

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

УДК 54.061, 54.062, 54.066

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ SARS-COV-2

Мария Сергеевна Андрианова¹, Ольга Сергеевна Панова², Алексей Александрович Титов³, Наталья Владимировна Комарова⁴, Александр Евгеньевич Кузнецов⁵

¹⁻⁵ Научно-производственный комплекс «Технологический центр»

Автор, ответственный за переписку: Наталья Владимировна Комарова,
nat.v.kom@gmail.com

Аннотация. Вспышка коронавирусной инфекции 2019 г. (COVID-19) приобрела глобальный масштаб. Беспрецедентные социально-экономические последствия пандемии выявили необходимость в улучшении существующих методов диагностики и разработке новых методов для борьбы с распространением заболевания. Традиционные технологии, такие как количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени (qRT-PCR), считаются золотым стандартом тестирования на COVID-19 с тех пор, как была опубликована последовательность генома SARS-CoV-2. Тем не менее, они отнимают много времени, трудоемки, недоступны в удаленных условиях и не гарантируют отсутствия ложных результатов. Электрохимические биосенсоры представляют альтернативные подходы к обнаружению вирусных нуклеиновых кислот или вирусных антигенов. Высокая чувствительность, относительная дешевизна датчиков и оборудования, удобное управление, быстрый анализ и пригодность для миниатюризации могут способствовать развитию тестирования COVID-19 в местах оказания медицинской помощи (POC, point-of care). В обзоре рассматриваются и критически обсуждаются современные электрохимические биосенсоры для детектирования SARS-CoV-2 и связанные с ними технологии.

Ключевые слова: коронавирус, COVID-19, SARS-CoV-2, электрохимический сигнал, биосенсор, наноматериалы, иммуносенсор, экспресс-тест

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-5-407-440

Список сокращений: ВОЗ – всемирная организация здравоохранения, ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром, ПЭТФ – полиэтилентерефталат, ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания, ACE2 – мембранный ангиотензин-превращающий фермент 2, АО – акридиновый оранжевый, AP – ДНК зонд, APBA – 3-Аминофенилбороновая кислота, AuNI – золотой наноостров, AuTFME – тонкопленочный металлический электрод на основе золота, BERA – био-электрический анализ распознавания, BSA – бычий сывороточный альбумин, CDC – центры по контролю и профилактике заболеваний, CE – вспомогательный электрод, CNT – углеродные нанотрубки, CNT-FET – полевой транзистор с углеродными нанотрубками, CP – захватывающий зонд, CP-MNB – захватывающий зонд, конъюгированный с магнитными частицами, DGDMFET – биосенсор с двойным затвором и диэлектрической модуляцией FET, EDL – двойной электрический слой, EIS – электрохимическая импедансная спектроскопия, ELISA – иммуноферментный анализ, FET – полевой транзистор, FTO – оксид олова, легированный фтором, G-FET – графеновый полевой транзистор, GNPs – графеновые нанопластинки, GO – оксида графена, HA – гемагглютинин гриппа,

HDA – геликазозависимая амплификация, ICTV – международный комитет по таксономии вирусов, Ids – ток стока, IL-1b – интерлейкин 1b, IL-6 – интерлейкин 6, Kd – константа диссоциации, LAMP – петлевая изотермическая амплификация, LIG – лазерно-индуцированный графен, LIG-FET – лазерно-индуцированный графеновый полевой транзистор, LOD – предел обнаружения, LOQ – предел количественного определения, LP – ДНК зонд, LSPR – локализованный поверхностный плазмонный резонанс, MB – метиленовый синий, MB – магнитные частицы, MIP – полимер с молекулярными отпечатками, MIP – молекулярно отпечатанный полимер, NASBA – амплификация на основе последовательности нуклеиновых кислот, NEAR – реакция амплификации фермента с разрывом, NGAL – липокалин, ассоциированный с желатиной нейтрофилов, или липокалин 2, NSP – неструктурный белок, nAT – нейтрализующие антитела, ORF1 – открытая рамка считывания 1, ORF1ab – открытая рамка считывания 1 ab, PAA – поли(аллиламин)гидрохлорид, PAMPs – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, PBS – фосфатно-солевой буфер, PМО – фосфордиамидат-морфолино олигомер, POC – point-of care, POCT – point-of-care-testing, PPT – плазмонный фототермический эффект, PRR – образ-распознающие рецепторы, PSS – поли(натрий-4-стирол)сульфонат, Pt-GFET – графеновый полевой транзистор с Pt, qRT-PCR – ПЦР в реальном времени или количественная ПЦР, RBD – рецептор-связывающий домен, RCA – амплификация по типу катящегося кольца, RdRp – РНК-зависимая РНК-полимераза, RE – электрод сравнения, RP – зонд-репортер, S – шиповидный белок вируса SARS-CoV-2, SAM – самособирающийся монослой, SCX8 – п-сульфокаликс[8] арен, SCX8-RGO – SCX8 функционализированный восстановленным оксидом графена, SDA – амплификация замещения цепи, SELEX – систематическая эволюция лигандов экспоненциальным обогащением, SiNP – наночастицы кремния, SiNW-FET – сенсор на основе кремниевого нанопроволочного полевого транзистора, Si-RP – зонд-репортер, связанный с диоксидом кремния, SPCE – углеродный электрод трафаретной печати, SWV – квадратноволновая вольтамперометрия, TB – толуидиновый синий, TMDC – дихалькогенид переходного металла, TNF – фактор некроза опухоли, Vero – эпителиальные клетки почек, Vg – входное напряжение затвора, WE – рабочий электрод.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (уникальный номер проекта FNRМ-2021-0002).

Для цитирования: Андрианова М.С., Панова О.С., Титов А.А., Комарова Н.В., Кузнецов А.Е. Электрохимические биосенсоры для определения SARS-CoV-2 // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2023. Т. 64. № 5. С. 407–440.

SCIENTIFIC REVIEW

ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS FOR SARS-COV-2 DETECTION

Maria S. Andrianova¹, Olga S. Panova², Alexey A. Titov³, Natalia V. Komarova⁴, Alexander E. Kuznetsov⁵

^{1–5} Scientific and production complex “Technological Center”

Corresponding authors: Natalia V. Komarova, nat.v.kom@gmail.com

Abstract. The 2019 coronavirus disease (COVID-19) outbreak has become global. The unprecedented socioeconomic impact of the pandemic has highlighted the need to improve existing diagnostic methods and develop new methods to control the spread of the disease. Traditional technologies such as quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) have been considered the gold standard for test-

ing for COVID-19 since the SARS-CoV-2 genome sequence was published. However, they are time-consuming, labor-intensive and do not guarantee the absence of false results. Electrochemical biosensors present alternative approaches to detect viral nucleic acids or viral antigens. High sensitivity, relatively low cost of sensors and equipment, convenient management, rapid analysis, and suitability for miniaturization may contribute to the development of point-of-care (POC) testing for COVID-19. The review examines and critically discusses modern electrochemical biosensors for SARS-CoV-2 detection and related technologies.

Keywords: coronavirus, SARS-CoV-2, COVID-19, electrochemical signal, biosensor, nanomaterials, immunosensor, rapid detection, POC biosensors

Abbreviations: WHO – world health organization, ARDS – acute respiratory distress syndrome, PETP – polyethylene terephthalate, CD – cardiovascular disease, ACE2 – angiotensin-converting enzyme 2, AO – acridine orange, AP – DNA probe, APBA – 3-aminophenylboronic acid, AuNI – Au nanoisland, Au-TFME – gold-based thin-film metal electrodes, BERA – bioelectric recognition assay, BSA – bovine serum albumin, CDC – US centers for disease control and prevention, CE – counter electrode, CNT – carbon nanotube, CNT-FET – carbon nanotube field-effect transistor, CP – capture probe, CP-MNB – capture probe bound to magnetic beads, DGDMFET – dual gate dielectric modulated FET, EDL – electrical double layer, EIS – electrochemical impedance spectroscopy, ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, FET – field-effect transistor, FTO – fluorine-doped tin oxide, G-FET – graphene field-effect transistor, GNPs – graphene nanoplates, GO – graphene oxide, HA – influenza hemagglutinin, HDA – helicase-dependent amplification, ICTV – international committee on taxonomy of viruses, Ids – drain current, IL-1b – interleukin-1b, IL-6 – interleukin-6, Kd – dissociation constants, LAMP – loop-mediated isothermal amplification, LIG – laser induced grapheme, LIG-FET – laser induced graphene field-effect transistor, LOD – limit of detection, LOQ – limit of quantitation, LP – DNA probe, LSPR – localized surface plasmon resonance, MB – methylene blue, MB – magnetic beads, MIP – molecularly imprinted polymer, MIP – molecularly imprinted polymer, NASBA – nucleic acid sequence-based amplification, NEAR – nicking enzyme amplification reaction, NGAL – neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NSP – nonstructural (NS) protein, Nabs – neutralizing antibodies, ORF1 – open reading frame 1, ORF1ab – open reading frame 1ab, PAA – poly(allylamine) hydrochloride, PAMPs – pathogen-associated molecular patterns, PBS – phosphate-buffered saline, PMO – phosphorodiamidate morpholino oligomer, POC – point-of care, POCT – point-of-care-testing, PPT – plasmonic photothermal effect, PRR – pattern recognition receptors, PSS – poly(sodium-4-styrene)sulfonate, Pt-GFET – platinum graphene field-effect transistor, qRT-PCR – real-time PCR, RBD – receptor-binding domain, RCA – rolling circle amplification, RdRp – RNA dependent RNA polymerase, RE – reference electrode, RP – reporter probe, S – SARS-CoV-2 spike protein, SAM – self-assembled monolayers, SCX8 – p-sulfocalix[8]arene, SCX8-RGO – SCX8 functionalized reduced graphene oxide, SDA – strand displacement amplification, SELEX – systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SiNP – silicon nanoparticles, SiNW-FET – silicon nanowire field-effect transistors, Si-RP – silica-bound reporter probe, SPCE – screen-printed carbon electrode, SWV – square wave voltammetry, TB – toluidine blue, TMDC – transition-metal dichalcogenide, TNF – tumor necrosis factor, Vero – kidney epithelial cells, Vg – gate input voltage, WE – working electrode.

Financial support: the work is supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project FNRМ-2021-0002).

For citation: Andrianova M.S., Panova O.S., Titov A.A., Komarova N.V., Kuznetsov A.E. Electrochemical Biosensors for SARS-CoV-2 Detection // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2023. T. 64. № 5. S. 407–440.

Коронавирусная болезнь (COVID-19) распространилась с конца 2019 г. и привела к пандемии с беспрецедентными социально-экономическими последствиями. На сегодняшний день более 630 млн человек были инфицированы, в результате чего погибло более 6,5 млн человек [1]. Международный комитет по таксономии вирусов (ICTV) назвал этот вирус коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) [2]. За последние два десятилетия коронавирусы вызвали три эпидемических заболевания с возможностью передачи инфекции от человека к человеку и от животного к человеку. В 2002 г. SARS-CoV появился в провинции Гуандун (Китай) и распространился на пять континентов воздушным путем, заразив 8098 человек и вызвав 774 смерти. MERS-CoV, вызывающий тяжелую инфекцию нижних дыхательных путей у людей, появился на Аравийском полуострове в 2012 г. (где он остается серьезной проблемой общественного здравоохранения) и был экспортирован в 27 стран, заразив почти 2500 и унеся жизни 858 человек. Новый коронавирус SARS-CoV-2 впервые появился в декабре 2019 г. в Ухане, провинция Хубэй, Китай [3]. Из-за своей высокой контагиозности он быстро распространился по всему миру [4].

