

Wykrywanie wirusów

Marcin Łoś

Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

Instytut Chemii Fizycznej PAN, Wydział III, Kasprzaka 44/52 01-224 Warszawa

Wstęp

Wirusy są najliczniejszymi organizmami na Ziemi – ich całkowita liczbę ocenia się na 10^{31} . Mają bardzo prostą budowę: zewnętrzna warstwę stanowi otoczka białkowa lub lipidowo białkowa, a wewnątrz znajduje się kwas nukleinowy. Mimo tego, że niektóre posiadają jeszcze dodatkowe struktury, te dwie są najistotniejsze w przypadku prób wykrycia wirusa. Zewnętrzna otoczka białkowa lub białkowo-lipidowa jest głównym elementem wykrywanym przez układ immunologiczny. Obecne tam receptory są niezbędne w procesie infekowania komórki. Zawarty w wirionie kwas nukleinowy umożliwia bardzo precyzyjną identyfikację wirusa i jest podstawą do wykrywania wirusów w testach wykorzystujących amplifikację i/lub hybrydyzację kwasów nukleinowych.

Wykrywanie wirusów jest bardzo istotne w wielu dziedzinach takich jak ochrona zdrowia, produkcja żywności, procesy biotechnologiczne, ochrona roślin oraz wykrywanie potencjalnego ataku bronią biologiczną – zarówno na polu walki jak i, w związku z nasilającym się terroryzmem, w obiektach cywilnych. W każdym z powyższych zastosowań do prawidłowego wykrywania wirusów niezbędne są nieco inne parametry. W produkcji żywności na przykład niezbędne jest precyzyjne wykrywanie wirusów w bardzo złożonych próbkach, często o bardzo małych zawartościach wody. Z kolei do detekcji ataku bronią biologiczną niezbędne jest prawidłowe wykrycie małych ilości wirusa krążących w powietrzu. Mimo wielu indywidualnych wymagań, jakie niosą ze sobą poszczególne zastosowania, jest wiele wspólnych cech, które powinien posiadać sensor zdolny do wykrywania wirusów: powinien być czuły lecz odporny na wyniki fałszywie dodatnie, szybki, tani i możliwy do pełnej automatyzacji. Ze względu na to, że w zasadzie dotychczas nie zostały skonstruowane sensory w pełni spełniające wszystkie niezbędne wymagania, dziedzina ta rozwija się bardzo szybko a badacze przyjmują wiele różnych strategii umożliwiających wykrycie wirusa. W niniejszej pracy omówię różne podejścia do wykrywania wirusów.

Metody bazujące na aktywności wirusa

Testy łysinkowe

Wirus zakażając komórki powoduje zmiany, które dają się zaobserwować lub zmierzyć. Tradycyjnie wirusy wykrywane są na podstawie tego, że są w stanie generować łysinki na murawach bakteryjnych (Łoś i wsp. 2008a) i na warstwach komórek (Espinoza i Kuznar 2002) oraz powodować ich zmiany morfologiczne możliwe do zaobserwowania pod mikroskopem świetlnym (). Niewątpliwą zaletą takiego podejścia jest stosunkowo duża czułość takiego testu oraz jego stosunkowo mała specyficzność, co pozwala na wykrycie również wirusów, które nie były nam dotychczas znane lub

których obecność w danym miejscu nie była przewidziana. Wadą jest długi czas niezbędny do detekcji i niemal całkowity brak automatyzacji metody. Ponadto dużej części wirusów nie potrafimy hodować w warunkach sztucznych. Przykładem takich wirusów są *Caliciviridae* powodujące zatrucia pokarmowe (Gerba i Kayed 2003). Kolejną wadą, która ponadto nie jest ograniczona jedynie do tego typu metod detekcji, jest brak możliwości wykrywania wirusów, które zostały opłaszczane przez przeciwciała (Kreil i wsp.1997). W wielu przypadkach metody te wykazują znacznie niższą czułość w porównaniu z metodami bazującymi na amplifikacji DNA. Może to być spowodowane stosunkowo niską ilością infekcyjnych cząstek fagowych w całkowitej populacji wirusów potomnych (Kreil i wsp.1997, Ellis i wsp. 1997, Schweiger i wsp. 2000).

Bioelectric Recognition Assay (BERA)

Żywe komórki w trakcie zakażenia wirusem mogą generować mierzalny sygnał. Sygnał mierzony w czasie zakażenia komórki może pochodzić ze zmiany potencjału błonowego towarzyszącej zakażeniu (Kintzios i wsp. 2004) lub z przepływu jonów uwalnianych z wnętrza komórki (Dobozi-King i wsp. 2005). Użycie linii komórkowych wrażliwych na zakażenie wirusami, które mają być wykryte, pozwala na zarejestrowanie tego typu sygnałów. BERA bazuje właśnie na takich liniach komórkowych. Komórki zawieszane są w matrycy żelowej zawierającej również elektrody. Dodanie próbki zawierającej wirusy powoduje zmianę mierzonego na elektrodach prądu. Zmiana napięcia wynosi kilka mV i występuje 1-2 minut po dodaniu próbki zawierającej wirusa. Graniczna czułość metody wynosi 0,1 ng wirusa (Kintzios i wsp. 2001a , Kintzios i wsp. 2001b).

Sensing of Phage-Triggerred Ion Cascade (SEPTIC)

W trakcie zakażenia bakterii przez faga następuje czasowe uszkodzenie błony komórkowej, które umożliwia uwolnienie jonów z komórki na zewnątrz. W tym procesie z pojedynczej komórki uwalniane jest około 10^8 jonów. Jony takie można wykryć na przykład pomiędzy okładkami kondensatora przez pomiar fluktuacji pola elektrycznego. Wprawdzie działanie systemu zostało zademonstrowane na stosunkowo dużej ilości bakterii, teoretycznie system po wprowadzeniu ulepszeń takich jak np. zmniejszenie pojemności elektrycznej przewodów łączących okładki kondensatora z miernikiem, jest zdolny do wykrycia 1 komórki bakteryjnej (Dobozi-King i wsp. 2005).

Techniki oparte o amplifikację DNA

PCR

Reakcja łańcuchowa polimerazy jest aktualnie jedną z najczęściej wykorzystywanych metod w wykrywaniu patogenów jakimi są na przykład wirusy. Szczególnie godna polecenia jest ona w wykrywaniu małych ilości wirusa lub wykrywania wirusa w bardzo małych próbkach. Metoda działania polega na amplifikacji fragmentu DNA ograniczonego z obu stron znanymi sekwencjami. Wykorzystuje ona naturalne właściwości polimerazy DNA, które pozwalają jej przedłużać krótkie fragmenty DNA, które hybrydują do dłuższej matrycy. Metodę tą można zastosować również do RNA, jednak wymagany jest wtedy dodatkowy etap polegający na przepisaniu RNA na DNA przez

odwrotną transkryptazę. Reakcja łańcuchowa Polimerazy jest często stosowana jako wstępny etap detekcji w celu namnożenia DNA do poziomu wykrywalnego daną metodą.

Mimo niewątpliwych zalet PCR zarówno jako samodzielna metoda detekcji jak i wstępna amplifikacja jest podatna na błędy. Wyniki fałszywie pozytywne mogą się zdarzyć w przypadku skażenia próbki DNA pochodzącym z innej reakcji PCR. Możliwe są one do uniknięcia dzięki przestrzeganiu rygorystycznych zasad przygotowywania reakcji i prowadzenia analizy jej wyników, które zapobiegają tworzeniu i rozprzestrzenianiu aerozoli. Alternatywnie można zastosować systemy, które selektywnie niszczą DNA amplifikowane w poprzednich reakcjach jednocześnie zachowując niezmienną DNA pochodzące z próbki (Tetzner 2009). Kolejnym problemem mogącym wystąpić w przypadku reakcji PCR są wyniki fałszywie ujemne. Mogą one być spowodowane obecnością inhibitorów polimerazy Dna w próbce. Część z takich inhibitorów, takich jak na przykład kwasy humusowe, jest stosunkowo trudna do oddzielenia z próbki nawet przy użyciu metod oczyszczania DNA. Kolejnym problemem może być niewystarczająca czułość, która wynika z małych objętości reakcji zwykle nie przekraczających 50 μ l, w której zawartość próbki rzadko przekracza 50%.

Problemy z niewielką czułością oraz zanieczyszczeniami do pewnego stopnia mogą być rozwiązane, jeśli używa się systemów pozwalających wzbogacić próbkę w poszukiwany materiał. Jedną z takich metod jest wykorzystanie perełek paramagnetycznych (Kobayashi i wsp. 2004), lub innych materiałów takich jak „Viri-Chip” (Radke i wsp. 2004) opłaszczonych przeciwciałami w celu wychwycenia i zagęszczenia poszukiwanego wirusa. Pozwala to wychwycić wirusy występujące w małych ilościach w dużych próbkach i zagęścić je do małych objętości bez przenoszenia zanieczyszczeń obecnych w próbce.

Przy użyciu techniki PCR możliwe jest wykrycie kilku różnych wirusów w jednej reakcji, dzięki zastosowaniu kilku różnych par starterów. Startery można zaprojektować tak, żeby każda para dawała produkt o innej długości, co z kolei pozwala wykryć przy pomocy elektroforezy, która para starterów dała produkt w reakcji, a co za tym idzie, jaki materiał genetyczny znajdował się w próbce (Nassuth i wsp. 2000).

Mimo swoich ograniczeń PCR w niektórych przypadkach wykazuje znacznie większą czułość niż klasyczne metody oparte na zakażeniu żywych komórek. Tak jest w przypadku np. wirusów Dengi oraz Zachodniego Nilu, gdzie każda cząstka wirusowa, która jest zdolna do zakażenia przypada na 500-600 obserwowanych czasek (Wengler 1989, Marianneau i wsp. 1996).

Klasyczny PCR pozwala na wykrycie około 10 kopii DNA na reakcję. W celu zwiększenia czułości przy jednoczesnym zwiększeniu specyficzności tej metody opracowano technikę nested-PCR (Schweiger i wsp. 2000). Polega ona na zrobieniu dwóch kolejnych reakcji PCR, przy czym druga prowadzona jest przy użyciu pary starterów zlokalizowanej wewnątrz sekwencji amplifikowanej w pierwszej reakcji. Pierwsza reakcja służy jako matryca do drugiej. Mimo zwiększenia czułości i specyficzności reakcji, ze względu na zwiększenie ilości manipulacji z produktami PCR, znacznie rośnie też ryzyko zanieczyszczenia laboratorium amplifikowanym DNA i w rezultacie wystąpienia wyników fałszywie dodatnich w późniejszych reakcjach (Iqbal i wsp. 2000).

Problem zanieczyszczeń mogących dawać wyniki fałszywie dodatnie został rozwiązany w technice PCR czasu rzeczywistego (real-time PCR). Dzięki temu, że powstający produkt jest wykrywany w czasie reakcji, udało się wyeliminować ryzyko związane z analizą produktów reakcji. Metoda ta

wykorzystuje zmianę fluorescencji próbki związaną odpowiednio z interkalacją barwnika do dwuniciowego DNA lub fizyczną separacją fluoroforu i wygaszacza. Ta ostatnia uzyskiwana jest w wyniku odpowiedniej konstrukcji sondy z jednoniciowego DNA, która zawiera zarówno wygaszcz, jak i fluorofort umieszczone bardzo blisko siebie. Możliwe jest kilka kombinacji ułożenia tych dwóch elementów, które w wyniku amplifikacji zostają następnie rozdzielone (Mackay 2004). PCR czasu rzeczywistego jest aktualnie jedną z najczęściej stosowanych metod szybkiego wykrywania wirusów. W stosunku do tradycyjnego PCR, poza znacznie zmniejszoną podatnością na generowanie zanieczyszczeń amplifikowanym materiałem genetycznym, charakteryzuje się znacznie zwiększoną czułością wynosząca 1 kopię DNA lub RNA na reakcję (Reid i wsp. 2004), skróconym czasem reakcji, znacznie przyspieszonym generowaniem wyniku oraz możliwością ilościowej oceny zawartości amplifikowanego materiału genetycznego w próbce. Głównymi wadami tej metody są stosunkowo wysokie (lecz systematycznie spadające) koszty zakupu aparatury, znacznie utrudniona konstrukcja testów multipleksowych oraz znacznie trudniejsza optymalizacja metody i dobór starterów. Mimo ograniczeń metoda ta jest z powodzeniem stosowana w wykrywaniu coraz większej liczby wirusów takich jak: wirus choroby pęcherzykowej świń (Reid i wsp. 2004), ludzki metapneumowirus (Mackay i wsp. 2003), wirus Zachodniego Nilu (Lanciotti i wsp. 2000, Shi i wsp. 2001, Komar i wsp. 2002), wirus żółtaczkowy typu B (Pas i wsp. 2000) i C (Komurian-Pradel i wsp. 2004), wirus opryszczki (Schalasta i wsp. 2000, Espy i wsp. 2001), Ludzki i bydlęcy wirus RSV (van Elden i wsp. 2003, Achenbach i wsp. 2004), wirusy Norwalk (Richards i wsp. 2004), wirusy grypy (Schweiger i wsp. 2000), Wirus Nipah (Guilliams i wsp. 2004), ortopoxwirusy (Olson i wsp. 2004), wirus gorączki Doliny Ryftowej (Garcia i wsp. 2001), wirus cytomegalii (Najjoulah i wsp. 2001) i wiele innych.

