие вирусы с водным фактором передачи. Энтеровирусы способны вызывать у людей поражения органов и систем различной степени тяжести, проявляющиеся рядом клинических симптомов. Для детекции вирусов применяют соответствующие методы исследований, однако они длительные и требуют специальных тест-систем и оборудования, что является существенным недостатком санитарно-вирусологических исследований качества питьевой воды.

Цель. Изучить принципиальную возможность использования явления поверхностного плазмонного резонанса (ППР) для выявления в воде энтеровирусов (на примере тешовируса свиней первого серотипа) и разработать на его основе новый экспресс-метод их детекции.

Методика реализации. Для реализации экспрессного выявления возбудителей вирусных заболеваний в воде методом ППР использовали прибор "Плазмон-6", разработанный в Институте физики полупроводников им. В.Е. Лашкарева НАН Украины. Исследование взаимодействия антигена вируса и специфической сыворотки в воде выполняли в Государственном научно-контрольном институте биотехнологий и штаммов микроорганизмов.

Результаты. Теоретически обоснована и экспериментально доказана принципиальная возможность использования ППР для выявления в дистиллированной и питьевой воде энтеровирусов (на примере тешовируса свиней), и разработан экспресс-метод их детекции. Показано, что при обнаружении возбудителя в дистиллированной воде отзыв ППР-сенсора в 1,57 раза больше, чем в питьевой воде, что может быть связано с влиянием ионного состава воды на взаимодействие антигена с антителом. Разработанный метод позволяет в реальном времени отслеживать изменения в исследуемой среде, существенно сокращает продолжительность обнаружения энтеровирусов и не требует использования дорогих питательных сред и реактивов.

Выводы. Теоретически обоснована и экспериментально доказана возможность применения метода ППР и прибора "Плазмон-6", реализующего этот метод, для экспрессного выявления энтеровирусов в дистиллированной и питьевой воде.

Ключевые слова: энтеровирусы; поверхностный плазмонный резонанс; вода; выявление возбудителя; экспрессный метод.

Z.S. Klestova, A.Yu. Yuschenko, O.F. Blotska, V.P. Maslov, Yu.V. Ushenin, G.V. Dorozinsky, S.O. Kravchenko, H.V. Dorozinska

EXPERIMENTAL AND THEORETICAL SUBSTANTIATION OF THE EXPRESS METHOD DEVELOPMENT FOR DETECTION OF ENTEROVIRUSES IN WATER BY SURFACE PLASMON RESONANCE METHOD

Background. As a result of anthropogenic pollution and number of other factors, in drinking water can be present some viruses such as enterovirus and other pathogens that can be transmitted by water. Enteroviruses are capable of causing lesions of organs and systems of varying severity in humans, manifested by a number of clinical symptoms. For the detection of viruses appropriate research methods were developed, but they take a lot of time and require special reagents and equipment, that is significant drawback of sanitary-virological studies of drinking water quality.

Objective. The aim of the paper is to study the general possibility of using a surface plasmon resonance (SPR) phenomenon for detection of enteroviruses in water samples (swine Teschovirus A as an example) and to create on its basis a new express diagnostic method.

Methods. For implementation of a method for rapid detection of viral diseases pathogens in water by using SPR, the Plasmon-6 device was developed at the Institute of V.E. Lashkaryov Institute of Semiconductor Physics NAS of Ukraine. The research on the interaction of antigen and specific serum in various buffers was held at the State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms.

Results. A general possibility of using SPR to detect enteroviruses in distilled and drinking water (swine Teschovirus A as an example) was theoretically substantiated and experimentally proved, and the express method for their detection was developed. It is shown that upon detection of pathogen in distilled water, the response of the SPR sensor is 1.57 times higher than in drinking water, which may be due to the influence of ionic composition in water on the interaction of the antigen with the antibody. The developed method allows real-time monitoring of changes in the test environment, significantly reduces the duration of enteroviruses detection and does not require the use of expensive nutrient media and reagents.

Conclusions. The possibility of using the SPR method and the "Plasmon-6" device implementing this method for express detection of enteroviruses in distilled and drinking water was theoretically substantiated and experimentally proved.

Keywords: enteroviruses; surface plasmon resonance; water; detection of the pathogen; rapid method.