SARS-CoV-2 принадлежит к отряду *Nidovirales*, семейству *Coronaviridae*, подсемейству *Orthocoronavirinae*, роду *Betacoronavirus* и подроду *Sarbecovirus*, которые также включают SARS-CoV и MERS-CoV [5–7]. Вирионы семейства *Coronaviridae* имеют примерно сферическую форму, 118–140 нм в диаметре и отличаются большим шиповидным гликопротеином, отходящим от оболочки вируса, что и дало название всему семейству.

SARS-CoV-2 имеет разную степень выраженности симптомов: от бессимптомного течения болезни до летальных исходов. Метаанализ показал, что 15% инфицированных COVID-19 ($n = 51\,155$) не имели симптомов [8]. Тот же метаанализ показал, что у половины пациентов, не имеющих симптомов на момент постановки диагноза, позднее развились симптомы, в частности лихорадка, кашель, миалгия, утомляемость [9] и аносмия [10]. Тяжелые случаи SARS CoV-2 могут прогрессировать от одышки до двусторонней интерстициальной пневмонии, острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), сепсиса и полиорганной дисфункции, в дополнение к острой дисфункции сердца, почек и печени [11]. Неврологически COVID-19 влияет на обоняние,

поражая обонятельные клетки [12, 13]. Известно, что его предок, SARS-CoV, атакует центральную нервную систему (ЦНС), вызывая демиелинизирующие и нейродегенеративные заболевания позвоночника [14]. Кроме того, существуют сопутствующие заболевания, влияющие на возникновение и тяжесть этих симптомов. Например, заболевания, связанные с метаболическим синдромом (диабет, ожирение и т.д.), действуют как сопутствующие, создавая избыточную нагрузку на системы органов, пораженные COVID-19 [15]. Сообщалось, что у пациентов с COVID-19 с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ) и гипертензией уровень смертности составляет 6% и 10,5%, соответственно, тогда как у пациентов без этих сопутствующих заболеваний уровень смертности составляет 2,3% [15].

SARS-CoV-2 сначала запускает врожденный иммунитет, который служит для быстрого и неспецифического предотвращения распространения вируса внутри организма [16]. Клетки врожденного иммунитета (например, макрофаги, нейтрофилы и тучные клетки), экспрессирующие образ-распознающие рецепторы (PRR), запускают иммунный ответ хозяина при связывании патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMPs), например поверхностных гликопротеинов или вирусной РНК [16, 17]. Это приводит к высвобождению про-воспалительных цитокинов, таких как IL-6 и TNF [18], которые рекрутируют лейкоциты, чтобы помочь организму бороться с инфекцией [19]. Однако в тяжелых случаях системное воспаление может вызвать респираторные, сердечно-сосудистые или неврологические осложнения [20]. Например, IL-1b и IL-6 могут привести к воспалению легких, лихорадке и фиброзу [21]. Высвобождение провоспалительных цитокинов активирует адаптивную иммунную систему, в состав которой входят Т- и В-лимфоциты. Т-лимфоциты (CD4+ и CD8+) «запоминают» антигены и уничтожают инфицированные клетки, а впоследствии они способны рекрутировать другие иммунные клетки делать то же самое [22]. В-лимфоциты способствуют выработке антител, которые прикрепляются к антигенам и маркируют их для разрушения [22]. У пациентов с COVID-19 может быть лимфоцитопения (дефицит лимфоцитов), что замедляет их иммунный ответ на инфекцию [23]. Сообщалось о лимфоцитопении в 25% легких случаев COVID-19 [24] и в 80% критических случаев [25]. Когда Т-клетки чрезмерно стимулируются антигенами, они постепенно входят в состояние

истощения [23]. Поскольку возбудитель все еще присутствует, провоспалительные цитокины высвобождаются в петле положительной обратной связи. В результате «цитокиновый шторм» может привести к сепсису или полиорганной недостаточности [20]. Таким образом, провоспалительные цитокины играют ключевую роль в тяжести и прогрессировании COVID-19.

Показатели смертности от SARS-CoV-2 могут значительно различаться в зависимости от географического региона. Отчеты показывают, что SARS-CoV-2 быстро распространяется по странам, поэтому появляются геномы с новыми очагами мутаций [26]. Недавно были охарактеризованы тринадцать вариационных сайтов в открытой рамке считывания ORF1 SARS-CoV-2, при этом в некоторых позициях частота мутаций достигает 30% [27]. Мутагенный процесс вирусного генома зависит от вирусных ферментов, которые реплицируют нуклеиновые кислоты. Ферменты характеризуются небольшой или отсутствующей способностью к корректуре и/или пострепликативной репарации нуклеиновых кислот. В большинстве вирусов РНК-полимераза не обладает корректирующей способностью, за некоторыми исключениями, например в отряде *Nidovirales* (к которому относится род *Coronavirus*). Восемь новых рецидивизирующих мутаций РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) в SARS-CoV-2 были охарактеризованы Pachetti et al. с разной частотой встречаемости в Европе, Азии и Северной Америке. Каждый из них обладает разным мутационным паттерном, что свидетельствует о вкладе RdRp в поддерживание способности корректуры [26].

1. Существующие тесты SARS-CoV-2

В настоящее время для диагностики COVID-19 широко используются три вида тестов: количественная ПЦР с обратной транскрипцией (qRT-PCR, гены вирусной РНК), тесты на антигены (вирусные белки) и серологические (антитела IgM и IgG).

ПЦР-тесты считаются золотым стандартом тестирования на COVID-19 с тех пор, как была опубликована последовательность генома SARS-CoV-2 [28]. На сегодняшний день на рынке доступны многочисленные тестовые наборы для qRT-PCR, такие как CDC 2019-Novel Coronavirus Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA), ExProbe™ SARS-CoV-2 Testing Kit (TBG Diagnostics Corp., New Taipei

City, Taiwan), Xpert Xpress SARS-CoV-2 test (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA), Abbott RealTime SARS-CoV-2 RT-PCR Kit (Abbott, Chicago, IL, USA), TaqPath COVID-19 Combo Kit (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) и PerkinElmer® New Coronavirus Nucleic Acid Detection Kit (PerkinElmer, Inc., Austin, TX, USA). Кроме того, для обнаружения используются методы изотермической амплификации, такие как амплификация на основе последовательности нуклеиновых кислот (NASBA), петлевая изотермическая амплификация (LAMP), амплификация замещения цепи (SDA), реакция амплификации фермента с разрывом (NEAR), амплификация по типу катящегося кольца (RCA) и геликазозависимая амплификация (HDA) [29, 30]. Некоторые авторы сообщали о ложноотрицательных или ложноположительных результатах qRT-PCR в диапазоне десятков процентов [31, 32]. Так, в Китае сообщалось о 20–40% ложноотрицательных результатов [33]. Ложноположительные результаты имеют экономические последствия карантина, а в случае ложноотрицательных результатов инфицированные люди могут распространять вирус, даже не имея симптомов. Из-за вышеупомянутых мутаций раннее обнаружение с помощью ПЦР может быть затруднено по причине возможного несоответствия праймеров с мишенями [34]. Следовательно, рекомендуется сосредоточиться на консервативных областях вирусного генома и множественных генах-мишенях вируса, чтобы свести к минимуму вероятность ложноотрицательных результатов [35]. Было выдвинуто предположение, что помимо генетических мутаций на результаты ПЦР-тестов могут влиять тип образца, кинетика отбора проб и вирусной нагрузки [36]. Технические недостатки qRT-PCR, такие как длительное время обработки, трудоемкость, использование специализированных инструментов, квалифицированного персонала и непреодолимые ложноотрицательные результаты, побуждают к дальнейшим усилиям по разработке более надежных систем диагностики для тщательного скрининга [37–40].

Тесты на антигены нацелены на белки на поверхности или внутри вируса. В качестве чувствительных компонентов они используют антитела против соответствующих антигенов. Аффинность антител к антигенам (достигающая наномолярного диапазона в случае хороших антител) привела к появлению различных электрохимических биосенсоров, начиная от

ELISA с ферментным усилением и заканчивая форматами без меток. Тем не менее, существует множество проблем, с которыми сталкиваются исследования на основе антител. Во-первых, дороговизна антител. Во-вторых, многие исследователи подчеркивают низкое качество антител, используемых в биомедицинских исследованиях, что приводит к их низкой надежности из-за связывания с множеством нерелевантных антигенов [41, 42]. Инженерия рекомбинантных антител предоставила широкие возможности для их модификаций с помощью меток, а также получения или создания фрагментов антител. В отличие от гетерогенных поликлональных антител, моноклональные и рекомбинантные антитела представляют собой гомогенные молекулы, которые связываются с отдельными антигенными эпитопами.

Некоторые тесты на антигены доступны, они разрабатываются такими компаниями, как «Quidel», «OraSure», «Iceni Diagnostics» и «E25Bio». Эти тесты на антигены обычно основаны на иммуноферментном анализе (ELISA) и предусматривают оптическое считывание. Новые тесты обычно требуют флуоресцентной маркировки или закрепления наночастиц для усиления выходного сигнала. Имеются сообщения, вызывающие озабоченность по поводу эффективности доступных тестов на антигены [43]. Например, анализ показывает, что каждое 10-кратное увеличение LOD, как ожидается, увеличивает число ложноотрицательных результатов на 13%, пропуская еще одного из восьми инфицированных пациентов [44].

Серологические тесты определяют статус анти-SARS-CoV-2 IgM/IgG в крови и предоставляют возможную информацию о недавнем воздействии SARS-CoV-2. При многих инфекциях специфические антитела IgM могут быть обнаружены через 3 дня после инфицирования иммунодефицитных пациентов. IgM представляют собой первую линию защиты организма от вирусных инфекций и, следовательно, могут указывать на недавнее воздействие вирусов. Напротив, IgG может быть обнаружен через несколько дней. Хотя подробный иммунный ответ на вирус SARS-CoV-2 до сих пор не описан, можно ожидать аналогичные серологические ответы, как и в случае SARS-CoV. Имеются сообщения об обнаружении антител IgM и IgG к SARS-CoV через 3–6 и 8 дней соответственно [45]. В работе [4] показано, что анти-SARS-CoV-2 IgM и IgG достигают максимума через 9 дней и в те-

чение второй недели после начала заболевания соответственно. Важно отметить, что иммунный ответ отдельных пациентов является изменчивым, что делает серологическое тестирование подверженным ошибкам. Например, в работе [46] показано, что плато-уровни IgG и IgM могут варьировать в широких пределах (более чем в 20 раз), титры IgG и IgM различаются между тяжелыми и нетяжелыми пациентами, сероконверсия имеет различные закономерности, даже встречаются случаи госпитализации с IgG- и IgM-отрицательным статусом. Комбинированные экспресс-тесты на основе IgG/IgM полезны, но не способны обеспечить надежное подтверждение SARS-CoV-2 на ранней стадии [47]. В области серологической экспресс-диагностики SARS-CoV-2 преобладают тест-полоски, которые были подробно рассмотрены в работе [48]. В настоящее время коммерческие компании продают соответствующие наборы для экспресс-диагностики или серологические наборы ELISA, обеспечивающие высокую производительность и различные форматы анализа (электрохемилюминесцентный анализ, иммуноферментный анализ или флуоресцентный иммуноанализ). Примечательно, что ни один тест не может обеспечить 100%-ю чувствительность (вероятность того, что тест будет положительным для инфицированных людей) или специфичность (вероятность того, что тест будет отрицательным для неинфицированных людей), и все результаты теста должны быть тщательно интерпретированы совместно с другими клиническими признаками, такими как изображения компьютерной томографии [49].