NASBA

Kolejną metodą pozwalającą na wykrywanie wirusów jest oparta na sekwencji amplifikacja kwasów nukleinowych (NASBA). W przeciwieństwie do PCR umożliwia ona izotermiczną amplifikację w której preferowanym kwasem nukleinowym jest RNA. Wykorzystuje ona trzy różne enzymy: polimerazę RNA faga T7, RNazę H i odwrotną transkryptazę. Ponadto wymaga użycia dwóch starterów. Jeden z nich jest dłuższy i zawiera na końcu 5' promotor rozpoznawany przez polimerazę RNA faga T7, a na końcu 3' fragment komplementarny do poszukiwanej sekwencji RNA. Fragment ten pozwala na hybrydyzację z docelowym RNA, co z kolei zapoczątkowuje przepisanie RNA do cDNA przez odwrotną transkryptazę. Z hybrydy RNA-cDNA, która powstaje w tym procesie RNA jest usuwana przez RNazę H. cDNA hybryduje z komplementarnym starterem, który umożliwia odwrotnej transkryptazie syntezę komplementarnej nici. W ten sposób powstała nić dsDNA jest matrycą umożliwiającą syntezę dużych ilości RNA przez polimerazę. Ta metoda pozwala na bardzo wydajną amplifikację RNA, pozwalającą powielić materiał genetyczny w próbce nawet 10^9 - krotnie w czasie zaledwie 2 godzin (Compton 1991). Ze względu na preferowany kwas nukleinowy metoda ta sprawdza się doskonale w wykrywaniu wirusów posiadających jako materiał genetyczny jednoniciowe RNA takich jak: wirus grypy (Lau i wsp. 2003, Collins i wsp. 2003), wirus pryszczycy (Collins i wsp. 2002), wirusy atakujące układ pokarmowy (Jean i wsp. 2004), wirusy Zachodniego Nilu i encefalopatii St. Louis (Lanciotti i Kerst 2001), HIV-1 i HCV (Linnen i wsp. 2002), oraz szerokiego spektrum wirusów atakujących układ oddechowy (Moore i wsp. 2008). Przy użyciu tej metody możliwe jest również wykrywanie wirusów DNA np. na podstawie obecności mRNA tych wirusów w zakażonych komórkach (Molden i wsp. 2007).

NASBA jest, podobnie jak PCR, techniką umożliwiającą detekcję w czasie trwania amplifikacji (Costa i wsp. 2007, Moore i wsp. 2008). Ze względu jednak na stosunkowo wysoki koszt sprzętu umożliwiającego taką detekcję, najczęściej stosuje się takie techniki jak elektrochemiluminescencja (Lau i wsp. 2003, Collins i wsp. 2002, Collins i wsp. 2003), blotting poprzedzony elektroforezą agarozową (Jean i wsp. 2004) lub chemiluminescencja (Linnen i wsp. 2002).

Metody bazujące bezpośrednio na obserwacji obecności wirusa

Mikroskopia elektronowa

Mikroskopia elektronowa jest niewątpliwie techniką o najdłuższym stażu w wykrywaniu wirusów. Pierwszy obraz wirusa spod mikroskopu elektronowego został opublikowany już w 1938 roku (Hazelton i Gelderblom 2003). Zasada działania mikroskopu elektronowego polega na wizualizacji wiązki elektronów przechodzącej przez preparat. Dzięki temu możliwe jest obserwowanie obszarów pochłaniających i przepuszczających elektrony. Zastosowanie elektronów zamiast wiązki światła powoduje, że możliwe są obserwacje obiektów 1000 razy mniejszych, niż te widoczne w mikroskopie świetlnym. Do prawidłowej obserwacji wirusa pod mikroskopem elektronowym niezbędne jest spowodowanie, żeby wirus lub jego otoczenie zaczęły pochłaniać elektrony. W tym celu stosuje się barwienie związkami metali ciężkich. Stosowane są dwa typy barwienia: pozytywowe i negatywowe. Te pierwsze jest procedurą stosunkowo długotrwałą, trwającą kilka dni, co raczej wyklucza jego użycie jako podstawy metody analitycznej. Z kolei barwienie negatywowe, w toku którego barwione jest otoczenie wirusa, pozostawiając jego samego strukturę przepuszczalną dla elektronów, trwa bardzo krótko i pozwala na analizę próbki w czasie 10 minut (Hazelton i Gelderblom 2003, Brandt i wsp. 1981). Wadą metod wykrywania wirusów opartych na mikroskopii elektronowej jest stosunkowo niska czułość w porównaniu do innych metod, co jest częściowo rekompensowane dosyć wysoką specyficznością (Fisman i wsp. 2009). Szacuje się, że przy użyciu barwienia negatywowego niezbędna ilość wirusa umożliwiająca jego wykrycie wynosi 10^6 - 10^8 /ml (Hazelton i Gelderblom 2003). W związku z tym stosowane są również metody pozwalające na zwiększenie czułości, co jednak wiąże się ze znacznie bardziej pracochłonną i czasochłonną obróbką próbki. W celu zagęszczenia wirusów stosuje się ultrawirowanie bezpośrednio na siatkę preparatu, co pozwala zwiększyć czułość nawet 1000 razy (Hammond i wsp. 1981)), metodę dyfuzji do agaru, która pozwala na pięciokrotne zagęszczenie próbki oraz immunomikroskopie elektronową, gdzie siatkę preparatu pokrywa się przeciwciałami rozpoznającymi wirusa lub dodaje się do roztworu, a powstałe w ten sposób precipitaty zwirowuje na siatkę (Hazelton i Gelderblom 2003, Biel i wsp. 2004).

Mikroskopia elektronowa mimo niewątpliwych zalet ma też bardzo poważną wadę – jak na razie nie jest możliwa automatyzacja detekcji przy użyciu tej metody. Żeby była efektywna, wymaga zaangażowania doświadczonych operatorów, którzy będą interpretować uzyskany obraz.

Mikroskopia sił atomowych (AFM)

Mikroskopia sił atomowych jest metodą wykorzystującą oddziaływanie na bardzo małych dystansach. W zależności od lokalnego ukształtowania powierzchni, igła, która przesuwa się bezpośrednio nad preparatem jest odpowiednio odpychana lub przyciągana. Igła jest umieszczona na elastycznym ramieniu, które jest uginane przez siły działające na igłę. Ugięcie jest rejestrowane przez odchylenie

promienia lasera odbijającego się od ramienia. To pozwala na stworzenie trójwymiarowej mapy powierzchni (Huff i wsp. 2004). Zastosowanie takiej techniki pozwala z łatwością zaobserwować obecność pojedynczego wirusa na skanowanej powierzchni. Jednocześnie technika taka pozwala na skanowanie stosunkowo niewielkiej powierzchni. Z tego powodu konstrukcja jakichkolwiek testów wykrywających więcej niż jednego wirusa wymaga dużej miniaturyzacji. Jednak niewątpliwą zaletą jest stosunkowo wysoka czułość tej metody – w wykrywaniu kociego caliciwirusa, który jest jednym z mniejszych wirusów, uzyskano czułość 3×10^6 /ml (Porter i wsp. 2006)

Technika ta wykorzystuje dwa podejścia do wykrywania wirusów: pomiar zmiany wysokości pewnych sekcji na powierzchni lub bezpośrednią wizualizację wirusów. Badanie zmiany wysokości, która jest konsekwencją wiązania się wirusa do powierzchni pokrytej specyficznymi przeciwciałami, wymaga użycia bardzo gładkich powierzchni. Zwykle w tym celu używa się polerowanego krzemu pokrytego cienką warstwą złota. W miejscu nakroplenia przeciwciał tworzą się rejony wyniesione względem powierzchni. Po związaniu wirusa wysokość tych rejonów znacznie się zwiększa, co można wykryć przy użyciu AFM (Huff i wsp. 2004).

Drugie podejście jest wykorzystywane w technice ViriChip. W tym przypadku wykrywanie polega na zaaplikowaniu próbki na płytkę pokrytą w różnych sekcjach przeciwciałami przeciw różnym wirusom. Po inkubacji płytka jest analizowana w mikroskopie AFM w poszukiwaniu wirusów przyłączonych do powierzchni. Ta metoda pozwala na wykrycie wirusów z czułością 10^8 /ml w czasie 30 minut (Huff i wsp. 2004, Nettikadan i wsp. 2003, Nettikadan i wsp. 2004).

Interesującą techniką wykorzystywaną w detekcji wirusów za pomocą AFM jest nanolitografia natywnych białek (Tinazli i wsp. 2007). Metoda ta pozwala na precyzyjne umieszczenie natywnych białek, takich jak np. receptory dla wirusa. Dzięki uzyskiwaniu bardzo małych rozmiarów plamki możliwe jest jednoczesne wykrywanie stosunkowo dużej ilości wirusów na pojedynczym chipie (Artelsmair i wsp. 2008).

Mikroskopia fluorescencyjna

Mimo tego, że cząstki wirusowe (poza przedstawicielami Poxviridae) są niewidoczne w mikroskopie świetlnym, po wybarwieniu ich barwnikiem fluorescencyjnym możliwa jest ich obserwacja pod mikroskopem fluorescencyjnym lub konfokalnym. Do barwienia zwykle używa się barwników łączących się z DNA tkich jak np. DAPI, SYBR Green czy SYBR Gold. Po oświetleniu wybarwionej próbki odpowiednim światłem możliwa jest bezpośrednia obserwacja, a więc i oszacowanie ilości wirusów w próbce. Metody tej używa się do szacowania ilości wirusów w próbkach środowiskowych (Hara i wsp. 1991, Betarel i wsp. 2000, Ferris i wsp. 2002, Danovaro i wsp. 2001, Danovaro i wsp. 2002), a wyniki uzyskiwane za jej pomocą są znacznie bardziej wiarygodne niż uzyskane za pomocą mikroskopii elektronowej (Betarel i wsp. 2000, Ferris i wsp. 2002) lub cytometrii przepływowej (Ferris i wsp. 2002). Oczywiście metoda ta nie pozwala na identyfikację wirusa lub obserwację jakichkolwiek jego cech morfologicznych.

Hybrydyzacja *in situ*

Hybrydyzacja *in situ* pozwala na wykrycie obecności wirusa lub prowirusa w preparatach tkankowych. Dzięki bardzo wysokiej czułości pozwalającej na wykrywanie stosunkowo krótkich fragmentów genomu, możliwe jest wykrycie pojedynczych prowirusów w komórkach (De Haas i wsp. 1996, Zehbe i wsp. 1997, Adler i wsp. 1997, van Gijswiik 1997, Reed i wsp. 1998, Speel i wsp. 1999). Metoda polega na hybrydyzacji znakowanej sondy z utrwalonym preparatem z tkanki. Sondy, które nie związały się z komplementarnymi sekwencjami są z łatwością odmywane z tkanki. Sonda jest wyznakowana fluoroforem lub haptenem. Przy użyciu fluoroforu detekcja odbywa się przez obserwację mikroskopową obecności sekcji emitujących po wzbudzeniu światło charakterystyczne dla danego fluoroforu. W przypadku użycia haptenu możliwe są różne rodzaje barwienia – od enzymatycznego, gdzie enzym sprzężony z przeciwciałem rozpoznającym antygen przekształca substrat w nierozpuszczalny barwny produkt (Chang i wsp. 1992) do chemicznego, gdzie np. złoto koloidalne sprzężone z przeciwciałem powoduje wytrącenie się srebra (Holgate i wsp. 1983). Ten typ detekcji, pozwalający np. na wykrycie roli niektórych wirusów w nowotworzeniu, wymaga udziału wyszkolonego personelu do identyfikacji i analizy uzyskanego wyniku.

Cytometria przepływowa

Cytometria przepływowa pozwala na szybki, automatyczny pomiar parametrów związanych z absorpcją, rozpraszaniem lub emisją światła przez cząstki zawieszone w roztworze. Roztwór jest przepuszczany cienkim strumieniem przez komorę, w której mierzone są parametry poszczególnych cząstek. Z powodu tego, że większość cząstek wirusowych jest mniejsza od długości fali świetlnej, początkowo sądzono, że nie da się zaobserwować przy użyciu tej metody cząstek wirusowych. Jednak po wybarwieniu wirusów barwnikami fluorescencyjnymi obserwacja taka była możliwa (Marie i wsp. 1999, Brussaard i wsp. 2000, Brussaard 2004). Za jej pomocą możliwe jest zliczenie wirusów oraz częściowo ich identyfikacja oparta na charakterystycznych wzorach dystrybucji fluorescencji. Interesującą obserwacją jest to, że nie zaobserwowano silnej korelacji wielkości wirusa i intensywności fluorescencji. Jednak wirusy o genomach mniejszych niż 10 kbp nie zostały wykryte przy użyciu metody opracowanej przez Marie i wsp. (1999) (Brussaard i wsp. 2000).

Powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR)

SPR jest techniką umożliwiającą mierzenie interakcji cząsteczek na granicy faz stałej i ciekłej. Na granicy faz znajduje się cienka warstwa metalu, najczęściej złota, która jest kluczowym elementem systemu detekcji. Zasada działania SPR wykorzystuje dwa zjawiska: całkowitego wewnętrznego odbicia na granicy faz oraz zdolności cienkiej warstwy metalu na granicy faz do absorpcji wąskiego wycinka widma w zakresie światła widzialnego. Ta ostatnia cecha jest silnie uwarunkowana bezpośrednim otoczeniem i jakiegokolwiek zmiany zachodzącej w bezpośredniej bliskości warstwy metalu skutkują przesunięciem maksimum adsorpcji. Dzięki temu można wykrywać zajście hybrydyzacji kwasów nukleinowych czy wiązanie się przeciwciała z antygenem. SPR został wykorzystany do wykrywania wirusa mozaiki tytoniowej przy życiu przeciwciał rozpoznających tego wirusa (Boltovets i wsp. 2002, Boltovets i wsp. 2004). Limit detekcji uzyskany w tych badaniach wyniósł 5×10^9 cząstek wirusowych. W bezpośrednim wykrywaniu wirusów uzyskiwane czułości detekcji nie są szczególnie duże - w różnych pracach wyniosły odpowiednio 10^7 bakulowirusów (Baac i wsp. 2006), 2,5 ng/ml wirusa WSSV zakażającego krewetki (Lei i wsp. 2008), 1360 ng/ml mykowirusa

OMSV (Kim i wsp. 2008). Są to ilości mniejsze od możliwych do wykrycia w przypadku użycia testów ELISA, lecz nadal nie są one zadowalające jeśli chodzi o niektóre zastosowania. Bardzo dobrą czułość uzyskano stosując jako warstwę detekcyjną immobilizowane komórki bakteryjne. W pracy tej wykrywano obecność bakteriofagów będących indykatorami skażenia wody. W tym przypadku dużą zawartość wirusa wykrywano w kilkanaście minut po dodaniu próbki, a bardzo niskie ilości wirusów mogły zostać wykryte po około 120 minutach, gdy zakażone komórki uwalniały potomstwo fagowe. Limit detekcji tej metody wyniósł 10^2 cząstek wirusowych/ml (Garcia-Aljaro i wsp. 2008).

Metoda również została wykorzystana do genotypowania HIV (Bianchi i wsp. 1997) i wykrywania przeciwciał przeciw HSV (Wittekindt i wsp. 2000).

Sensory piezoelektryczne

Sensory piezoelektryczne są jedną z najintensywniej eksploatowanych platform w konstrukcji testów pozwalających na wykrywanie wirusów. W tym celu najczęściej wykorzystuje się mikrowagi kwarcowe (QCM) i powierzchniowe rezonatory akustyczne (SAW) (Uttenhaler i wsp. 2001, Tamarin i wsp. 2003). Obie wykorzystują materiały piezoelektryczne, takie jak np. kryształy kwarcu, które są zdolne do przekształcenia sygnału elektrycznego w mechaniczny. Kryształy te w polu elektrycznym są w stanie rezonować z częstotliwością zależną między innymi od grubości kryształu. Tą częstotliwość są w stanie modyfikować parametry takie jak masa kryształu. Dzięki temu przy zmianie masy kryształu zmienia się również jego częstotliwość rezonansowa, co z kolei daje się precyzyjnie mierzyć. Ta zmiana masy może być spowodowana przez przyłączanie się różnych cząsteczek do powierzchni kryształów (Uttenhaler i wsp. 2001, Tamarin i wsp. 2003, O'Sullivan i Guilbault 1999). Przy tym masa mierzona przez mikrowagę kwarcową może wynosić 1 ng/cm^2 (O'Sullivan i Guilbault 1999). To pozwala na wykrycie przyłączenia się wirusa do powierzchni kryształu pokrytej przeciwciałami, jeśli zmiana masy kryształu jest wystarczająco duża. Zmierzona czułość tego typu urządzeń wyniosła 10^9 p.f.u./ml faga M13 w przypadku zastosowania zarówno mikrowag kwarcowych (Uttenhaler i wsp. 2001) jak i powierzchniowych rezonatorów akustycznych (Tamarin i wsp. 2003). Mikrowagi kwarcowe zostały również użyte do wykrywania wirusa pryszczycy. Ich czułość była znacznie wyższa niż czułość testów ELISA, a użyteczność pokrytych przeciwciałami sensorów nie zmieniła się przez 18 tygodni badań. Czas niezbędny do wykonania testu w tym przypadku wyniósł 1 godzinę (Gajendragad i wsp. 2001).

Ze względu na to, iż osiągnięta czułość detekcji nadal nie jest satysfakcjonująca, podejmowane są próby jej zwiększenia. Jedną z nich jest zmniejszenie grubości sensora, a co za tym idzie i jego masy, do 20-30 nm. Tak przygotowany sensor jest w stanie wykryć masę pojedynczego wirusa Vaccinia (Gupta i wsp. 2004). Kolejnym podejściem jest wykrywanie zrywania wiązań między powierzchnią sensora z immobilizowanymi przeciwciałami a wirusem zamiast masy zdeponowanej na powierzchni. Podejście to polega na zmianie częstotliwości drgania sensora przez zmianę częstotliwości aplikowanego pola elektrycznego. Przy odpowiedniej częstotliwości wyzwalane siły powodują zrywanie wiązań między przeciwciałami a wirusem, co powoduje wygenerowanie łatwego do zarejestrowania sygnału. Ta technika pozwoliła na detekcję 20 wirionów faga M13 eksponujących białko wiążące maltozę związanych przez to białko z powierzchnią (Dultsev i wsp. 2001). W innych badaniach ta metoda pozwoliła na wykrycie pojedynczego wirionu wirusa opryszczki HSV1, co dało

czułość na poziomie 10^3 wirionów/ml. Analiza za pomocą tej metody trwa około 40 minut (Cooper i wsp. 2001).

Ze względu na to, że najmniej trwałym elementem sensora jest część biologiczna, zwykle przeciwciała, podejmowane są próby ich eliminacji. W tym celu można zastosować technikę polegającą na polimeryzacji mieszaniny wirusa i roztworu monomerów na powierzchni sensora. Po spolimeryzowaniu mieszaniny wirusy są usuwane i w polimerze pozostają dołki mogące służyć jako miejsca specyficznie oddziałujące z wirusem, który postużył jako matryca. Przy użyciu tej metody podjęto próby wykrywania wirusa mozaiki tytoniowej. Uzyskana czułość detekcji wyniosła 100 ng/ml, co było wystarczające do bezpośredniego wykrycia wirusa w soku roślinnym. Czas detekcji przy użyciu tej metody wyniósł 30 minut (Dickert i wsp. 2004).

Sensory piezoelektryczne pozwalają również na wykrywanie wirusa na podstawie obecności specyficznego DNA lub RNA (O'Sullivan i Guilbault 1999, Zhou i wsp. 2002), oraz na pośrednie wykrywanie zakażenia wirusowego na podstawie obecności specyficznych przeciwciał w organizmie. W takim teście, dorównującym czułości testowi ELISA udało się wykryć przeciwciała przeciw wirusowi PRRSV w zaledwie 5 minut (Su i wsp. 2000).

Kolejnym, całkiem odmiennym podejściem do detekcji wirusów jest zastosowanie materiałów zmieniających oporność po zmianie objętości w połączeniu z materiałami zmieniającymi objętość po kontakcie z antygenem. Dźwignia skonstruowana z takiego materiału, kontaktuje się z żelazem zwiększającym objętość po kontakcie z antygenem. Zmiana objętości żelaza powoduje ugięcie dźwigni i w konsekwencji zmianę jej oporu elektrycznego. Pomiar tego parametru pozwala na sprawdzenie, czy w badanej próbce znajdują się szukane antygeny. Pomiar przy użyciu tej metody trwa zaledwie 5 minut. Metoda była wykorzystana do detekcji wirusa vaccinia (Gunter i wsp. 2003).

Mikromacierze

Mikromacierze są konstruowane na stałych podłożach – głównie szkło lub plastik. Powierzchnia mikromacierzy podzielona jest na małe sektory. Każdy z tych sektorów zawiera inną sondę wychwytyjącą. Na podstawie położenia sektora można z łatwością ustalić sekwencje sondy. Sondy są syntetyzowane bezpośrednio na powierzchni mikromacierzy lub poza nią np. w reakcji PCR, a następnie nanoszone w odpowiednie sektory (Striebel i wsp. 2003).

Wykrywanie polega zwykle na wyznakowaniu kwasu nukleinowego w próbce za pomocą barwnika fluorescencyjnego i następnie na inkubacji wyznakowanej próbki z mikromacierzą. W trakcie inkubacji zachodzi hybrydyzacja, co z kolei można wykryć po odpłukaniu niezwiązanych z sondami fragmentów kwasu nukleinowego z próbki i przeskanowaniu mikromacierzy w celu wykrycia sektorów wykazujących fluorescencję. Dzięki takiej konstrukcji metody, możliwa jest jej pełna automatyzacja. Ponadto pozwala ona na analizę pod kątem obecności wielu różnych sekwencji. Mimo swoich niewątpliwych zalet, metoda ta jest nadal zbyt kosztowna w rutynowej diagnostyce.