Ситуация пандемии создала огромную потребность в улучшении существующих методов диагностики и разработке новых методов диагностики для быстрого, недорогого и удобного подтверждения инфекции SARS-CoV-2. Использование электрохимических биосенсоров представляет собой альтернативный подход к обнаружению вирусных нуклеиновых кислот или вирусных антигенов и может способствовать развитию тестирования COVID-19 в местах оказания медицинской помощи (POC, point-of care). Применение методов «тестирования по месту оказания медицинской помощи» (POCT, point-of-care-testing) целесообразно в связи с быстрым определением статуса пациента на месте проведения тестирования.

Несомненно, электрохимическое биосенсорное исследование вирусов является сложной и амбициозной задачей. Тем не менее известно,

что электрохимическим биосенсорам присуща высокая чувствительность, относительная дешевизна датчиков и оборудования, удобное управление, быстрый анализ и возможность миниатюризации, что позволяет создавать устройства РОС. Современные электрохимические биосенсоры и связанные с ними технологии критически обсуждаются в последующих параграфах.

2. Мишени для обнаружения SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 имеет несколько подходящих мишеней для селективного детектирования: антигены (вирусные белки), вирусная РНК и частица вируса.

2.1. Белковые мишени SARS-CoV-2

Геном SARS-CoV-2 размером примерно 30 т.п.н. кодирует около 27 белков, включая 4 структурных белка, 8 вспомогательных белков и 15 неструктурных белков (рисунок). Вспомогательные белки участвуют в репликации вирусной РНК и транскрипции. К неструктурным белкам относят репликазу, протеазу и деубиквитиназу. Вирусные структурные белки включают шиповидные гликопротеины (S), мембранные гликопротеины (M), оболочечные белки (E) и нуклеокапсидные фосфопротеины (N) [50].

Одним из путей проникновения SARS-CoV-2 в организм является мембранный ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2), который можно найти в сердце, легких, почках и эндотелии [51]. ACE2 способствует деградации ангиотензина II, влияет на сужение и расширение сосудов, регулируя кровяное давление [25]. Шиповидный белок (S) вируса, состоящий из субъединиц S1 и S2, облегчает проникновение вируса в организм. Рецептор-связывающий домен (RBD)

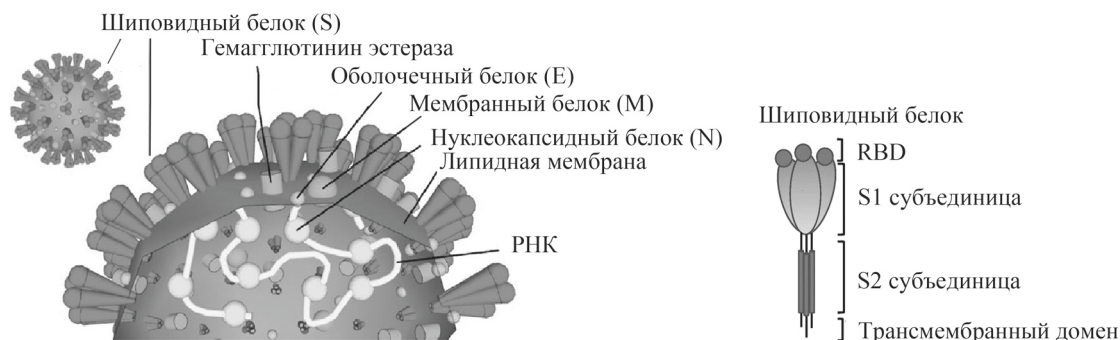
субъединицы S1 отвечает за прикрепление вируса к мембране клетки-мишени через ACE2, в то время как домен S2 обеспечивает слияние оболочки вируса с клеткой-хозяином [52]. Затем вирусный геном проникает в цитозоль клетки-хозяина, и инфекция в конечном итоге распространяется на другие клетки.

Белок M играет роль в морфогенезе и почковании вируса благодаря своему гликозилированному N-концевому домену, трем трансмембранным доменам и длинному С-концевому домену.

Белок E является наименьшим структурным белком, который обеспечивает сборку, высвобождение и патогенез вируса.

Белок N (примерно 40 кДа) играет важную роль в упаковке вирусного генома и образует комплекс с геномной РНК. Исследования белка N модельных коронавирусов продемонстрировали, что белок подвергается самоассоциации, взаимодействует с другими белками и с РНК. Определенная фракция N-белка, как ожидалось, была внутренне неупорядоченной, что создает сложности для структурной характеристики белка [53, 54].

Сообщалось об исследованиях по картированию белков SARS-CoV-2 и их взаимодействию с антителами с помощью протеомного микрочипа. Авторы [55] продемонстрировали реакцию антител против всех четырех белков SARS-CoV-2: S1, RBD, S2 и N с зараженными образцами сыворотки и обнаружили чувствительность 98,1%. В работе [56] выявлены специфические антитела к M, N и S белкам вируса. Более чем у 80% пациентов с COVID-19 были обнаружены антитела против четырех иммунодоминантных эпитопов N, S и Orf3a (вспомогательный белок). Интересно, что антител к белку E обнаружено не было. В другом протеомном микрочипе использовали



Строение вируса SARS-CoV-2

29 образцов сыворотки выздоравливающих для демонстрации ответа IgM/IgG против 18 белковых конструкций SARS-CoV-2. Результат показал 100%-й ответ антител в основном против белков N и S1, где S1 оказался лучшим в дифференциации пациентов с COVID-19 от контрольной группы [57].

Среди возможных вирусных белков N- и S-белки являются потенциальными мишенями для обнаружения вирусов на основе антител. Гомология белков S и N между SARS-CoV-2 и SARS-CoV (коронавирус, ассоциированный с SARS) составляет ~76 и 90% соответственно [58], а два белка обладают высокой иммуногенностью и присутствуют в большом количестве при инфекциях. Коммерческие антитела против вирусных белков S1 и S2, N, E, ORF и неструктурных белков (NSP) доступны в нескольких странах. Как и ожидалось, они дорогие – от 5000 до 6000 долларов США за 1 мг белка [59]. Доступны некоторые методы для получения антител или антителоподобных белков против субъединицы S1 шиповидного белка [60].

Аптамеры, короткие молекулы одноцепочечной РНК или одноцепочечной ДНК, способны связывать молекулы-мишени с высокой аффинностью и селективностью. Разработка противовирусных аптамеров представляет собой сложную задачу. В случае целых вирусных частиц мишенью являются в первую очередь мембранные белки. Недавно был разработан метод SELEX (Viro-SELEX), пригодный для получения аптамеров к мембранным белкам [61]. Этот метод предусматривает использование вирусов с оболочкой, таких как бакуловирусная система экспрессии, для включения мембранных белков (например, гемагглютиниона гриппа (HA)) в суррогатную вирусную оболочку, а также для обогащения аптамеров цельных вирусных частиц с помощью SELEX [62]. Были получены два аптамера для SARS-CoV-2, нацеленные на RBD белка S [63]. Константы диссоциации (K_d) CoV2-RBD-1 (51 основание) и CoV2-RBD-4 (67 оснований) составили 5,8 и 19,9 нМ соответственно. Основываясь на ранее отобранных аптамерах к SARS-CoV, авторы [64] разработали аптамер для белка N SARS-CoV-2, который, как было показано, является многообещающим диагностическим маркером ранней стадии в сыворотке [47].

Есть и другие элементы биораспознавания, которые оказались полезными для разработки электрохимических вирусных биосенсоров.

ACE2, который опосредует проникновение SARS-CoV-2 в клетки, можно использовать в целях биосенсорного распознавания.

2.2. Вирусная РНК SARS-CoV-2

Гены-мишени COVID-19, собранные со всего мира, обычно схожи, включая последовательность РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp), последовательность гена нуклеокапсидного белка (N), ген оболочечного белка (E), ген шипа (S) и последовательность открытой рамки считывания 1 ab (ORF1ab) [65, 66]. Выбор мишеней для обнаружения SARS-CoV-2 влияет на специфичность аналитического теста. Например, среди всех β -коронавирусов наиболее консервативным является ген E, а ген N имеет пересечения с другими коронавирусами [67]. Ген S (благодаря значительной дифференцированности его последовательности) также помогает отличить SARS-CoV-2 от других коронавирусов [4]. При различении SARS-CoV-2 и SARS-CoV ген RdRp, расположенный в области ORF1ab, демонстрирует чрезвычайно высокую аналитическую чувствительность [68].

Центры по контролю и профилактике заболеваний (CDC) рекомендует детекцию N-гена [69], в то время как ВОЗ рекомендует скрининг генов E, RdRp, N и S [70]. Многие лаборатории разработали тесты независимо от CDC или ВОЗ. Авторы [71] разработали три новых анализа qRT-PCR, нацеленные на RdRp/He1, S- и N-гены SARS-CoV-2. В [72] описаны два одноступенчатых qRT-PCR-анализа для обнаружения двух разных областей (ORF1b и N) вирусного генома. В работе [28] были выбраны для тестирования две молекулярные мишени (E и RdRp). В работах [71, 73, 74] были выбраны гены N и ORF1ab. В проведенных недавно многочисленных исследованиях не было указаний на то, что какой-либо из этих участков последовательности предлагает значительное преимущество для клинического диагностического тестирования. Оптимальный дизайн будет включать, по крайней мере, одну консервативную область, а также специфическую область, чтобы смягчить последствия генетического дрейфа.