Mikromacierze zostały wykorzystane do wykrywania i określania ilości wirusów w próbce (Kawaguchi i wsp. 2003), typowania wirusów (Bean i Wilson 2000) i badania przesiewowego pod kątem obecności wielu różnych wirusów (Striebel i wsp. 2003), lub badania przesiewowego z jednoczesnym typowaniem (Chihzhikov i wsp. 2002, Wang i wsp. 2002, Lapa i wsp. 2002). Zwykle materiał genetyczny w próbce musi być nie tylko wyznakowany, ale również poddany amplifikacji. Bardzo

rzadko możliwe jest wykrywanie wirusa w próbce bez uprzedniej amplifikacji materiału. Przykładem takiego testu jest detekcja opisana przez Kawaguchi i wsp. (2003). W teście tym możliwe jest nie tylko wykrycie, ale i oszacowanie ilości obecnego wirusa. Czulość detekcji wynosi 10^5 wirionów/ml. Tego typu testy mają bardzo duże znaczenie w określaniu skuteczności terapii przeciwwirusowych w przebiegu takich chorób jak zakażenia HIV lub wirusem zapalenia wątroby typu C. Pozwalają one bardzo szybko wykryć pojawienie się mutantu wirusa odpornego na stosowane leki.

Przykładowym zastosowaniem mikromacierzy jest konstrukcja testu wykrywającego 140 różnych wirusów z czulością 400 wirusów/ml. Czas niezbędny do przeprowadzenia tego testu to 4 godziny (Wang i wsp. 2002). Inny test prezentowany przez Stiebel i wsp. (2003) wykrywa 6 różnych wirusów z czulością 500 wirusów/ml. Jednak znacznie bardziej popularne wydają się być testy wykrywające wirusy z jednej tylko rodziny lub nawet wykrywające tylko różne warianty tego samego wirusa. Przykładem takiego podejścia jest test wykrywający wirusa SARS i jednocześnie profil mutacji wykrytego wirusa (Long i wsp. 2004). Zwiększenie czulości możliwe jest przy zastosowaniu bardziej wydajnych metod pozwalających na powielenie obecnego w próbce kwasu nukleinowego. Na przykład zastąpienie reakcji PCR reakcją nested-PCR pozwala na wykrycie niższych stężeń wirusa w próbce. Przy użyciu tej techniki wykrywane były ludzkie rotawirusy z grupy A. Czas wykonania tego testu wynosił 3 godziny (Chihzhikov i wsp. 2002). Znane są również mikromacierze wykrywające i identyfikujące ortopoxwirusy. W tym przypadku detekcja trwa 6 godzin (Lapa i wsp. 2002). Użycie mikromacierzy produkowanych przez Affymetrix do typowania mutantów HIV w genie *pol* okazało się metodą mniej czułą, lecz szybszą niż tradycyjne sekwencjonowanie (Bean i Wilson 2000).

Jak na razie mikromacierze DNA w większości wymagają amplifikacji kwasu nukleinowego w próbce, ich użyteczność jest więc ograniczona. Ich niewątpliwą zaletą jest możliwość wykrywania i analizy bardzo dużej ilości potencjalnych sekwencji DNA. Niestety zaleta ta w dużej mierze jest niwelowana przez potrzebę amplifikacji kwasów nukleinowych, który to etap obciążony jest ograniczeniami w stosunku do ilości jednocześnie amplifikowanych sekwencji i potrzebą zachowania procedur chroniących przed zanieczyszczeniem badanej próbki nawet śladowymi ilościami produktów poprzedniej amplifikacji. Wad tych nie posiadają mikromacierze białkowe. Testy tego typu są w zasadzie zminiaturyzowanymi formami testów immunofluorescencyjnych, które działają dobrze również w niezminiaturyzowanej formie (Leonardi i wsp. 1994). Mikromacierze białkowe skupiają się na wykrywaniu wirusa na podstawie obecności jego antygenów powierzchniowych w próbce lub wykrywają przeciwciała powstałe w wyniku zakażenia. Ich konstrukcja jest analogiczna do mikromacierzy DNA, lecz zamiast kwasu nukleinowego użyte są tam antygeny (do wykrywania przeciwciał) lub przeciwciała, fragmenty przeciwciał, sztuczne przeciwciała albo aptamery, w przypadku gdy chcemy wykrywać antygeny. Dzięki miniaturyzacji są one szybsze i tańsze niż standardowe testy np. ELISA, szczególnie kiedy poszukujemy wielu potencjalnych celów w jednej próbce. Dzięki miniaturyzacji możliwe jest również znaczne ograniczenie objętości badanej próbki. Dzięki potencjalnej możliwości jednoczesnej analizy pod kątem obecności bardzo dużej ilości różnych patogenów są one idealnym rozwiązaniem pomagającym wydać prawidłową diagnozę w trudnych do interpretacji przypadkach zachorowań (Mezzasoma i wsp. 2002, Duburcq i wsp. 2004). Jednak niektóre z podejść skupiają się na pojedynczym wirusie. W teście takim mającym na celu zademonstrowanie zdolności platformy do wykrywania wirusa ospy prawdziwej posłużono się jej bliskim krewnym – wirusem ospy krowiej. Czulość detekcji wyniosła $2,5 \times 10^5$ cząstek wirusowych (Donaldson i wsp. 2004).

ELISA

Testy ELISA stanowią jedną z najczęściej wykorzystywanych platform do wykrywania antygenów. Wiele nowocześniejszych podejść do detekcji patogenów jest po prostu miniaturyzacją tego testu z ewentualnym wbudowaniem detektora. Oryginalnie test ELISA najczęściej jest prowadzony w formie płytki 96-cio dołkowej. Zasada testu ELISA jest prosta – polega ona na użyciu dwóch przeciwciał – jednego przytwierdzonego do podłoża, którego zadaniem jest wyłapanie antygeny z próbki i drugiego następnie dodanego, którego zadaniem jest przyłączyć się do immobilizowanego na powierzchni przez pierwsze przeciwciało antygeny i pozwolić na wygenerowanie sygnału. W tym celu używa się przeciwciała detekcyjnego sprzężonego z enzymem lub takim, które umożliwia bardzo specyficzną detekcję bez interferencji z przeciwciałem wychwytyjącym. Ten efekt można uzyskać używając przeciwciał pochodzących z innych gatunków zwierząt lub znakując chemicznie przeciwciało np. za pomocą biotyny. Zamiast przeciwciał można też użyć innych cząstek wykazujących powinowactwo do antygeny. W ostatnim etapie wykrywania mierzy się aktywność enzymatyczną w poszczególnych dołkach. Zwykle aktywność enzymu określana jest na podstawie pomiaru absorbancji po konwersji substratu w barwny produkt.

ELISA jest najczęściej wykorzystywanym klinicznym testem w wykrywaniu wirusów i przeciwciał przeciw wirusom. Swoją dominującą pozycję uzyskała dzięki kilku cechom – jest tania, prosta w wykonaniu, możliwa do automatyzacji i nadaje się do masowych badań przesiewowych. Dzięki temu jest często wykorzystywana w badaniach krwi pobranej oddawców na obecność wirusa HIV i przeciwciał przeciw wirusowi (Saville i wsp. 2001). Jednak i ta metoda ma swoje wady. Jedną z nich jest stosunkowo niska czułość przy wykrywaniu antygenów. W porównaniu do metod amplifikacji takich jak np. PCR jej czułość jest niższa o 2-4 rzędów wielkości w przypadku wykrywania wirusów roślinnych (Dovas i wsp. 2001) i nawet 6-7 rzędów wielkości w przypadku wykrywania wirusa grypy typu A (Steininger i wsp. 2002). Użycie metod elektrochemicznych pozwala na uzyskanie stosunkowo wysokich czułości wynoszących 10 ng białka/ml. Czułość taka wystarcza do wykrycia przeciwciał np. przeciw ptasiej grypie (Ohtsuka 2008), jednak nadal może być niewystarczająca w przypadku detekcji wirusa.

Głównym czynnikiem wpływającym na czułość testów ELISA jest powinowactwo przeciwciał do badanego antygeny. Powinowactwo może osiągać wartość 1×10^4 – 9×10^4 ng białka wirusowego/ml. Jednak użycie przeciwciał monoklonalnych, nawet o bardzo wysokich powinowactwach, może nie dać spodziewanego efektu, jeśli rozpoznawane epitopy w cząstce wirusa są ukryte w strukturze białka, lub nie przyjmują odpowiedniej do rozpoznania konformacji (Brown i wsp. 1996). W celu uniknięcia tego problemu można użyć surowicy przeciwwirusowej. To jednak rodzi kolejne problemy związane z brakiem powtarzalności jakości surowicy. Użycie innych zwierząt tego samego gatunku przy takiej samej procedurze immunizacji może dać inne efekty, co może wpłynąć na czułość detekcji testu.

Problemy te są łatwe do wyeliminowania w przypadku zastosowania tak zwanych przeciwciał fagowych. Są to wyselekcjonowane klony z bibliotek fagów prezentujących na powierzchni randomizowane peptydy, które posiadają powinowactwo do wykrywanego antygeny. Dzięki zastosowaniu tej techniki możliwe jest uzyskanie w łatwy sposób dużych ilości przeciwciał z pominięciem etapów immunizacji, a co za tym idzie z pominięciem użycia zwierząt w całym procesie przygotowania testu (Uhde i wsp. 2000).

Spektroskopia Ramanowska i elipsometria

Dzięki potencjalnym możliwościom spektroskopii Ramanowskiej możliwe jest wykrywanie wirusów zarówno w zawiesinach jak i immobilizowanych na powierzchniach (Tsen i wsp. 2007, Goeller and Riley 2007). Dzięki wykorzystaniu powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii Ramanowskiej (SERS) możliwe było uzyskanie czułości na poziomie 10^9 wirionów/ml przy użyciu detekcji bezznacznikowej, co było odpowiednikiem pomiaru obecności zaledwie 100 wirionów (Goeller and Riley 2007). Inne badania pokazały czułość detekcji kociego caliciwirusa na poziomie 10^6 w przypadku użycia znaczników (Driskell i wsp. 2005, Porter i wsp. 2006). Użycie SERS pozwala nie tylko na wykrycie wirusa, lecz również na jego identyfikację na podstawie uzyskanych widm. Identyfikacja jest na tyle dokładna, że pozwala na rozróżnienie różnych wariantów tego samego wirusa (Shanmukh i wsp. 2006).

SERS sprawdza się również w detekcji hybrydyzacji wirusowego kwasu nukleinowego z sondami detekcyjnymi. Sondy detekcyjne umieszczone na powierzchni są spreparowane w ten sposób, że hybrydyzacja z docelowym kwasem nukleinowym powoduje zanik sygnału pochodzącego ze znacznika przymocowanego do sondy (Wabuyele i Wo-Dinh 2005).

Elipsometria również może być wykorzystana do wykrywania wirusów po ich immobilizacji na powierzchni. Dotychczasowa czułość detekcji wynosi 10^9 /ml w przypadku detekcji faga M13. W tym przypadku użyty model eksperymentalny wykorzystywał biotynylowane fagi i wiązanie reszt biotyny do awidyny na powierzchni sensora (Qi i wsp. 2009).

Biosensory elektrochemiczne.

W przeciwieństwie do metod detekcji wykorzystujących sygnał optyczny, Metody opierające się na pomiarze sygnału elektrycznego mają znacznie większe możliwości wbudowania i miniaturyzacji układu detekcyjnego. Parametry takie jak pojemność (Guiducci i wsp. 2004), natężenie prądu, napięcie czy oporność są mogą się zmieniać w wyniku rozpoznania antygeny lub sekwencji komplementarnej w badanej próbce.

Zwykle w pomiar zaangażowane są mikroelektrody umieszczone na powierzchni biosensora. Najczęstszymi materiałami z których wykonane są elektrody są grafit, złoto, platyna i polipirol (Pividori i wsp. 2000). Jako część biologiczna takiego sensora mogą zostać użyte oligonukleotydy (w przypadku detekcji kwasów nukleinowych), przeciwciała, aptamery, przeciwciała fagowe, receptory lub inne cząsteczki wykazujące powinowactwo do antygeny lub antygeny, jeśli chcemy wykrywać obecność specyficznych przeciwciał. Przyłączenie części biologicznej do receptora może zostać uzyskane przez utworzenie wiązań kowalencyjnych z powierzchnią (np. tiolowych z powierzchnią złota (Pividori i wsp. 2000)) lub na przykład przez oddziaływania hydrofobowe. Dzięki temu, że białka bardzo dobrze wiążą się z powierzchnią złota możliwe jest wykorzystanie ich powinowactwa do substancji drobnocząsteczkowych w celu zakotwiczenia właściwego elementu biologicznego rozpoznającego docelowo poszukiwany cel w próbce. Przykładem najszerzej chyba w tym celu wykorzystywanego oddziaływania jest wiązanie awidyny (białka z jaja kurzego) lub streptawidyny (białka z bakterii *Streptomyces avidini*) z biotyną (witamina H lub B7).

W konstrukcji testów wykorzystujących sensory elektrochemiczne możliwe jest zastosowanie kilku strategii uzyskiwania sygnału. Strategie te możemy podzielić na bezznacznikowe, enzymatyczne, oraz znaczniki modyfikujące mierzone właściwości elektryczne na powierzchni sensora (znaczniki elektroaktywne) (Łoś i Wegrzyn 2007).

Detekcja bezznacznikowa

W tym typie detekcji wykorzystuje się naturalne właściwości kwasów nukleinowych. Zajście hybrydyzacji sondy z komplementarnym DNA lub RNA zmienia pewne właściwości powierzchni sensora takie jak pojemność złotych elektrod na powierzchni sensora. Berggren i wsp. (1999) zaprezentowali pracę, w której byli w stanie wykryć hybrydyzację 25 cząsteczek DNA z sekwencją pochodzącą z wirusa cytomegalii. Niestety uzyskali słabą specyficzność i niską powtarzalność. Inne próby wykrywania hybrydyzacji były oparte na zmianie przewodności (Hianik i wsp. 2001) oraz na utlenianiu guanin obecnych w wykrywanym kwasie nukleinowym (Wang i wsp. 1998)

Znaczniki elektroaktywne

W przypadku wykrywania hybrydyzacji kwasów nukleinowych można wykorzystać wiele różnych znaczników. Ich cechą wspólną jest preferencyjne wiązanie do dwuniciowego kwasu nukleinowego. Zwykle w konstrukcji tego typu znaczników wykorzystuje się interkalatory lub związki wiążące się do małej bruzdy DNA (Pividori i wsp. 2000). Do takiego związku przyłącza się na przykład ferrocen. Ta strategia pozwoliła na wykrycie hybrydyzacji DNA amplifikowanego z wirusa HBV za pomocą PCR.

Znaczniki można też przyłączyć bezpośrednio do sondy detekcyjnej. Ferrocen przyłączony do sondy detekcyjnej pozwolił na detekcję i różnicowanie produktu PCR z różnych ludzkich papillomawirusów (Vernon i wsp. 1007).

Innym podejściem jest zastosowanie błękitu metylenowego jako indykatora zajścia hybrydyzacji z sondami na sensorze z elektrodami węglowymi. Obecność fragmentów genomu wirusów HBV i TT w produkcie reakcji PCR był w ten sposób możliwy do wykrycia za pomocą woltametrii (Meric i wsp. 2002). Innym podejściem jest umieszczenie znacznika trwale związanego z sondą wychwytyjącą DNA. Po zajściu hybrydyzacji powstaje dwuniciowe DNA i odtwarzane jest w ten sposób w obrębie sondy miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez endonukleazy. Po dodaniu endonukleazy, DNA jest przecinane i znacznik zostaje odcięty i wypłukany z powierzchni sensora. Takie podejście do wykrywania wirusa HCV przy użyciu thioniny jako znacznika i enzymu BamHI do jego odcinania po zajściu hybrydyzacji okazało się być skuteczne nie tylko w stosunku do syntetycznych sekwencji, ale również w stosunku do próbek krwi pobranych od pacjentów. W tym przypadku do wykrywania zaniku znacznika na powierzchni użyto cyklicznej woltametrii (Liu i wsp. 2009)

Detekcja enzymatyczna

Detekcja enzymatyczna jest chyba najszerszej wykorzystywana w biosensorach elektrycznych. Jej niewątpliwą zaletą jest możliwość wzmocnienia sygnału dzięki temu, że pojedyncza cząsteczka jest w stanie wyprodukować wiele cząsteczek zmieniających właściwości elektryczne otoczenia przy użyciu nieaktywnego elektrycznie substratu, dzięki czemu uzyskuje się wzmocnienie sygnału w stosunku do nieenzymatycznych metod detekcji. Przykładami takich enzymatycznych przekształceń substratów w

elektrycznie aktywny produkt są: trawienie fosforanu naftylu do α -naftolu (Vetcha i wsp. 2002) lub fosforanu para-aminofenolu do paraaminofenolu przez alakliczną fosfatazę (Gabig-Cimińska i wsp. 2004a, Gabig-Cimińska i wsp. 2004b, Łoś i wsp. 2008). Amperometrycznie można również zmierzyć obecność H_2O_2 przy użyciu aktywności enzymatycznej peroksydazy chrzanowej (de Lumley-Woodyear i wsp. 1996). Aktywność enzymatyczna może być również mierzona dzięki produkcji nierozpuszczalnego produktu reakcji H_2O_2 z 3-chloro-1-naftolem, który wytrąca się na powierzchni sensora i powoduje zwiększenie oporu pomiędzy elektrodami zmniejszając tym samym przepływ prądu (Alfonta i wsp. 2001). Kolejnym substratem dla peroksydazy chrzanowej może być o-phenylenodiamina, która jest przekształcana w 2,3-diaminophenazine wykrywana na elektrodzie rtęciowej (dropping mercury electrode). Przy użyciu tej metody udało się wykryć 0,5 ng/ml wirusa mozaiki ogórka (Sun i wsp. 2001).

Wykorzystanie enzymatycznej amplifikacji sygnału w niektórych przypadkach umożliwia uniknięcie amplifikacji samego kwasu nukleinowego w próbce. Przy użyciu detekcji amperometrycznej i aktywności enzymatycznej alkalicznej fosfatazy możliwe było wykrycie bakteriofagów T4, lambda, P1 i SSB w 25 minut z czułością 10^7 - 10^8 wirionów/ml (Gabig-Cimińska i wsp. 2004b). Szybka metoda izolacji DNA pozwoliła w tych badaniach na uzyskanie wyniku 30-35 minut po pobraniu próbki. Jednak w tych badaniach hybrydyzacja zachodziła nie bezpośrednio na chipie, lecz na perełkach paramagnetycznych. Sensor został tu użyty jedynie do analizy produktu reakcji enzymatycznej. Po udoskonaleniu sensora został on użyty do bezpośredniego wykrywania obecności fagów lambda i M13 przy użyciu przeciwciał. Uzyskana czułość wyniosła 3×10^7 wirionów faga lambda/ml, co odpowiadało 20000 wirionów nałożonych bezpośrednio na sensor. Czas detekcji wyniósł 50 minut (Łoś i wsp. 2005). W niektórych testach, w których dawka zakaźna materiału biologicznego jest bardzo niska, np. w wykrywaniu *Escherichia coli* O157:H7 na podstawie obecności sekwencji DNA zawartych w profagach, w celu zwiększenia czułości stosuje się jednak wstępną amplifikację materiału genetycznego (Łoś i wsp. 2008).

Detekcja magnetyczna

Detekcja magnetyczna jest oparta na materiałach, które zmieniają swój opór elektryczny w polu magnetycznym. To podejście do konstrukcji sensorów pozwala na wykorzystanie doświadczeń z dziedziny badań, która jest aktualnie znacznie lepiej rozwinięta i znacznie hojniej finansowana, a mianowicie z rozwoju technologii komputerowych dysków twardych. Zasada detekcji w przypadku sensora polega na tym, że każda pozycja pokrywana jest odpowiednio sondą DNA lub przeciwciałem. Po dodaniu próbki wirus lub jego kwas nukleinowy jest unieruchamiany na powierzchni sensora przez oddziaływanie ze specyficznym przeciwciałem lub z komplementarną sondą DNA. Następnie dodaje się sondy lub przeciwciała wyznakowanego cząstkami magnetycznymi lub paramagnetycznymi. Akumulacja cząstek magnetycznych powoduje zmianę pola magnetycznego w bezpośredniej bliskości sensora. W przypadku użycia cząstek paramagnetycznych potrzebne jest jeszcze ich wzbudzenie zewnętrznym polem magnetycznym (Graham i wsp. 2004). Wykrywanie na sensorze bazującym na oporze elektrycznym wzbudzonym przez pole magnetyczne wyniosło 10^8 cząstek DNA/ml (Edelstein i wsp. 2000).

Lab-on-chip

Technologia lab-on-chip zakłada wykorzystanie w detekcji kilku elementów takich jak np. amplifikacja i elektroforeza DNA (Zhong i wsp. 2009), przy ich jednoczesnej miniaturyzacji i umieszczeniu na pojedynczym układzie. Dzięki takiemu podejściu możliwe jest stworzenie całkowicie bezobsługowych sensorów, które wykonują skomplikowaną obróbkę i analizę próbki w warunkach polowych. Dzięki temu możliwe jest nie tylko skrócenie czasu analizy, lecz również zmniejszenie nakładu pracy oraz wyeliminowanie konieczności użycia wykwalifikowanego personelu w procesie analizy próbek. W układach typu lab-on-chip integrowane są zwykle takie funkcje jak amplifikacja DNA, elektroforeza, mieszanie i dozowanie płynów, oczyszczanie i zagęszczanie kwasów nukleinowych (Burns i wsp. 1998, Kricka 1998, Yang i wsp. 2002, Mastrangelo i wsp. 1998). Układy tego typu zostały już wykorzystane do wykrywania mutacji w genomie HIV (Anderson i wsp. 2000) oraz w wykrywaniu obecności wirusa żółtaczkowego typu B (Zhong i wsp. 2009).

Podsumowanie

Aktualnie rozwijane są różnorodne podejścia do wykrywania wirusów. Część z nich koncentruje się na ulepszaniu już istniejących metod, inne bazują na całkiem nowych pomysłach. Z kolei techniki rutynowej diagnostyki oparte są głównie na dobrze sprawdzonych metodach takich jak ELISA, PCR czy NASBA. Bardzo szybko mocną pozycję wśród metod rutynowej diagnostyki zajął PCR czasu rzeczywistego, który mimo znacznie wyższego kosztu pojedynczej analizy od standardowego PCR charakteryzuje się znacznie zwiększoną czułością detekcji oraz znacznie skróconym czasem analizy. Poza zaletami techniki te mają jednak swoje wady – jedną z głównych jest potrzeba posiadania dobrze wyposażonego laboratorium oraz zatrudnienia wyszkolonego personelu. Z tego powodu metod tych używa się raczej do analizy dużych partii próbek klinicznych przysyłanych z różnych placówek do centralnego laboratorium. Tego typu podejście jest trudne do zaakceptowania w miejscach, w których potrzebna jest błyskawiczna analiza niewielkiej ilości próbek pod kątem obecności wirusa. Mimo istnienia jednorazowych, bardzo prostych w użyciu testów zanurzeniowych (podobnych do testów ciążowych), ich czułość jest niewystarczająca do większości zastosowań. Podejmowane próby stworzenia testów o wysokich czułościach, które w dodatku nie będą wymagały specjalistycznej obsługi koncentrują się na stworzeniu podejść typu lab-on-chip. Podejścia te koncentrują się na integracji wielu etapów detekcji w jednym prostym module, którego obsługa będzie ograniczona do naniesienia próbki i umieszczenia chipu w automatycznej stacji połączonej z detektorem. Część z tych wymagań spełniają testy oparte na elektrycznej detekcji, które są w większości modyfikacjami popularnie wykorzystywanego testu ELISA. Rozwój tych testów, oraz testów pokrewnych wykorzystujących różne efekty elektryczne jest ułatwiony z tego względu, że mogą one czerpać rozwiązania ze znacznie lepiej finansowanej dziedziny badań związanych z rozwojem elektroniki. Użycie różnego typu mikroelektrod jest możliwe dzięki zaawansowanym technikom fotolitograficznym stworzonym w celu produkcji szybszych mikroprocesorów. Z kolei techniki magnetoelektryczne mogą oprzeć się na bardzo szybkim rozwoju technologii magnetycznego zapisu i odczytu danych wykorzystywanych w nowoczesnych dyskach twardych.