2.3. Вирусные частицы SARS-CoV-2

Целые вирусные частицы могут быть биораспознаны с помощью антител. В настоящее время исследователи сосредоточены на антителах против S-белка вирусной оболочки

SARS-CoV-2. Связываясь с белком S, эти антитела предотвращают взаимодействие вирусных частиц с клеточными рецепторами ACE2, следовательно, они способны нейтрализовать (нейтрализующие антитела, нАТ) инфекцию и могут помочь в разработке вакцины [75]. Такие антитела подходят для разработки биосенсоров цельных вирусных частиц, поскольку они фокусируются на сильно экспонированных частях вирусных антигенов [76]. Несмотря на общую структурную гомологию S-белков SARS-CoV и SARS-CoV-2, авторы [77] сообщили, что ни одно из трех моноклональных антител, связывающих рецептор-связывающий домен S-белка SARS-CoV (RBD), не связывается с S-белком SARS-CoV-2. Хотя коммерчески доступны несколько антител против белка S и других структурных белков SARS-CoV-2 (E, M и N), их специфичность в отношении отдельных серотипов вируса не определена. Проблематичным вопросом является долговременная надежность антител, так как вирусный геном изменяется, что может привести к изменению эпитопа. Приблизительно 15 аминокислот (прерывистые в первичной последовательности белка) эпитопа вступают в пространственный контакт с паратопом антитела [78]. Из этих 15 аминокислот 5 сильно влияют на взаимодействие антитело – антиген, и их точечные мутации могут снижать относительную константу связывания на два или три порядка [79]. Сообщалось о хорошо известном случае точечной мутации белка S (D614G), которая появилась в начале апреля 2020 г. и по состоянию на конец года стала доминирующим вариантом в условиях пандемии: alpha, beta, gamma, delta, omicron варианты [80, 81]. Следовательно, эффективность элементов биораспознавания вирусных биосенсоров необходимо часто переоценивать.

В последние годы наблюдается тенденция имитации иммунологического взаимодействия между антителами и антигенами с помощью стратегий молекулярного импринтинга [82]. Хотя технология изначально была разработана для малых молекул, молекулярный импринтинг распространился на надмолекулярные комплексы, включая вирусы. Успешное запечатление структуры SARS-CoV-2 на полимере было продемонстрировано авторами [83]. Они изготовили антитела «моноклонального типа» (наночастицы с использованием технологии MIP (molecularly imprinted polymer)), специфичные к RBD S-белка SARS-CoV-2, без перекрестной реактивности по отношению к RBD S-белка SARS-CoV. О нали-

чии указанных антител заявила также коммерческая компания «MIP Diagnostics Ltd.» (Бедфорд, Великобритания).

3. Электрохимические сенсоры для детектирования SARS-CoV-2

Ограничения и проблемы, связанные с вышеупомянутыми диагностическими тестами, побуждают исследователей в настоящее время разрабатывать более надежные и точные системы обнаружения для эффективного скрининга пациентов с COVID-19. Надежная система скрининга обеспечивает эффективную изоляцию и быстрое лечение пациента, что впоследствии прерывает цепочку передачи вируса. Для достижения цели разработанный диагностический тест должен обладать следующими характеристиками: доступные технологии зондирования (минимальная стоимость и меньшие требования к персоналу и инструменту), высокая чувствительность (способность распознавать инфицированных людей, истинные положительные результаты), высокая специфичность (способность распознавать неинфицированных людей, истинные отрицательные результаты), отсутствие оборудования (портативное устройство), более быстрое время отклика (в идеале за 1 мин или максимум за 1 ч) и доступность (удобство для пользователя). Эти характеристики известны как критерии ASSURED [30, 84–86]. Поскольку электрохимические биосенсоры отвечают выдвигаемым требованиям, их можно использовать для тестирования.

Несмотря на превосходные диагностические возможности, платформа электрохимических биосенсоров может сталкиваться с рядом проблем: процедура подготовки образцов, стабильность и селективность, которые зависят от используемых молекул биораспознавания. Более того, мешающие компоненты среды могут привести к снижению эффективности работы электрохимических биосенсоров.

Электрохимические биосенсоры на SARS-CoV-2 можно разделить на две категории в зависимости от используемого преобразователя сигнала: на основе электродов и полевых транзисторов. Электроды для биосенсоров в основном получают методом трафаретной печати (screen-printed electrodes), что позволяет регулировать размеры и миниатюризировать считывающие платформы, а также масштабировать производство. Также отмечено, что основным материалом для формирования полевых транзисторов для обнаружения SARS-CoV-2 – графен.

Вероятно, это также обусловлено стоимостью и простотой производства в сочетании с чувствительностью к изменению потенциала вблизи канала транзистора.

При рассмотрении разработанных биосенсоров необходимо учитывать (помимо характеристик и предела обнаружения) возможность их использования вне лаборатории в местах оказания медицинской помощи (РОС, РОСТ), а также стоимость одного анализа, т.е. биосенсор должен быть простым в использовании и недорогим. Например, биосенсоры, содержащие антитела, а также магнитные и золотые наночастицы, слишком дороги и не могут быть использованы в масштабах производства.

3.1. Электродные биосенсоры

3.1.1. Определение генетического материала SARS-CoV-2

В этой главе рассматриваются биосенсоры для определения вирусных нуклеиновых кислот. Все рассмотренные биосенсоры представлены в таблице.

В недавнем исследовании сообщалось, что вирусная нагрузка SARS-CoV-2 в клинических образцах с помощью qRT-PCR колебалась от 641 до $1,34 \times 10^{11}$ копий/мл со средним значением $7,99 \times 10^4$ копий/мл в образцах из зева, $7,52 \times 10^5$ копий/мл в образцах из мокроты и $1,69 \times 10^5$ копий/мл для образцов из носа, взятых на третий день после появления симптомов. Средняя вирусная нагрузка после раннего начала заболевания составляла $>1 \times 10^6$ копий/мл. В случаях смерти вирусная нагрузка в образцах мокроты, собранных на восьмой день после появления симптомов, составляла $1,34 \times 10^{11}$ копий/мл [87].

Как правило, в сенсорах ДНК/РНК на основе твердотельной электрохимии используется рабочий электрод, модифицированный захватывающим зондом, а комплементарный нуклеотид-мишень гибридизуется с зондом на чувствительной поверхности. Затем с помощью электрохимического метода осуществляют детектирование гибридизации. Событие связывания можно исследовать прямо или косвенно в присутствии электроактивного соединения, такого как металлокомплекс ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ и $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$) или органическая молекула (метиленовый синий и т.д.). Миниатюрная электрохимическая платформа может быть сопряжена с рабочей станцией или смартфоном.

Один из существенных недостатков для потенциального быстрого определения заключается в требовании выделения ДНК. Неспецифическое связывание с белками и нуклеиновыми кислотами матрицы может создавать проблемы для детектирования несмотря на то, что поверхность электрода тщательно блокируется и пассивируется органическими молекулами. В большинстве этих исследований в качестве аналитов использовали синтетические олигонуклеотиды, которые часто лишь немного длиннее соответствующих зондов. Такие биосенсоры подходят для детекции продуктов ПЦР, где количество ампликонов относительно велико, а единственными интерферентами являются полимеразы, праймеры и нуклеозидтрифосфаты. Поэтому важно проверять работу биосенсоров на реальных образцах в сложной по составу матрице. Кроме того, как отмечалось выше, важно обнаруживать несколько последовательностей в силу возможных мутаций вируса.

Наиболее перспективными из предложенных биосенсоров являются сенсоры, описанные в работе [88].

Авторы [89] разработали бумажный электрохимический биосенсор для обнаружения генетического материала SARS-CoV-2. Биосенсор состоял из золотых микроэлектродов и модифицированных одноцепочечной ДНК наночастиц золота (AuNPs). Золотые микроэлектроды формировались путем электронно-лучевого испарения на поверхности фильтровальной бумаги, на которой до этого были распределены графеновые нанопластинки (GNPs). AuNPs были покрыты высокоспецифичными антисмысловыми олигонуклеотидами (одноцепочечными ДНК), нацеленными на вирусный ген N-белка. Четыре таких одноцепочечных ДНК были разработаны для одновременной гибридизации с двумя отдельными областями одного и того же гена N. Модифицированные AuNPs наносились поверх золотого электрода. Выходным сигналом служило изменение напряжения в системе. Реакция сенсора была проверена на образцах РНК, полученных из клеток Vero (эпителиальные клетки почек), инфицированных SARS-CoV-2, в то время как РНК SARS-CoV-1 и MERS-CoV использовали в качестве одного из отрицательных контролей. Способность сенсора отличать положительные образцы COVID-19 от отрицательных была исследована на 48 клинических образцах мазков из носоглотки. Сенсор

Сравнительные характеристики электрохимических биосенсоров на SARS-CoV-2

Описание электрохимической платформы	Распознающий компонент	Метод	Биомаркер	Метрики	Среда определения	Ссылка
Бумага – GNPs – Au-электроды – AuNPs – оцДНК	четыре оцДНК	измерение выходного потенциала	ген N-белка	(1) линейный диапазон $585,4-585,4 \times 105$ копий/мкл (2) LOD $6,9$ копий/мкл	(1) экстракт РНК из клеток Vero; (2) мазки из носоглотки	[89]
Стекланный электрод – полианилиновые нанопроволоки – Y пептиды – оцДНК	оцДНК	дифференциальная импульсная вольтамперометрия	ген N-белка	(1) линейный диапазон $10^{-14}-10^{-9}$ М (2) LOD $3,5 \times 10^{-15}$ М	(1) буфер; (2) обогащенная разбавленная сыворотка крови человека	[90]
Нанесение на SPCE смеси из магнитных частиц с захватывающим зондом MNB-CP, мишени в виде ампликона RCA и наночастиц кремния с зондом-репортером SiMB-RP-N/SiAO-RP-S; RCA на первой стадии анализа	оцДНК	дифференциальная импульсная вольтамперометрия	ген N-белка; ген S-белка	(1) линейный диапазон 1×10^9 копий/мкл (2) LOD 1 копий/мкл	(1) буфер; (2) мазки из носоглотки	[91]
Золотой электрод – ДНК-тетразлр	оцДНК	электрохемилюминесценция	ген RdRp	(1) линейный диапазон $10^{-15}-10^{-10}$ М LOD $2,67 \times 10^{-15}$ М	(1) буфер; (2) обогащенная разбавленная сыворотка крови человека	[92]
Двумерные золотые наноострова – оцДНК	оцДНК	плазмонный резонанс с плазмонным фототермическим эффектом	ген RdRp; ген ORF1ab; ген E	диапазон концентраций олигов $10^{-13}-10^{-6}$ М LOD RdRp $0,22 \times 10^{-12}$ М	вода	[88]

Продолжение таблицы

Описание электрохимической платформы	Распознающий компонент	Метод	Биомаркер	Метрики	Среда определения	Ссылка
Золотой электрод – ДНК шпилька; реакция с участием дезоксирибонуклеотидилтрансферазы для усиления	оцДНК	дифференциальная импульсная вольтамперометрия	ген ORF1ab	(1) линейный диапазон 10^{-13} – 10^{-9} М LOD 26×10^{-15} М	(1) буфер; (2) обогащенная слона и сыворотка крови; (3) клинические образцы ротоглотки	[93]
Нанесение SPCE смеси из частиц с захватывающим зондом AuFe ₃ O ₄ -CP, мишени, частиц с зондом-репортером AuSCX8-RGO-TB-LP-AP	оцДНК	дифференциальная импульсная вольтамперометрия; совмещение со смартфоном	ген ORF1ab	(1) линейный диапазон 10–17–10–12 М LOD 3 аМ (ДНК) (2) LOD 200 копий/мл (РНК)	(1) буфер; (2) мазок из горла	[94]
SPCE-GO-8H-EDC-NHS-AuNS	многофункциональные группы	безметочная дифференциальная импульсная вольтамперометрия	инактивированный SARS-CoV-2	(1) чувствительность 0,0048 мкА×мкг/мл/см ² LOD $1,68 \times 10^{-22}$ мкг/мл	(1) буфер; (2) кровь, слона, мазок из ротоглотки	[95]
Si/SiO ₂ /Ti/Au – IgG – оцДНК	SARS-CoV-1 IgG	хроноамперометрия	псевдовирс; субъединица S1; вирусная частица SARS-CoV-2	(1) псевдовирс LOD 4000 копий/мл (1) S-белок LOD 1 пг/мл	(1) буфер; (2) образцы слоны	[96]
Нанесение на SPCE смеси из частиц MBs-ACE2, мишени и ACE2-AuNPs	ACE2	дифференциальная импульсная вольтамперометрия	S-белок	LOD 0,35 ат/мл	слона	[99]
Двумерные золотые наноострова – оцДНК	оцДНК	плазмонный резонанс с плазмонным фототермическим эффектом	ген RdRp; ген ORF1ab; ген E	диапазон концентраций олигов 10^{-13} – 10^{-6} М LOD RdRp $0,22 \times 10^{-12}$ М	вода	[88]

Продолжение таблицы

Описание электрохимической платформы	Распознающий компонент	Метод	Биомаркер	Метрики	Среда определения	Ссылка
Электрод из золотой проволоки – аптамер	аптамер к RBD (IC)	квадратноволновая вольтамперометрия	RDB; S-белок	(1) динамический диапазон 760 пг/мл – 76 нг/мл (2) динамический диапазон 8×10^{-11} – 5×10^{-9} М (3) динамический диапазон 10^{-11} – 8×10^{-10} М	(1) буфер; (2) эмбриональная бычья сыворотка; (3) 50%-я искусственная слюна	[97]
Электрод Au – TFME-APBA; молекулярный импринтинг	MIP	квадратноволновая вольтамперометрия; совмещение со смартфоном	S1-субъединица	(1) LOD 15 фМ (2) LOD 64 фМ	(1) буфер; (2) клинические образцы носоглотки	[100]
ePAD: бумажная основа с воском – GO-S1 IgM; напечатанные электроды на обратной стороне	S1 IgM	квадратноволновая вольтамперометрия	RBD	линейный динамический диапазон 1–1000 нг/мл LOD 0,11 нг/мл	буфер	[98]
FTO – AuNPs – nCovid-19Ab; eCo VSens: SPCE – AuNPs – nCovid-19Ab	nCovid-19Ab	циклическая вольтамперометрия для FTO-AuNPs; портативное устройство для eCo VSens	S1-субъединица	(1) для обеих систем тестированный диапазон 1 фМ – 1 мкМ LOD 10 фМ (2) для eCovSens LOD 90 фМ, для FTO-AuNPs LOD 120 фМ	(1) буфер; (2) обогащенная слюна	[101]
Нанесение на золотые печатные электроды клеток	клетки Veto с включенными антителами к S1-субъединице	потенциометрия клеточных мембран; портативное устройство со смартфоном	S1-субъединица	полулинейный диапазон 10 фг – 1 мкг/мл LOD 1 фг/мл	буфер	[102]

Продолжение таблицы

Описание электрохимической платформы	Распознающий компонент	Метод	Биомаркер	Метрики	Среда определения	Ссылка
Двумерные золотые наноструктуры – оцДНК	оцДНК	плазмонный резонанс с плазмонным фототермическим эффектом	ген RdRp; ген ORF1ab; ген E	диапазон концентраций олигов $10^{-13} - 10^{-6}$ М LOD RdRp $0,22 \times 10^{-12}$ М	вода	[88]
ПЭТФ – Pd – ACE2	ACE2	электрохимическая спектроскопия импеданса	псевдовирус nCoV-S-Luc; RBD	для RBD EC50 1,74 мкМ	буфер	[103]
Нанотрубки TiO ₂ /Co	–	амперометрия	RBD	линейный диапазон 14–1400 нМ LOD ~0,7 нМ	буфер	[104]
Графеновый SPE – анти-тело	антитело к S-белку	квадратновольтная вольтамперометрия	S1-субъединица; рекомбинантный SARS-CoV-2	S1-субъединица LOD 260 нМ рекомбинантный SARS-CoV-2 LOD $5,5 \times 10^5$ БОЕ/мл	буфер	[105]
RAPID 1.0: углеродный электрод – ACE2 – Nafion	ACE2	электрохимическая импедансная спектроскопия	S-белок; инактивированный SARS-CoV-2	(1) S-белок диапазон 100 фг/мл – 100 нг/мл (1) S белка LOD 1,39 пг/мл (1) SARS-CoV-2 LOD 1,16 БОЕ/мл (2) S-белок диапазон 10 фг/мл – 100 нг/мл (2) S-белка LOD 2,18 фг/мл	(1) слюна; (2) буфер; (3) мазки из носоглотки/ ротоглотки	[106]

Продолжение таблицы

Описание электрохимической платформы	Распознающий компонент	Метод	Биомаркер	Метрики	Среда определения	Ссылка
LEAD: графитовый электрод – AuNPs-ACE2	ACE2	квадрантоволновая вольтамперометрия	S-белок; инактивированный SARS-CoV-2	S-белок, линейный диапазон $1 \times 10^{-13} - 1 \times 10^{-9}$ г/мл, S-белок LOD 229 фг/мл, инактивированный SARS-CoV-2 диапазон $10^2 - 10^6$ БОЕ/мл, инактивированный SARS-CoV-2 LOD 2,07 БОЕ/мл	(1) буфер; (2) слюна и мазки из носоглотки/ротоглотки	[107]
Стекланный электрод – rGO-антитело	антитело к S1-субъединице	электрохимическая импедансная спектроскопия	RBD	(1) линейный диапазон 0,16–40 мкг/мл (1) LOD 150 нг/мл	(1) буфер; (2) обогащенная разбавленная слюна	[108]
SPCE-AuNPs-аптамер	аптамер к RBD	электрохимическая импедансная спектроскопия	S-белок; псевдовирус	S-белок LOD 66 пг/мл	буфер	[109]
Угльные SPE-MBs-антитело/мишень – вторичное антитело с фосфатазой	антитело к S1-субъединице антитело к N-белку	дифференциальная импульсная вольтамперометрия	S-белок; N белок; SARS-CoV-2	(2) S-белок LOD 19 нг/мл (2) N белок LOD 8 нг/мл (1) SARS-CoV-2 6,5 БОЕ/мл (для S1 антител) (1) SARS-CoV-2 $6,5 \times 10^3$ БОЕ/мл (для N антител)	(1) буфер; (2) обогащенная слюна; (3) клинические образцы слюны	[110]
SPCE-CNF-N белок конкурентное определение	антитело к N-белку	квадрантоволновая вольтамперометрия	N-белок	(1) диапазон 0,1 пг/мл–1 мкг/мл (1) N-белок LOD 0,8 пг/мл (2) диапазон 1 пг/мл–100 нг/мл	(1) буфер; (2) обогащенные носовые пробы; (3) клинические образцы	[111]

Продолжение таблицы

Описание электрохимической платформы	Распознающий компонент	Метод	Биомаркер	Метрики	Среда определения	Ссылка
SPCE – покрытие bZnO/rGO – антитело	антитело к N-белку	электрохимическая импедансная спектроскопия	N-белок	(1) линейный диапазон 1–10000 пг/мл; (1) LOD 21 фг/мл	(1) обогащенные образцы; (2) клинические образцы	[112]
Au – TFE – покрытие пленкой – N-белок – поли-м-фенилендиамин	MIP	дифференциальная импульсная вольтамперометрия; портовый потенциал	N-белок	(1) линейный диапазон 2,22–111 фМ (1) LOD 15 фМ	(1) буфер; (2) мазки из носоглотки	[113]
GFET – бифункциональный нанокраска – конкаваллин А – антитело	антитела к S-белку	GFET	S-белок	динамический диапазон 0,1–100 нМ LOD 0,74 нМ	(1) буфер; (2) мазки из носоглотки	[121]
GFET – антитело	антитела к S-белку	GFET	S-белок; инактивированный SARS-CoV-2	(1) S белок LOD 1 фг/мл; (2) S белок LOD 100 фг/мл; (3) SARS-CoV-2 диапазон $1,6 \times 10^1$ – $1,6 \times 10^4$; (3) SARS-CoV-2 LOD $1,6 \times 10^1$ БОЕ/мл; (4) SARS-CoV-2 LOD $2,42 \times 10^2$ копий/мл	(1) буфер; (2) клиническая транспортная среда; (3) культуральная среда; (4) клинические образцы	[76]
WSe2 – FET – антитело	антитела к S-белку	WSe2 FET	S белок	S белок LOD 25 фг/мкл	буфер	[120]
CNT – FET – антитело	антитела на S1-субъединицу	CNT – FET	S1-субъединица	(1) диапазон 0,1–5000 фг/мл; (1) LOD 4,12 фг/мл; (2) диапазон 0,1–5000 фг/мл	(1) буфер; (2) обогащенная слона	[119]

Окончание таблицы

Описание электрохимической платформы	Распознающий компонент	Метод	Биомаркер	Метрики	Среда определения	Ссылка
LIG – GFET – антитела	антитела к S-белку	GFET	S-белок	(1) диапазон 1 пг/мл – 1 мкг/мл; (1) LOD 1 пг/мл; (2) 1 нг/мл	(1) буфер; (2) сыворотка крови человека	[118]
GFET – AuNPs – PMO	фосфордиамидат – морфолиноолигонуклеотид (PMO)	GFET	ген RdRp	(1) LOD 0,37 фМ; (2) LOD 2,29 фМ; (3) LOD 3,99 фМ	(1) буфер;; (2) мазок из ротоглотки; (3) сыворотка крови человека	[117]
Крошенный GFET – антитела	антитела к S-белку; антитела к N-белку	GFET	S-белок; N-белок	диапазон S белок 1 аМ – 100 нМ; диапазон N белок 10 аМ – 10 нМ	буфер	[124]
EDL – gated BioFET – оцДНК	оцДНК	BioFET	кДНК; N-ген	диапазон N-белок 1 фМ – 1 пМ	разбавленная слона	[116]
EDL – gated BioFET – антитела	антитела к N-белку	BioFET	N-белок	диапазон 0,4 нг/мл – 400 нг/мл (1) LOD 0,34 нг/мл (7,44 пМ) (2) LOD 0,14 нг/мл (2,96 пМ)	(1) буфер; (2) искусственная слона	[122]
GFET – оцДНК	оцДНК	GFET	ген RdRp	диапазон 0,1 фг/мл – 1000 фг/мл LOD ~0,1 фг/мл	буфер	[115]
CNT – FET – оцДНК	оцДНК	CNT-FET	ген RdRp	диапазон 10 фМ – 100 пМ LOD 10 фМ	буфер	[114]
DGDMFET	–	–	S-белок ДНК	расчетная работа	–	[125]
SiNW – FET	антитело к S-белку	–	S-белок	расчетная работа	–	[126]
Pt – GFET	–	–	этилбутират	расчетная работа	–	[127]

обеспечивает быстрое определение РНК SARS-CoV-2 менее чем за 5 мин в линейном диапазоне от $585,4$ до $585,4 \times 10^5$ копий/мкл с пределом обнаружения $6,9$ копий/мкл. Возможность использования сенсора после геномной мутации вируса также обеспечивается за счет одноцепочечных ДНК, которые одновременно нацелены на две отдельные области одного и того же N-гена SARS-CoV-2.