Kolejnym podejściem jest modyfikacja istniejących metod w celu zwiększenia ich możliwości analitycznych, czułości czy też znacznego zmniejszenia czasu analizy. Takim podejściem jest zastosowanie mikromacierzy DNA jako metody pozwalającej znacznie dokładniej analizować produkty amplifikacji kwasów nukleinowych niż tradycyjna elektroforeza. Dzięki temu możliwe jest wykrywanie wielu patogenów w pojedynczej próbce przy użyciu tylko jednego etapu amplifikacji. Jak na razie ten etap jest potrzebny w zdecydowanej większości mikromacierzy DNA, mimo istnienia pewnych wyjątków. Jednak te wyjątki dają nadzieję na usamodzielnienie się tej niewątpliwie cennej metody, której użycie może znacznie zwiększyć precyzję diagnostyczną. Kluczowe wydaje się w jej przypadku opracowanie znacznie lepszych technik obrazowania mogących wyłowić stosunkowo nieliczne cząstki DNA wirusowego zhybrydowane z sondami detekcyjnymi.

Kolejną grupą testów, które mają aktualnie jedne z większych potencjałów rozwojowych są testy oparte na detekcji beznacznikowej. Dzięki prostocie detekcji, która wymaga tylko odpowiednio przygotowanego sensora i próbki takie techniki jak mikrowagi kwarcowe czy SPR mogą stosunkowo łatwo zdominować detekcję, szczególnie w niektórych dziedzinach, takich jak na przykład detekcja ciągła (np. w celu monitorowania obecności patogenów w powietrzu lub wodzie wodociągowej w celu wykrycia ewentualnego ataku bioterrorystycznego).

Potrzeba stworzenia taniego, przenośnego, automatycznego, łatwego w zastosowaniu, pozwalającego na analizę próbki w kilka minut z bardzo wysoką czułością nie została jeszcze zaspokojona. Jak na razie wydaje się, że największe szanse zaspokojenia tej potrzeby mają sensory piezoelektryczne, magnetyczne i elektrochemiczne oraz układy o wysokim stopniu integracji (lab-on-chip). Dotychczas pokazały one bardzo wysokie czułości detekcji przy stosunkowo krótkich czasach jej trwania. Jednak nie jest wykluczone pojawienie się metody, która okaże się znacznie lepsza od wyżej wymienionych.

Literatura

Achenbach J.E., Topcliff C.L., Vassiliev V.B., Donis R.O., Eskridge K.M., Kelling C.L., 2004, *J. Virol. Methods* **121**, 1

Adler K., Erickson T., Bobrow M., 1997,. High sensitivity detection of HPV-16 in SiHa and CaSki cells utilizing FISH enhanced by TSA. *Histochem. Cell Biol.* **108**, 321

Albers J., Grunwald T., Nebling E., Piechotta G., HintscheR., 2003, Electrical biochip technology--a tool for microarrays and continuous monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.* **377**, 521

Alfonta, L., Bardea, A., Khersonsky, O., Katz, E., Willner, I., 2001. Chronopotentiometry and Faradaic impedance spectroscopy as signal transduction methods for the biocatalytic precipitation of an insoluble product on electrode supports: routes for enzyme sensors, immunosensors and DNA sensors. *Biosens. Bioelectr.* **16**, 675

Anderson R.C., Su X., Bogdan G.J., Fenton J., 2000, A miniature integrated device for automated multistep genetic assays. *Nucleic Acids Res.* **28**, e60

- Arenkov P., Kukhtin A., Gemmell A., Voloshchuk S., Chupeeva V., Mirzabekov A., 2000, Protein Microchips: Use for Immunoassay and Enzymatic Reactions. *Anal. Biochem.* **278**, 123
- Artelsmair H, Kienberger F, Tinazli A, Schlapak R, Zhu R, Preiner J, Wruss J, Kastner M, Saucedo-Zeni N, Hoelzl M, Rankl C, Baumgartner W, Howorka S, Blaas D, Gruber HJ, Tampé R, Hinterdorfer P. 2008. Atomic force microscopy-derived nanoscale chip for the detection of human pathogenic viruses. *Small.* 4:847-54
- Baac H, Hajós JP, Lee J, Kim D, Kim SJ, Shuler ML. 2006 Antibody-based surface plasmon resonance detection of intact viral pathogen. *Biotechnol Bioeng.* 94: 815-9.
- Bean P., Wilson J., 2000, HIV genotyping by chip technology. *Am. Clin. Lab.* 19, 16-17
- Berggren C., Stalhandske P., Brundell J., Johansson G., 1999, A feasibility study of a capacitive biosensor for direct detection of DNA hybridization. *Electroanalysis* **11**, 156
- Betarel Y., Sime-Ngando T., Amblard C., Laveran H., 2000. A comparison of methods for counting viruses in aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2283
- Bianchi N., Rutigliano C., Tomassetti M., Feriotto G., Zorzato F., Gambari R., 1997, Biosensor technology and Surface plasmon resonance for real-time detection of HIV-1 genomic sequence amplified by polymerase chain reaction. *Clin. Diagn. Virol.* **8**, 199
- Biel S.S., Nitsche A., Kurth A., Siegert W., Ozel M., Gelderblom H. R., 2004, Detection of human polyomaviruses in urine from bone marrow transplant patients: comparison of electron microscopy with PCR. *Clin. Chem.* **50**, 306
- Boltovets P.M., Boyko V.R., Kostikov I.Y., Dyachenko N.S., Snopok B.A., Shirshov Y.M., 2002, Simple method for plant virus detection: effect of antibody immobilization technique. *J. Virol. Methods* **105**, 141
- Boltovets P.M., Snopok B.A., Boyko V.R., Shevchenko T.P., Dynashenko N.S., Shirshov Y.M., 2004, J Detection of plant viruses using a surface plasmon resonance via complexing with specific antibodies. *J. Virol. Methods* **121**, 101
- Bordignon J., Ferreira S.C.P., Caporale G.M.M. Carrieri M.L., Kotait I., Lima H.C., Zanetti C.R., 2002, Flow cytometry assay for intracellular rabies virus detection. *J. Virol. Methods* **105**, 181
- Brandt D.C., Kim I.-U.W., Rodriguez W.J., Thomas L., Yolken R.H., Arrobio J.O., Kapikian A.Z., Parrott R.H., Chanock R.M., 1981, Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy, and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. *J. Clin. Microbiol.* 13 976
- Brown J. M., Coates D. M., Phillpotts R. J., 1996, Evaluation of monoclonal antibodies for generic detection of flaviviruses by ELISA. *J. Virol. Methods* 62, 143
- Brussaard C. P. D., Marie D., Bratbak G., 2000. Flow cytometric detection of viruses. *J. Virol. Methods* **85**, 175

- Brussaard C.P.D., 2004, Optimisation of procedures for counting viruses by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1506
- Burns M.A., Johnson B.N., Brahmasandra S.N., Handique K., Webster J.R., Krishnan M., Sammarco T.S., Man P.M., Jones D., Hedsinger D., Mastrangelo C.H., Burke D.T. , 1998, An integrated nanoliter DNA analysis device. *Science* **282**, 484
- Chang, KL. Chen, YY. Shibata, D., Weiss, LM., 1992. Description of an in situ hybridization methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagnostic Molecular Pathology* **1**: 246-255
- Chihzhikov V., Wagner M., Ivshina A., Hoshino Y., Kapikian A. Z., Chumakov K., 2002, Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2398
- Collins R.A., Ko L.-S., Fung K.-Y., Chan K.-Y., Xing J., Lau L.-T., Yu A.C.H., 2003, Rapid and sensitive detection of avian influenza virus subtype H7 using NASBA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 507
- Collins R.A., Ko L.-S., Fung K.-Y., Lau L.-T., Xing J., Yu A.C.H., 2002 A method to detect major serotypes of foot-mouth disease virus., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 267
- Compton J., 1991, Nucleic Acids sequence-based amplification. *Nature*, **350**, 91
- Cooper M. A., 2003, Label-free screening of bio-molecular interactions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **377**, 834
- Cooper M.A., Dultsev F. N., Minson T., Ostanin V. P., Abell C., Klenerman D., 2001, Direct and sensitive detection of human virus by rupture event scanning. *Nat. Biotechnol.* **19**, 833
- Costa AM, Lamb D, Garland SM, Tabrizi SN. 2008. Evaluation of LightCycler as a platform for nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) in real-time detection of enteroviruses. *Curr Microbiol.* **56**:80-3.
- Danovaro R., Dell'Anno A., Trucco A., Serresi M., Vanucci S., 2001, Determination of virus abundance in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1384
- Danovaro R., Manini E., Dell'Anno A., 2002, Higher abundance of bacteria than of viruses in deep Mediterranean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1468
- De Haas R.R., Verwoerd N.P., Van Den Corput M.P., Van Gijlswijk R.P., Siitari H., Tanke H.J., 1996, The use of peroxidase-mediated deposition of biotin-tyramide in combination with time-resolved fluorescence imaging of europium chelate label in immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *J. Histochem. Cytochem.*, **44**, 1091
- de Lumley-Woodyear, T., Campbell, C.N., Heller, A., 1996. Direct enzyme-amplified electrical recognition of a 30-base model oligonucleotide. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 5504
- Dickert F. L., Hayden O., Bindeus R., Mann K.-J., Blaas D., Waigmann E., 2004, Bioimprinted QCM sensors for virus detection – screening of plant sap *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, 1929

- Dobozi-King M., S. Seo, J.U. Kim, R. Young, M. Cheng and L.B. Kish (2005) Rapid detection and identification of bacteria: SENSing of Phage-Triggered Ion Cascade (SEPTIC) *Journal of Biological Physics and Chemistry* 5 3–7
- Donaldson K.A., Kramer M.F., Lim D.V., 2004, A rapid detection method for Vaccinia virus, the surrogate for smallpox virus. *Biosens. Bioelectron.* 20, 322
- Dovas C. I., Hatziloukas E., Salomon R., Barg E., Shibolet Y., Katis N. I., 2001, Comparison of Methods for Virus Detection in *Allium* spp. *J. Phytopathol.* 149,731
- Driskell JD, Kwarta KM, Lipert RJ, Porter MD, Neill JD, Ridpath JF. (2005). Low-level detection of viral pathogens by a surface-enhanced Raman scattering based immunoassay. *Anal Chem.* 77:6147-54
- Duburcq X., Olivier C., Malingue F., Desmet R., Bouzidi A., Zhou F., Auriault C., Gras-Masse H., Melnyk O., 2004, Peptide-Protein Microarrays for the Simultaneous Detection of Pathogen Infections. *Bioconjugate Chem.*, 15, 307
- Dultsev F. N., Speight R.E., Fiorini M. T., Blackburn J. M., Abell C., Ostanin V. P., Klenerman D., 2001, Direct and quantitative detection of bacteriophage by “hearing” surface detachment using a quartz crystal microbalance. *Anal. Chem.* 73, 3935
- Edelstein R.L., Tamanaha C.R., Sheehan P.E., Miller M.M., Baselt D.R., Whitman L.J., Colton R.J., 2000, The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents. *Biosens. Bioelectron.* 14, 805-813
- Ellis J.S., Fleming D.M., Zambon M.C., 1997, Multiplex reverse transcription-PCR for surveillance of influenza A and B viruses in England and Wales in 1995 and 1996. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2076
- Espinoza J.C., Kuznar J., 2002, Rapid simultaneous detection and quantitation of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *J. Virol. Methods* 105, 81
- Espy M.J., Rys P.N., Wold A.D., Uhl J.R., Sloan L.M., Jenkins G.D., Ilstrup D.M., Cockerhill III F.R., Patel R., Rosenblatt J.E., Smith T.F., 2001, *J. Clin. Microbiol.* 39, 2233
- Ferris M.M., Stoffel C.L., Maurer T.T., Rowlen K.L., 2002, Quantitative intercomparison of transmission electron microscopy, flow cytometry, and epifluorescence microscopy for nanometric particle analysis. *Anal. Biochem.* 304, 249-256
- Fisman DN, Greer AL, Brouhanski G, Drews SJ. 2009. Of gastro and the gold standard: evaluation and policy implications of norovirus test performance for outbreak detection. *J Transl Med.* 7:23.
- Fuhrman J.A., 1999, Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* 399, 541
- Gabig-Cimińska M., Holmgren A., Andresen H., Barken K. B., Wumpelmann M., Albers J., Hintsche R., Breitenstein A., Neubauer A., Łoś M., Czyż A., Węgrzyn G., Silfversparre G., Jurgen B., Schweder T., Enfors S.-O., 2004a, Electric chips for rapid detection and quantification of nucleic acids. *Biosens. Bioelectron.* 19, 537