Авторы [90] изготовили электрохимически полимеризованные полианилиновые нанопроволоки на стеклоуглеродном электроде в целях иммобилизации специфического зонда для захвата участка N-гена в качестве элемента потенциального обнаружения SARS-CoV-2. Электрод с нанопроволоками модифицировался разработанными Y-пептидами, которые имеют противообращающие свойства. Две анкерные ветви пептида присоединялись к нанопроволокам, что обеспечивало надежность присоединения, свободная часть пептида на конце содержала биотин. После этого использовали стрептавидин (тетрамерный белок) в качестве линкера между поверхностью с биотином и зондом (комплементарная одноцепочечная ДНК) для захвата части N-гена (РНК), который также содержал биотин. Электрохимические характеристики биосенсора регистрировали методами дифференциальной импульсной вольтамперометрии и циклической вольтамперометрии в трехэлектродной системе. Биосенсор продемонстрировал широкий линейный диапазон в полулוגарифмических координатах (10^{-14} – 10^{-9} М) и низкий предел обнаружения ($3,5$ фМ) вирусной РНК. Биосенсор показал хорошую сходимость ($98,03$ – $101,63\%$) в образцах разбавленной сыворотки крови человека с добавлением последовательностей РНК-мишени.

Предложен электрохимический биосенсор на основе мультиплексного RCA (rolling circle amplification) для быстрого обнаружения генов N и S SARS-CoV-2 в клинических образцах [91]. На первом этапе проводили мультиплексный RCA для одновременной амплификации двух генов (N и S). Для этого были разработаны кольцевая ДНК, праймеры и последовательности зондов. Дальнейшее одностадийное обнаружение ампликонов RCA включало их гибридизацию с захватывающим зондом, конъюгированным с магнитными частицами (CP-MNB), и гибридизацию мишень – CP-MNB с зондом-репортером, связанным с диоксидом кремния (Si-RP). Два окислительно-восстановительных красителя (метиленовый

синий (MB) для N-гена и акридиновый оранжевый (АО) для S-гена) были нанесены на наночастицы кремния (SiNP) через поверхностно-реактивные функциональные группы. Была также проведена их послойная модификация двумя полиэлектролитами: положительно заряженным поли(аллиламин)гидро-хлоридом (PAA) и отрицательно заряженным поли(натрий-4-стирол)сульфонатом (PSS). Поглощенный PSS оставлял чистый отрицательный заряд на поверхности SiNP, что облегчало связывание с авидиновым линкером, через который с наночастицами связывался зонд-репортер (RP). Для электрохимических измерений использовали двухэлектродную систему на основе угольных электродов, полученных трафаретной печатью («Quasense», Таиланд). На поверхность электродов пипетировали инкубированный раствор, содержащий мишень, магнитные и кремниевые наночастицы. Измерение проводили с помощью дифференциальной импульсной вольтамперометрии. Предел обнаружения генов N и S составлял 1 копия/мкл с линейным диапазоном от 1 до 1×10^9 копий/мкл. Длительность анализа <2 ч. Образцы РНК и комплементарной ДНК, полученные из носоглоточных мазков, использовали в качестве матрицы в RCA с использованием метода одностадийной гибридизации и электрохимического детектирования для оценки эффективности разработанного сенсора, которая, как было установлено, согласуется с результатами qRT-PCR.

Авторы [92] предложили управляемый энтропией метод усиленной электрохемилюминесценции для обнаружения гена РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) SARS-CoV-2. Для конструирования сенсора поверхность золотого электрода модифицируют тетраэдрической конструкцией из ДНК, чтобы получить прочные и программируемые материалы каркасов, на которых проводится запускаемая энтропией реакция с участием ДНК-мишени. Это активирует связывание дополнительной последовательности с электроактивной меткой $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ в вершине ДНК-тетраэдра и в конечном итоге запускает электрохемилюминесценцию. Жесткая тетраэдрическая структура зонда повышает интенсивность сигнала и позволяет избежать перекрестной реактивности между одноцепочечными ДНК, тем самым повышая чувствительность сенсора. Измерение проводили в трехэлектродной системе, содержащей золотой рабочий электрод, электрод сравнения Ag/AgCl и платиновый вспомогательный электрод.

трод. Линейный диапазон действия сенсора 10^{-15} – 10^{-10} М, а предел обнаружения сенсора составил 2,67 фМ ДНК-мишени (аналог РНК гена RdRp). ДНК-мишень в разной концентрации (10 фМ, 100 фМ и 1 пМ) добавляли в сыворотку человека (15 и 10%), чтобы имитировать процесс анализа в реальном образце. Извлечение всех образцов составляло от 98,21 до 102,3%.

Исследование, предложенное в работе [88], отличалось тем, что для диагностики SARS-CoV-2 использовали двухфункциональный плазмонный биосенсор, сочетающий плазмонный фототермический эффект (PPT) и локализованный поверхностный плазмонный резонанс (LSPR). Рецепторные ДНК, прикрепленные к двумерным золотым наностровам (AuNI), могут распознавать специфические последовательности РНК SARS-CoV-2. Термическую плазмонную энергию использовали для нагрева чипа AuNI для улучшения характеристик распознавания, что затрудняло гибридизацию несогласованных последовательностей, тем самым уменьшая число ложных срабатываний. Биосенсоры смогли специфически различать последовательности SARS-CoV и SARS-CoV-2 с усилением PPT *in situ*. В режиме реального времени и без использования меток биосенсор определял гены RdRp, ORF1ab и E из SARS-CoV-2. Для обнаружения олигонуклеотидов сенсорная система работала в диапазоне концентраций от 0,1 пМ до 1 мкМ. Нижний предел обнаружения гена RdRp составил 0,22 пМ в воде, что позволило специфически обнаружить мишень в мультигенной смеси. Расчетный предел обнаружения целых цепей РНК SARS-CoV-2 может составлять примерно $2,26 \times 10^4$ копий.

Авторы [93] предложили электрохимический сенсор для мониторинга РНК SARS-CoV-2, в котором объединялись возможности усиления сигнала за счет каталитической сборки шпилек и терминальной полимеразной реакции с участием дезоксирибонуклеотидилтрансферазы. В работе определяли фрагмент ORF1ab длиной 26 нп. В типичной реакции каталитической сборки шпилек две комплементарные цепи ДНК предварительно сконструированы так, чтобы быть запертыми в две метастабильные структуры шпилек, которые не могут взаимодействовать друг с другом. Добавление каталитической одноцепочечной ДНК или РНК-мишени может привести к тому, что две шпильки будут открываться одна за другой. В дизайне исследователей в результате такой реакции происходило

образование дцДНК с повторной регенерацией мишени; дцДНК гибридизовалась со шпилечной ДНК, иммобилизованной на поверхности золотого электрода. В результате этого формировалась Y-образная ДНК-структура с тремя выступающими 3'-концами, которая может быть удлинена ферментом дезоксирибонуклеотидилтрансферазой с образованием длинных одноцепочечных продуктов ДНК. Эти отрицательно заряженные ДНК могут взаимодействовать с массивными положительно заряженными электроактивными молекулами $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ за счет электростатической адсорбции. Измерение сенсора проводили дифференциальной импульсной вольтамперометрией в трехэлектродной ячейке. Предел обнаружения фрагмента РНК составил 26 фМ в линейном диапазоне 0,1–1000 пМ в буфере. Различающую способность биосенсора анализировали в сложных матрицах (сыворотке и слюне) при добавлении в них мишени, а также на клинических образцах (ротоглоточные мазки) пациентов.

Авторами [94] разработан электрохимический биосенсор суперсэндвичевого типа на основе восстановленного графена, модифицированного *n*-сульфокаликс[8]-ареном (SCX8-RGO). В качестве мишеней использовали синтезированные одноцепочечные ДНК, заменяющие РНК-фрагменты ORF1ab, и РНК, экстрагированные из клинических образцов. Измерение сенсора проводили дифференциальной импульсной вольтамперометрией в трехэлектродной ячейке с углеродными электродами, полученными трафаретной печатью. Биосенсор был совмещен со смартфоном. Премикс А состоял из нанокомпозитных частиц AuFe_3O_4 , покрытых ДНК-зондом СР. Премикс В состоял из нанокомпозитов $\text{AuSCX8-RGO-TB-LP-AP}$, где TB – толуидиновый синий, LP и AP – ДНК-зонды. Для подготовки суперсэндвича использовали премиксы А и В. А смешивали с мишенью, частицы отделялись и добавлялся премикс В, затем частицы снова отделялись и в добавленном буфере пипетировались на электроды. Линейная зависимость между током и логарифмом концентрации синтезированных одноцепочечных ДНК была в диапазоне от 10^{-17} до 10^{-12} М с пределом обнаружения 3 М в буфере. Биосенсор тестировали на обнаружение РНК в клинических образцах, которые включали мокроту, мазки из зева, образцы мочи, образцы плазмы, образцы кала, мазки из полости рта, образцы сыворотки, образцы цельной крови и образец слюны. Пре-

дел обнаружения РНК в мазке из горла составил 200 копий/мл.

3.1.2. Определение вирусных частиц SARS-CoV-2

Определение вирусных частиц SARS-CoV-2 можно осуществлять за счет различных функциональных групп сенсора [95] и антител к шиповидному белку [96].

Предложен вольтамперометрический сенсор для обнаружения различных вирусных частиц на основе дифференцируемых отпечатков их гликопротеинов [95]. Сенсор состоит из напечатанных методом трафаретной печати углеродных электродов. Активация рабочего электрода происходит путем покрытия его слоем оксида графена (GO), модифицированного 8-гидроксифинолином, композитами 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида и N-гидроксисукцинимидом с золотыми нанозвездами (GO-8H-EDC-NHS-Au NS), которые обладают высокой адсорбционной способностью благодаря наличию различных функциональных групп. Такая модификация позволяет обнаруживать следы вирусов в любых водных биологических средах (например, в крови, слюне и мазках из ротоглотки/носоглотки) за счет взаимодействия с активными функциональными группами их гликопротеинов (S-белок для SARS-CoV-2, получены отпечатки субъединиц S1 и S2). Метод не требует какой-либо экстракции и/или биомаркеров для обнаружения вирусов-мишеней. Безметочная дифференциальная импульсная вольтамперометрия обеспечила сигналы при разных потенциалах для вируса инфекционного бронхита, птичьего гриппа, вируса болезни Ньюкасла и SARS-CoV-2 в необработанной крови и слюне примерно за 1 мин. В этом исследовании значения потенциалов пиков служат для идентификации вируса, а значения пиковой интенсивности используют для количественного определения вируса. Предел обнаружения (LOD) и чувствительность в отношении обнаружения SARS-CoV-2 в буфере составили $1,68 \times 10^{-22}$ мкг/мл и 0,0048 мкА×мкг/мл/см² соответственно. Слепые клинические оценки 100 предполагаемых образцов дополнительно подтвердили чувствительность/специфичность разработанной наносистемы в отношении быстрой идентификации больных людей даже в инкубационном и продромальном периодах болезни. При сравнении полученных результатов с результатами ПЦР в

реальном времени авторы заявили о наличии 5% промахов за 1 мин анализа в случае SARS-CoV-2.