- Gabig-Cimińska M., Łoś M., Holmgren A., Albers J., Czyż A., Hintsche R, Węgrzyn G., Enfors S-O., 2004b, Detection of bacteriophage infection and prophage induction in bacterial cultures by means of electric DNA chips. *Anal. Biochem.* **342**, 84
- Gajendragad M. R., Kamath K. N. Y., Anil P. Y., Prabhudas K., Natarajan C., 2001, Development and standardization of a piezo electric immunobiosensor for foot and mouth disease virus typing. *Vet. Microbiol.* **78**, 319
- Garcia S., Crance J.M., Billecocq A., Peinnequin A., Jouan A., Bouloy M., Gardin D., 2001, Quantitative real-time PCR detection of Rift Valley fever virus and its application to evaluation of antiviral compounds. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 4456
- García-Aljaro C, Muñoz-Berbel X, Jenkins AT, Blanch AR, Muñoz FX. 2008 Surface plasmon resonance assay for real-time monitoring of somatic coliphages in wastewaters. *Appl Environ Microbiol.* **74**:4054-8.
- Gerba C.P., Kaye D., 2003, Caliciviruses: A major cause of foodborne illness *J. Food Sci.* **68**, 1136
- Goeller LJ, Riley MR. 2007 Discrimination of bacteria and bacteriophages by Raman spectroscopy and surface-enhanced Raman spectroscopy. *Appl Spectrosc.* **61**:679-85
- Graham D.L., Ferreira H.A., Freitas P.P., 2004, Magnetoresistive-based biosensors and biochips. *Trends Biotechnol.* **22**, 455-462
- Guiducci C. Stagni C., Zuccheri G., Bogiolo A., Benini L., Samori B., Ricco B., 2004, DNA detection by integrable electronics. *Biosens. Bioelectron.* **19**, 781
- Guillaume V., Lefeuvre A., Faure C., Marianneau P., Buckland R., Lam S.K., Wild F., Deubel V., 2004 Specific detection of Nipah virus using real-time RT-PCR (TaqMan)., *J. Virol. Methods* **120**, 229
- Gunter R.L. Delinger W.G., Manygoats K., Kooser A., Porter T.L., 2003, Viral detection using an embedded piezoresistive microcantilever sensor. *Sens. Actuators. A Phys.* **107**, 219
- Gupta A., Akin D., Bashir R., 2004, Single virus particle detection using microresonators with nanoscale thickness. *Appl. Phys. Lett.* **84**, 1976
- Hammond G.W., Hazelton P.R., Chuang I., Klisko B., 1981 Improved detection of viruses by electron microscopy after direct ultracentrifuge preparation of specimens., *J. Clin. Microbiol.* **14**, 210
- Hara S., Terauchi K., Koike I., 1991 Abundance of viruses in marine waters: Assessment by epifluorescence and transmission electron microscopy., *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2731-2734
- Hazelton P.R., Gelderblom H.R., (2003). Electron microscopy for rapid diagnosis of emerging infectious agents. *Emerging Infect. Dis.* **9**, 294
- Hianik T., Gajdos V., Krivanek R., Oretskaya T., Metelev V., Volkov E., Vadgama P., 2001, Amperometric detection of DNA hybridization on a gold surface depends on the orientation of oligonucleotide chains. *Bioelectrochemistry* **53**, 199

- Holgate, CS, Jackson, P, Cowen, PN, Bird, CC. 1983. Immunogold-silver staining: new method of immunostaining with enhanced sensitivity. *J. Histochem. Cytochem.* 31: 938-944
- Huff J.L., Lynch M. P., Nettikadan S., Johnson J.C., Vengasandra S., Henderson E., 2004, Label-free protein and pathogen detection using the atomic force microscope. *J. Biomol. Screen.* 9, 491
- Iqbal S. S., Mayo M. W., Bruno J. G., Bronk B. V., Batt C. A., Chambers J. P., 2000, A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents. *Biosens. Bioelectron.* 15, 549-578
- Jean J., D'Souza D.H., Jaykus L-A., 2004, Multiplex nucleic acid sequence-based amplification for simultaneous detection of several enteric viruses in model ready-to-eat foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6603
- Kawaguchi K., Kaneko S., Honda M., Kawai H.F., Shirota Y., Kobayashi K., 2003, Detection of hepatitis B virus DNA in sera from patients with chronic hepatitis B virus infection by DNA microarray method. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1701
- Khaled A. Mahmoud, Sabahudin Hrapovic, and John H. T. Luong 2008 Picomolar Detection of Protease Using Peptide/Single Walled Carbon Nanotube/Gold Nanoparticle-Modified Electrode. *ACS Nano*, 2, 1051-1057
- Kim SW, Kim MG, Kim J, Lee HS, Ro HS. 2008 Detection of the mycovirus OMSV in the edible mushroom, *Pleurotus ostreatus*, using an SPR biosensor chip. *J Virol Methods.* 148:120-4
- Kintzios S., Bem F., Mangana O., Nomikou K., Markoulatos P., Alexandropoulos N., Fasseas C., Arakeylan V., Petrou A.-L., Soukoulis K., Moschopoulou G., Yialouris C., Simonian A., (2004) Study on the mechanism of Bioelectric Recognition Assay: evidence for immobilized cell membrane interactions with viral fragments. *Biosens. Bioelectron.* 20, 907-916
- Kintzios S., Pistola E., Konstas J., Bem F., Matakias T., Alexandropoulos N., Biselis I., Levin R., 2001a, The application of the bioelectric recognition assay for the detection of human and plant viruses: definition of operational parameters. *Biosens. Bioelectron.* 16, 467
- Kintzios S., Pistola E., Panagiotopoulos P., Bomsel M., Alexandropoulos N., Bem F., Ekonomou G., Biselis J., Levin R., 2001b, Bioelectric recognition assay (BERA). *Biosens. Bioelectron.* 16, 325
- Kobayashi S., Natori K., Takeda N., Sakae K., 2004, Immunomagnetic Capture RT-PCR for detection of Norovirus from foods implicated in a foodborne outbreak. *Microbiol. Immunol.* 48, 201
- Komar N., Lanciotti R., Bowen R., Langevin S., Bunning M., 2002, Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerging Infect. Dis.* 8, 741
- Komurian-Pradel F., Perret M., Deiman B., Sodoyer M., Lotteau V., Paranhos-Baccala G., Andre P., 2004, Strand specific quantitative real-time PCR to study replication of hepatitis C virus genome. *J. Virol. Methods* 116, 103
- Kreil T.R., Zimmermann K., Burger I., Attakpah E., Mannhalter J. W., Eibl M.M., 1997, Vaccination against tick-borne encephalitis virus, a flavivirus, prevents disease but not infection, although viremia is undetectable. *J. Virol. Methods* 68, 1

- Kricka L.J., 1998 Miniaturization of analytical systems., *Clin. Chem.* **44**, 2008–2014
- Lanciotti R., Kerst A., 2001, Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid detection of West Nile and S. Louis encephalitis viruses. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 4506
- Lanciotti R.S., Kerst A.J., Nasci R.S., Godsey M.S., Mitchell C.J., Savage H.M., Komar N., Panella N.A., Allen B.C., Volpe K.E., Davis B.S., Roehring J.T., 2000, Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 4066
- Lapa S., Mikheev M., Shchelkunov S., Mikhailovich V., Sobolev A., Blinov V., Babkin I., Guskov A., Sokunova E., Zasedatelev A., Sandakhchiev L., Mirzabekov A., 2002, Species-Level Identification of Orthopoxviruses with an Oligonucleotide Microchip, *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 753
- Lau L.-T., Banks J., Aherne R., Brown I.H., Dillon N., Collins R.A., Chan K.-Y., Fung Y.-W.W., Xing J., Yu A.C.H., 2003, Nucleic acid sequence-based amplification methods to detect avian influenza virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 336
- Lei Y, Chen H, Dai H, Zeng Z, Lin Y, Zhou F, Pang D. 2008. Electroless-plated gold films for sensitive surface plasmon resonance detection of white spot syndrome virus. *Biosens Bioelectron.* **23**:1200-7.
- Leonardi G.P., Leib H., Birkhead G.S., Smith C., Costello P., Conron W., (1994). Comparison of rapid detection methods for influenza A virus and their value in health-care management of institutionalized geriatric patients. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 70-74
- Linnen JM, Gilker JM, Menez A, Vaughn A, Broulik A, Dockter J, Gillotte-Taylor K, Greenbaum K, Kolk DP, Mimms LT, Giachetti C. 2002. Sensitive detection of genetic variants of HIV-1 and HCV with an HIV-1/HCV assay based on transcription-mediated amplification. *J Virol Methods.* **102**: 139-55.
- Liu S, Hu Y, Jin J, Zhang H, Cai C. 2009 Electrochemical detection of hepatitis C virus based on site-specific DNA cleavage of BamHI endonuclease. *Chem Commun (Camb).* **7**: 1635-7
- Long W.-H., Xiao H.-S., Gu X.-M., Zhang Q.-H., Yang H.-J., Zhao G.-P., Liu J.-H., 2004, A universal microarray for detection of SARS coronavirus. *J. Virol. Methods* **121**, 57-63
- Łoś M., Węgrzyn G. (2007). Electric bio-chips for rapid and quantitative detection of specific biological materials. *Current Nanoscience* **3**, 129-133
- Łoś M., Łoś J.M., Blohm L., Hintsche R., Spillner E., Grunwald T., Węgrzyn G., 2005, Rapid detection of viruses using electrical biochips and anti-virion sera. *Lett. Appl. Microbiol.* **40**, 479-485
- Łoś M, Łoś JM, Węgrzyn G. (2008). Rapid identification of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) using electric biochips. *Diagnostic Molecular Pathology*, **17**, 179-184
- Łoś J.M, Piotr Golec P., Węgrzyn G., Węgrzyn A, Łoś M. (2008a). Simple method for plating Escherichia coli bacteriophages forming very small plaques or no plaques under standard conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 5113-5120
- Mackay I. M., Arden K. E., Nitsche A., 2002, Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1292