Недавно авторы [96] разработали электрохимический сенсор без добавления дополнительных реагентов, преимущество которого заключается в непосредственном считывании присутствия вирусных частиц в течение 5 мин с использованием модифицированных электродов. Сенсор состоит из электрода (Au на подложке Si/SiO₂/Ti) и антител, специфичных к шиповидному белку и связанных с двухцепочечной ДНК, которая включает окислительно-восстановительный зонд – ферроцен. В результате приложения положительного потенциала к электроду отрицательно заряженный комплекс электростатически притягивается к поверхности. При контакте ферроценовой метки с электродом происходит окисление ферроцена с характерной временной константой. Модуляция кинетики транспорта антител с дцДНК отдельно и в случае связывания вирусных компонентов (белка S1 и SARS-CoV-2) позволяет установить присутствие вируса за несколько минут на основании изменения кинетики за счет гидродинамического сопротивления. Разработанный сенсор измеряли хроноамперометрически. Было показано обнаружение вируса SARS-CoV-2 и шиповидного белка в исследуемых образцах и в необработанной слюне пациентов. Значительные изменения тока можно было наблюдать в течение 10 мин инкубации, когда использовалось всего 4000 копий/мл вирусных частиц. Сенсор был способен различать связывание S-белка вплоть до 1 пг/мл. Специфичность сенсора была протестирована за счет введения нецелевых белков нескольких вирусов, включая сезонные коронавирусы человека, лихорадку Эбола, MERS, краснуху и SARS-CoV-1 в дополнение к SARS-CoV-2. Разработчики использовали для конструкции сенсора антитело CR3022, которое представляет собой IgG против SARS-CoV-1 и распознает RBD-область шиповидного белка на SARS-CoV-2. Было отмечено, что все вирусные белки, кроме SARS-CoV-1, проявляли небольшую перекрестную реактивность с сенсором. Шиповидные белки SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 демонстрируют значительную гомологию, поэтому неудивительно, что в этом случае наблюдалась перекрестная реактивность. В настоящее время у людей вирус SARS-CoV-1 исчез. Таким образом, эта пере-

крестная реактивность может быть допустима в клинических испытаниях.

3.1.3. Определение вирусных белков SARS-CoV-2

3.1.3.1. Шиповидный белок SARS-CoV-2

Шиповидный белок играет важную роль в проникновении, слиянии и прикреплении вируса, выступая в качестве мишени для выращивания вакцин, антител и ингибиторов проникновения. Основными мишенями для биосенсоров являются S-белок, его субъединица S1 и фрагмент субъединицы S1 – рецептор-связывающий домен (RBD), который отвечает в основном за связывание вируса с рецептором. Биораспознающими компонентами являлись антитела и ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2).

В электрохимическом иммуносенсоре специфические антитела можно иммобилизовать на поверхности рабочего электрода с помощью нескольких методов, таких как прямая адсорбция, магнитные частицы (MB) или самособирающийся монослой (SAM). При связывании с аналитами происходит генерация электрических сигналов, которые можно измерить с помощью различных методов преобразования.

Наиболее перспективными сенсорами с точки зрения массового использования вне лаборатории (в местах медицинской помощи) являются биосенсоры, описанные в работах [97, 98]. В работе [97] сенсор построен на основе золотого электрода и аптамера к RBD. В работе [98] используется фильтровальная бумага как основа для печати графеновых электродов с последующим присоединением к ним антител к субъединице S1.

Авторы [99] сообщили о сверхчувствительном одноразовом электрохимическом сенсоре на основе электродов, магнитных частиц и наночастиц золота. Этот анализ позволяет обнаружить и количественно определить шиповидный белок SARS-CoV-2 в слюне. Для определения используются конъюгаты ACE2 с магнитными частицами (MB) и наночастицами золота (AuNP). К образцу добавляется одновременно MBs-ACE2 и ACE2-AuNPs. Образовавшийся биоконъюгат MBs-ACE2/S-белок/ACE2-AuNPs отделяется с помощью магнита и наносится на поверхность рабочего электрода, на котором позиционируется также с помощью магнита. Восемь углеродных электродов, полученных трафаретной печатью, позволили проводить одновременный анализ восьми образцов.

В качестве метода измерения применяли дифференциальную импульсную вольтамперометрию, где для сигнала использовались свойства наночастиц золота. Предел обнаружения шиповидного белка SARS-CoV-2 в слюне составил 0,35 аг/мл. Сенсор был протестирован на образцах слюны здоровых людей и людей, инфицированных SARS-CoV-2. Он показал 100%-ю чувствительность и специфичность 93,7% для шиповидного белка SARS-CoV-2.

Другой сенсор для обнаружения шиповидного белка в сыворотке и слюне был разработан с использованием квадратноволновой вольтамперометрии в работе [97]. В качестве биораспознающего компонента сенсора выступал аптамер (1C) на рецептор-связывающий домен S-белка. Аптамер был иммобилизован на поверхности золотого электрода и модифицирован окислительно-восстановительной меткой Atto MB2. В результате взаимодействия аптамера с мишенью происходили конформационные изменения первого, что приводило к изменению скорости обмена электронами между меткой и электродом. Электрохимические измерения проводили в трехэлектродной ячейке, содержащей платиновый вспомогательный электрод и электрод сравнения Ag/AgCl. Биосенсор использовали для оценки эффективных констант связывания аптамера с RBD и S-белком. Динамический диапазон концентраций, измеренных сенсором в буфере, составлял 760 пг/мл – 76 нг/мл. Исследования селективности показали, что в диапазоне протестированных концентраций (от 10 пМ до 100 нМ) на частоте 300 Гц не происходит заметного изменения сигнала ни для одного из трех белков: RBD из SARS-CoV-1, RBD из MERS-CoV и белок NGAL (в сравнении с S-белком из SARS-CoV-2). Детектирование RBD и S-белка в концентрации 10 нМ происходило с высокой специфичностью в течение 15 с. Опробирована работа сенсора в эмбриональной бычьей сыворотке (динамический диапазон 8×10^{-11} – 5×10^{-9} М) и в 50%-й искусственной слюне (динамический диапазон 10^{-11} – 8×10^{-10} М).

Сообщалось о получении электрохимического биосенсора на основе полимера с молекулярным отпечатком для обнаружения субъединицы S1 шиповидного белка [100]. Полимер наносился непосредственно на поверхность электрода Au-TFME. Заметная селективность достигалась за счет применения подхода ковалентного импринтинга, включающего химическое взаимодействие между диольными фрагментами

высокогликозилированного белка S1 и группами борной кислоты APBA в качестве функционального мономера. Сенсор измеряли с помощью квадратноволновой вольтамперометрии в присутствии окислительно-восстановительного соединения $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Сенсор демонстрирует удовлетворительную производительность со временем реакции 15 мин и способен обнаруживать S1 как в фосфатно-солевом буфере, так и в образцах из носоглотки пациента с пределом обнаружения 15 и 64 фМ соответственно. Этот разработанный датчик был подключен к портативному потенциостату и смартфону, оценена его способность анализировать образцы пациентов.

Портативный сенсор (ePAD) на бумажной основе с воском, модифицированной оксидом графена, был разработан в [98] для обнаружения домена RBD шиповидного белка, IgG и IgM. В этой работе один лист бумаги ePAD состоит из трех складных слоев: рабочий ePAD, вспомогательный ePAD и закрывающий ePAD. Гидрофильный центр каждой зоны был ограничен парафиновым барьером, благодаря которому раствор мог протекать в тестовую зону на дне. Затем на задней части устройства были напечатаны три электрода методом трафаретной печати. В частности, рабочий электрод (WE) был напечатан на рабочем ePAD, он покрывал тестовую зону, а вспомогательный электрод (CE) и электрод сравнения (RE) были напечатаны на вспомогательном ePAD. Центр круга вспомогательного ePAD был проколот в виде отверстия, чтобы обеспечить прямое проникновение раствора в тестовую зону (после того, как окислительно-восстановительный раствор был добавлен). Закрывающий ePAD был разработан для инкапсуляции образца внутри устройства и предотвращения его воздействия на окружающую среду после использования. На тестовой зоне рабочего ePAD иммобилизовали IgM к SARS-CoV-2. Для электрохимического обнаружения раствор окислительно-восстановительного индикатора ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) наносили на закрывающий ePAD. Впоследствии электрохимический отклик был исследован методом квадратноволновой вольтамперометрии. Время инкубации белка с антителами составило 45 мин. Линейный динамический диапазон для определения RBD белка был построен в диапазоне 1–1000 нг/мл с LOD 0,11 нг/мл в буфере, что недостаточно для обнаружения антигена в образцах мазков из носоглотки человека (до пг/мл).

В портативном устройстве eCoVSENS электроды, полученные трафаретной печатью и

модифицированные наночастицами золота с антителами, использовали для обнаружения субъединицы S1 шиповидного белка в слюне [101]. В работе получены два сенсора: электроды на основе оксида олова, связанные с потенциостатом, и напечатанные углеродные электроды с портативным устройством считывания (eCoVSENS). Сенсор с применением потенциостата был изготовлен с помощью легированного фтором электрода из оксида олова (FTO) с наночастицами золота (AuNP) и иммобилизованными моноклональными антителами (nCovid-19Ab) для изменения электропроводности. Точно так же модифицировались электроды в eCoVSENS. Электрохимическую характеристику обеих систем проводили с использованием трех-электродной ячейки. В оптимальных условиях иммуносенсоры на основе FTO и eCoVSENS показали высокую чувствительность для обнаружения S1-субъединицы шиповидного белка в диапазоне от 1 фМ до 1 мкМ. Устройство eCoVSENS может успешно обнаруживать белок при концентрации 10 фМ в стандартном буфере, что близко к датчику FTO/AuNP. Было показано, что предел обнаружения составляет 90 фМ для eCoVSENS и 120 фМ для FTO/AuNP в случае образцов слюны с добавлением S1-субъединицы. Предлагаемое портативное устройство eCoVSENS может быть использовано в качестве диагностического инструмента для быстрого (в течение 10–30 с) обнаружения следов шиповидного белка непосредственно в слюне пациента неинвазивным способом.

Известен биосенсор, который позволяет обнаружить S1-домен шиповидного белка при использовании небольших объемов образца (20 мкл) [102]. Метод основан на клетках млекопитающих Vero, которые были сконструированы путем электровставки человеческого химерного антитела к субъединице S1 шиповидного белка. Этот подход, известный как молекулярная идентификация посредством мембранной инженерии (Molecular Identification through Membrane Engineering), представляет собой общий принцип клеточного анализа для определения аналитов путем их взаимодействия с клеточными элементами биораспознавания, поверхности которых были модифицированы электроинсерцией аналит-специфичных антител. Продемонстрировано, что присоединение белка к связанным с мембраной антителам приводит к селективному и значительному изменению клеточных биоэлектрических свойств. Свойства мембранно-инженерных клеток определяли с помо-

щью клеточного биосенсора, который состоит из восьми золотых электродов, полученных трафаретной печатью (рабочий электрод – золото (Au), эталон – Ag/AgCl) на одноразовой сенсорной полоске. Клеточный биосенсор связан с потенциостатом (биоэлектрический анализ распознавания (BERA)), а также совмещен с индивидуальным портативным считывающим устройством, которым можно управлять через смартфон/планшет. Новый биосенсор дал сверхбыстрые результаты (3 мин) с пределом обнаружения 1 фг/мл и полулинейным диапазоном отклика от 10 фг до 1 мкг/мл. Кроме того, не наблюдалось перекрестной реактивности против нуклеокапсидного белка SARS-CoV-2.