- Mackay I.M., 2004, Real-Time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 190
- Mackay I.M., Jacob K.C., Woolhouse D., Waller K., Syrmis M.W., Whiley D.M., Siebert D.J., Nissen M., Sloots T.P., 2003, Molecular assays for detection of human metapneumovirus. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 100
- Mannelli I., Minunni M., Tombelli S., Mascini M., 2003, Quartz crystal microbalance (QCM) affinity biosensor for genetically modified organisms (GMO) detection. *Biosens. Bioelectron.* **18**, 129
- Marianneau P., Megret F., Olivier R., Morens D.M., Deubel V., 1996, Dengue virus binding to human hepatoma hepg2 and simian vero cell surfaces differs. *J. Gen. Virol.* **77**, 2547
- Marie D., Brussard C.P.D., Thyraug R., Bratbak G., Vaultot D., 1999, Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 45
- Mastrangelo C.H., Burns M.A., Burke D.T., 1998, Microfabricated devices for genetic diagnostics *Proc. IEEE Inst. Electr. Electron. Eng.* **86**, 1769
- Meric B, Kerman K, Ozkan D, Kara P, Erensoy S, Akarca US, Mascini M, Ozsoz M. 2002 Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue. *Talanta.* **56**:837-46.
- Mezzasoma L., Bacarese-Hamilton T., Di Cristina M., Rossi R., Bistoni F., Crisanti A., (2002), Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious diseases. *Clin. Chem.* **48**, 121-130
- Molden T, Kraus I, Skomedal H, Nordstrøm T, Karlsen F. 2007. PreTect HPV-Proofer: real-time detection and typing of E6/E7 mRNA from carcinogenic human papillomaviruses. *J Virol Methods.* **142**: 204-12.
- Moore C, Corden S, Sinha J, Jones R. 2008 Dry cotton or flocked respiratory swabs as a simple collection technique for the molecular detection of respiratory viruses using real-time NASBA. *J Virol Methods.* **153**:84-9.
- Nagasse-Sughara T.K., Kisielius J.J., Ueda-Toro M., Curti S.P., Figueiredo C. A., Cruz A.S., Silva M.M.J., Ramos C.H., Silva M.C.C., Sakurai T., Salles-Gomes L.F., 2004, Human vaccinia-like virus outbreaks in São Paulo and Goiás States, Brazil: virus detection, isolation and identification. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* **46**, 315
- Najioullah F., Thouvenot D., Lina B., 2001, Development of a real-time PCR procedure including an internal control for the measurement of HCMV viral load. *J. Virol. Methods* **92**, 55
- Nassuth A., Pollari E., Helmeczy K., Stewart S., Kofalvi S.A., 2000, Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extract. *J. Virol. Methods* **90**, 37
- Nebling E., Grunwald T., Albers J., Schafer P., Hintsche R., (2004) Electrical detection of viral DNA using ultramicroelectrode arrays. *Anal. Chem.* **76**, 689-696
- Nettikadan S. R., Johnson J.C., Mosher C., Henderson E., 2003, Virus particle detection by sloid phase immunocapture and atomic force microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 540

- Nettikadan S. R., Johnson J.C., Vengasandra S., Muys J., Henderson E., 2004, ViriChip: a solid phase assay for detection and identification of viruses by atomic force microscopy. *Nanotechnology* **15**, 383
- O'Sullivan C. K., Guilbault G. G., 1999, Commercial quartz crystal microbalances—theory and applications. *Biosens. Bioelectron.* **11**, 663
- Ohtsuka K, Endo H, Morimoto K, Vuong BN, Ogawa H, Imai K, Takenaka S. 2008 Detection of an antibody to avian influenza virus by an electrochemical immunoassay (eELISA). *Anal Sci.* 24:1619-22.
- Olson V.A., Laue T., Laker M.T., Babkin I.V., Drosten C., Shchelkunov S.N., Niedrig M., Damon I.K., Meyer H., 2004, *J. Clin. Microbiol.* **42**, 1940
- Pas S.D., Fries E., deMan R.A., Osterhaus A.D.M.E., Niesters H.G.M., 2000, Development of a quantitative real-time detection assay for hepatitis B virus DNA and comparison with two commercial assays. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2897
- Pividori M.I., Merkoci A., Alegret S., 2000, Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. *Biosens. Bioelectron.* **15**, 291
- Porter MD, Driskell JD, Kwart KM, Lipert RJ, Neill JD, Ridpath JF. 2006 Detection of viruses: atomic force microscopy and surface enhanced Raman spectroscopy. *Dev Biol (Basel)*.;126:31-9
- Qi C, Lin Y, Feng J, Wang ZH, Zhu CF, Meng YH, Yan XY, Wan LJ, Jin G. 2009 Phage M13KO7 detection with biosensor based on imaging ellipsometry and AFM microscopic confirmation. *Virus Res.* 140:79-84.
- Radke K.M., Nettikadan S.R, Johnson J.C., Vengasandra S.G., Henderson E., 2004, ViriChip enhances reverse transcriptase polymerase chain reaction in biological fluids and environmental samples. *Anal. Biochem.* **330**, 350
- Reed J.A., Nador R.G., Spaulding D., Tani Y., Cesarman E., Knowles D.M., 1998, Demonstration of Kaposi's sarcoma-associated Herpes Virus cyclin D homolog in cutaneous Kaposi's sarcoma by colorimetric in situ hybridization using a catalyzed signal amplification system. *Blood*, **91**, 3825
- Reid S.M., Ferris N.P., Hutchings G.H., King D.P., Alexandersen S., 2004, Evaluation of real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for the detection of swine vesicular disease virus. *J. Virol. Methods* 116, 169
- Richards G.P., Watson M.A., Kingsley D.H., 2004, A SYBR green, real-time RT-PCR method to detect and quantitate Norwalk virus in stools. *J. Virol. Methods* **116**, 63
- Saville R.D., Constantine N.T., Cleghorn F.R., Jack N., Bartholomew C., Edwards J., Gomez P., Blattner W.A., 2001, Fourth-generation enzyme-linked immunosorbent assay for the simultaneous detection of human immunodeficiency virus antigen and antibody. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2518
- Schalasta G., Arents A., Schmid M., Braun R.W., Enders G., 2000, Fast and Type-Specific Analysis of Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 by Rapid PCR and Fluorescence Melting-Curve-Analysis. *Infection* **28**, 85

Schofield D. J., Dimmock N. J., 1996, Determination of affinities of a panel of IgGs and Fabs for whole enveloped (influenza A) virions using surface plasmon resonance. *J. Virol. Methods* **62**, 33

Schweiger B., Zadow I., Heckler R., Timm H., Pauli G., 2000, Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1552

Shanmukh S, Jones L, Driskell J, Zhao Y, Dluhy R, Tripp RA. 2006. Rapid and sensitive detection of respiratory virus molecular signatures using a silver nanorod array SERS substrate. *Nano Lett.* **6**: 2630-6.

Shi P.-Y., Kauffman E.B., Ren P., Felton A., Tai J.H., Dupius II A.P., Jones S.A., Ngo K.A., Nicholas D.C., Maffei J., Ebel G.D., Bernard K.A., Kramer L.D., 2001, High-throughput detection of West Nile virus RNA *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1264

Shuna Liu, Yaojuan Hu, Juan Jin, Hui Zhang* and Chenxin Cai 2009 Electrochemical detection of hepatitis C virus based on site-specific DNA cleavage of BamHI endonuclease. *Chem. Commun.*, , 1635–1637

Speel E.J.M., Hopman A.H.N., Komminoth P., 1999, Amplification methods to increase the sensitivity of in situ hybridization: Play CARD(S). *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 281

Steininger C., Kundi M., Aberle S.W., Aberle J.H., Popow-Kraupp T., 2002, Effectiveness of reverse transcription-PCR, virus isolation, and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of influenza A virus infection in different age groups. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2051

Striebel H.-M., Birch-Hirschfeld E., Eggerer R., Foldes-Papp Z., 2003, Virus diagnostics on microarrays. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **4**, 401

Su X., Li S.F.Y., Liu W., Kwang J., 2000, Piezoelectric quartz crystal based screening test for porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs. *Analyst*, **125**, 725

Sun W, Jiao K, Zhang S. 2001. Electrochemical ELISA for the detection of cucumber mosaic virus using o-phenylenediamine as substrate. *Talanta.* **55**:1211-8.

Tamarin O., Comeau S., Dejous C., Moyet D., Rebiere D., Beziau J., Pistre J., 2003, Real time device for biosensing: design of a bacteriophage model using love acoustic waves. *Biosens. Bioelectron.* **18**, 755

Tetzner R. 2009. Prevention of PCR cross-contamination by UNG treatment of bisulfite-treated DNA. *Methods Mol Biol.* **507**:357-70.

Tinazli A, Piehler J, Beuttler M, Guckenberger R, Tampé R. Native protein nanolithography that can write, read and erase. *Nat Nanotechnol.* **2007** **2**:220-5.

Tsen KT, Dykeman EC, Sankey OF, Lin NT, Tsen SW, Kiang JG. Observation of the low frequency vibrational modes of bacteriophage M13 in water by Raman spectroscopy. *Virol J.* **2006** **Sep 22**;3:79.

Tsen KT, Dykeman EC, Sankey OF, Tsen SW, Lin NT, Kiang JG. 2007 Probing the low-frequency vibrational modes of viruses with Raman scattering--bacteriophage M13 in water. *J Biomed Opt.* **Mar-Apr**;12(2):024009.

Uhde K., Kerschbaumer R. J., Koenig R., Hirschl S., Lemaire O., Boonham N., Roake W., Himmler G., 2000, Improved detection of beet necrosis yellow vein virus in DAS ELISA by means of antibody single chain fragments (scoff) which were selected to protease stable epitopes from phage display library. *Arch. Virol.* **145**, 179

Uttenhaler E., Schraml M., Mandel J., Dorst S., 2001, Ultrasensitive quartz crystal microbalance sensors for detection of M13-Phages in liquids. *Biosens. Bioelectron.* **16**, 735

van Elden L.J.R., van Loon A.M., van der Beek A., Hendriksen K.A.W., Hoepelman A.I.M., van Kraaij M.G.J., Schipper P., Nijhuis M., 2003, Applicability of a real-time quantitative PCR assay for diagnosis of respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4378

van Gijswijk R.P.M., Zijlmans H.J.M.A.A., Wiegant J., Bobrow M. N., Erickson T.J., Adler K. E., Tanke H. J., Raap A.K., 1997, Fluorochrome-labeled tyramines: use in immunocytochemistry and fluorescence *in situ* hybridization *J. Histochem. Cytochem.* **45**, 375

Vernon S.D., Farkas D.H., Unger E.R., Chan V., Miller D.L., Chen Y-P., Blackburn G. F., Reeves C.W., 2003, Bioelectronic DNA detection of human papillomaviruses using eSensor™: a model system for detection of multiple pathogens. *BMC Infect. Dis.* **3**: 12

Vetcha S., Wilkins E., Yates T., 2002, Detection of hantavirus infection in hemolyzed mouse blood using alkaline phosphatase conjugate. *Biosens. Bioelectron.* **17**, 901

Wabuyele MB, Vo-Dinh T. 2005 Detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA sequence using plasmonics nanoprobe. *Anal Chem.* **77**:7810-5.

Wang D., Coscoy L., Zylberberg M., Avila P.C., Boushey H.A., Ganem D., DeRisi J.L., 2002, Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 15687

Wang J., Rivas G., Fernandes J.R., Paz L.J.L., Jiang M., Waymire R., 1998, Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor. *Anal. Chim. Acta* **375**, 197

Wengler G., 1989, Cell-associated West Nile flavivirus is covered with E + pre-M protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release. *J. Virol.* **63**, 2521

Witt D.J., Kemper M., Stead A., Sillkens P., Ginocchio C., Espy M.J., Paya C.V., Smith T.F., Roeles F., Caliendo A.M., 2000, Analytical performance and clinical utility of nucleic acid sequence-based amplification assay for detection of cytomegalovirus infection. *J. Clin. Microbiol.*, **38** 3994

Wittekindt C., Fleckenstein B., Wiesmuller K.-H., Eing B. R., Kuhn J.E., Detection of human serum antibodies against type-specifically reactive peptides from the N-terminus of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 and type 2 by surface plasmon resonance. 2000, *J. Virol. Methods* **87**, 133

Yang J.M., Bell J., Huang Y., Tirado M., Thomas D., Forster A.H., Haigis R.W., Swanson P.D., Wallace R.B., Martinsons B., Krihak M., 2002 An integrated, stacked microlaboratory for biological agent detection with DNA and immunoassays., *Biosens. Bioelectron.* **17**, 605

Ye Y.K., Zhao J.H., Yan F., Zhu Y.L., Ju H.X., 2003, Electrochemical behavior and detection of hepatitis virus DNA PCR production at gold electrode. *Biosens. Bioelectron.* **18**, 1501

Zehbe I., Hacker G.W., Su H., Hauser-Kronberger C., Hainfeld J.F., Tubbs R.,1997, Sensitive in situ hybridization with catalyzed reporter deposition, streptavidin-Nanogold, and silver acetate automethallography: detection of single copy-human papillomavirus. *Am. J. Pathol.*, **150**, 1553

Zhou X., Liu L., Hu M., Wang L., Hu J., 2002, Detection of hepatitis B virus by piezoelectric biosensor. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **27**, 341