Биосенсор на основе палладиевого тонкопленочного электрода, покрытого ACE2, был разработан в [103]. Два слоя гранул Pd были нанесены на подложку из ПЭТФ путем напыления, ACE2 связывался с Pd посредством сульфидной связи. Методом измерения служила электрохимическая спектроскопия импеданса с электроактивным соединением $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Способность EIS-биосенсора обнаруживать связывание SARS-CoV-2 с ACE2 была впервые продемонстрирована на примере связывания псевдовируса nCoV-S-Luc. Далее использовали рекомбинантный рецептор-связывающий домен шиповидного белка. Его концентрация, при которой сигнал биосенсора был равен половине от максимального значения, составляла $1,74 \pm 0,31$ мкМ. Этот метод оказался очень эффективным для обнаружения фармакологических ингибиторов связывания SARS-CoV-2 с ACE2. Система могла обнаруживать влияние небольших аналитов на процесс связывания RBD с ACE2 при низкой концентрации аналита и малом объеме (соответственно 0,1 мкг/мл и ~1 мкл, расчетное общее потребление аналита <4 пг) в течение 21 мин.

Электрохимический сенсор на основе нанотрубок TiO_2 , функционализированных кобальтом, был предложен авторами [104] для быстрого обнаружения шиповидного RBD. Это исследование включало одноэтапное электрохимическое анодирование для синтеза нанотрубок TiO_2 , а затем отожженные нанотрубки TiO_2 функционализировали кобальтом с использованием «мокрого» метода. Сторона Co- TiO_2 , обращенная вверх, действовала как рабочий электрод, а сторона Ti, обращенная книзу, действовала как вспомогательный электрод. Отклик сенсора на разные концентрации белка RBD определяли с помощью метода амперометрии.

Непонятно, за счет чего достигается селективность сенсора непосредственно к RBD, в связи с чем применимость сенсора вызывает вопросы. Нет данных о специфичности сенсора. Разработчики показали определение белка при низкой концентрации (14–1400 нМ), демонстрируя линейный отклик при определении вирусных белков в исследованном диапазоне концентраций. Предел обнаружения составил ~0,7 нМ, время обнаружения – ~30 с.

Был предложен электрохимический иммуноанализ для быстрого обнаружения шиповидного белка вируса SARS-CoV-2 [105]. Сенсор состоит из графенового напечатанного рабочего электрода, функционализированного антителами против S-белка. Измерение биосенсора проводили методом квадратноволновой вольтамперометрии в присутствии $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Общее изменение тока окислительно-восстановительной пары при увеличении концентрации антигена на поверхности сенсора использовали для обнаружения. Биосенсор может специфически детектировать шиповидный белок с наименьшей обнаруживаемой концентрацией 260 нМ (20 мкг/мл) при времени инкубации 45 мин и вирусные частицы SARS-CoV-2 в концентрации $5,5 \times 10^5$ БОЕ/мл. Стоит отметить, что авторы использовали только три концентрации мишени для построения градуировочного графика.

Портативный сенсор (RAPID 1.0) был разработан авторами [106]. Электроды были напечатаны трафаретной печатью на плате из фенольной бумаги или на фильтровальной бумаге с проводящим углеродом и чернилами Ag/AgCl. Использовали трехэлектродную конфигурацию: CE (вспомогательный электрод), WE (рабочий электрод) и RE (электрод сравнения). Рабочий электрод функционализировали глутаровым альдегидом, чтобы обеспечить иммобилизацию ACE2, которое стабилизировали добавлением бычьего сывороточного альбумина. Обнаружение было улучшено за счет добавления проникающей мембраны Nafion, позволяющей проводить предварительное химическое концентрирование катионов и защищать поверхность электрода от биологического обрастания белками, липидами и другими макромолекулами, присутствующими в матрице биологического образца. Биохимическая информация от взаимодействия между S-белком SARS-CoV-2 и ACE2 преобразовывалась в электрический сигнал. Перенос заряда окислительно-восстановительного зонда $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ измеряли с помощью электрохимической импедансной спектроскопии (EIS). При

выполнении измерений в чистой слюне калибровочная кривая строилась при концентрации в диапазоне от 100 фг/мл до 100 нг/мл S-белка. Расчетные LOD и LOQ составили 1,39 и 4,63 пг/мл соответственно. RAPID показал высокую чувствительность к инактивированному SARS-CoV-2, значение LOD составило 1,16 БОЕ/мл, что соответствует порядку 100 копий РНК/мкл. Биосенсор, модифицированный рецептором ACE2, может обнаруживать SARS-CoV-2 в течение 4 мин в 10 мкл образца. Специфичность и чувствительность RAPID 1.0 для образцов слюны составляли 100 и 85,3%, для образцов носоглотки/ротоглотки – 86,5 и 100% соответственно.

Авторы [107] разработали диагностический тест (LEAD), который обнаруживает шиповидный белок SARS-CoV-2 в течение 6,5 мин. Тест состоит из преобразователя сигнала, изготовленного из графитовых электродов (трехэлектродная ячейка) и пластикового флакона. Графитовый рабочий электрод (WE) был модифицирован AuNP, стабилизированным цистеамином, чтобы обеспечить дальнейшую модификацию рецептором человеческого ACE2. БСА использовали для блокировки оставшихся активных участков на поверхности электрода, чтобы избежать неспецифических взаимодействий между клиническим образцом и биосенсором. Использовали квадратноволновую вольтамперометрию (SWV) для обнаружения SARS-CoV-2 в присутствии электроактивного соединения $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Чернила Ag/AgCl были нанесены на один из графитовых электродов для создания электрода сравнения. LEAD демонстрирует высокую чувствительность, предел обнаружения вирусного шиповидного белка составил 229 фг/мл, а инактивированного SARS-CoV-2 – 2,07 БОЕ/мл. Тестирование слюны и образцов из носоглотки/ротоглотки также показало высокую специфичность и чувствительность. Не было обнаружено перекрестной реактивности с другими вирусами (MHV; H1N1, A/California/2009; Influenza B, B/Colorado и HSV2, herpes simplex virus-2), тест показал приемлемый срок хранения (5 дней при 4 °C).

Недавно был разработан импедиметрический иммуносенсор путем иммобилизации антител на модифицированном стеклоуглероде для обнаружения RBD-фрагмента S-белка SARS-CoV-2 [108]. Связывание антиген-антитело на стеклоуглеродном электроде было успешно обнаружено с помощью электрохимической импедансной

спектроскопии. Поверхность электрода была покрыта восстановленным оксидом графена rGO, который модифицировался антителами к S1-субъединице. Сенсор обнаруживал S-белок SARS-CoV-2 с содержанием LOD 150 нг/мл в диапазоне линейных концентраций от 0,16 до 40 мкг/мл. Разработанный электрохимический иммуносенсор может определять RBD в концентрации всего 2,40 нг/мл с использованием метода квадратноволновой вольтамперометрии. Иммуносенсор показал хорошую реакцию на определение RBD SARS-CoV-2 в разбавленных обогащенных образцах слюны.

Разработан биосенсор на основе аптамера и угольного электрода с трафаретной печатью для обнаружения S-белка SARS-CoV-2 [109]. Аптасенсор основан на аптамере [62], нацеленном на рецептор-связывающий домен (RBD) шиповидного белка (S-белка) SARS-CoV-2. Аптамер иммобилизовался на золотых наночастицах, которые наносились на поверхность напечатанного углеродного электрода (SPCE). Обнаружение S-белка SARS-CoV-2 было достигнуто с помощью электрохимической импедансной спектроскопии после 40-минутной инкубации с аналитом при нескольких значениях концентрации, что позволило получить предел обнаружения 1,30 пМ (66 пг/мл). Использовали трехэлектродную ячейку с рабочим углеродным электродом, электродом сравнения Ag/AgCl и угольным вспомогательным электродом с большей электроактивной площадью. Исследование специфичности показало, что реакция аптасенсора на S-белок MERS составляла всего 7% по отношению к S-белку SARS-CoV ($\Delta R_{ct} = 26\%$). Это значение составляет более половины ответа, полученного с S-белком SARS-CoV-2 (43%). Это неудивительно, поскольку S-белки SARS-CoV и SARS-CoV-2 имеют 77%-ю идентичность последовательностей. Аптасенсор был успешно применен для обнаружения псевдовируса, содержащего S-белок SARS-CoV-2.

3.1.3.2. Нуклеокапсидный белок SARS-CoV-2

По сравнению с биосенсорами на S-белок сенсоров на N-белок значительно меньше. Это связано с его меньшим количеством и распространенностью в вирусе, а также доступностью для обнаружения. Основными биораспознающими компонентами являются антитела к N-белку. Считывание сигнала от взаимодействия происходит за счет изменения электропроводимости раствора при присоединении мишени.

Использование разработанных биосенсоров на N-белок в местах оказания помощи вне лаборатории (POC (point-of-care), POCT (point-of-care testing)) видится невозможным в виду их дороговизны за счет антител, сложности процедуры и компонентов тестирования, а также маленького срока хранения.

Авторы [110] предложили электрохимический сэндвич-иммуноанализ SARS-CoV-2. В качестве мишеней использовались S- и N-белок SARS-CoV-2. Магнитные частицы были модифицированы антителами к белкам, в работе использовали моно- и поликлональные антитела. Связывание белков с антителами оценивали с помощью вторичного антитела, меченного ферментом (щелочной фосфатазой). Используя модифицированные сажи трафаретных электродов и дифференциальную импульсную вольтамперометрию анализировали 1-нафтол – продукт ферментативного расщепления 1-нафтилфосфата под действием фермента. Электроды были изготовлены на прозрачной и гибкой подложке из полиэстера с помощью сериграфического принтера. Трех-электродная ячейка была реализована с использованием чернил на основе графита для рабочего электрода, а также чернил на основе серебра для электрода сравнения и вспомогательного электрода. Метод измерения – дифференциальная импульсная вольтамперометрия с позиционированием магнитных частиц на рабочем электроде с применением магнита. Разработанный сенсор тестировали в буферном растворе, образцах слюны с культивируемым вирусом SARS-CoV-2, а также на клинических образцах слюны, сравнивая результаты с данными, полученными методом ПЦР при анализе мазка из носоглотки. Предел обнаружения в образцах необработанной слюны для S- и N-белка составил 19 и 8 нг/мл соответственно. В буфере биосенсор обнаруживал 6,5 БОЕ/мл SARS-CoV-2 (для сенсора на основе S1-антител) и $6,5 \times 10^3$ БОЕ/мл SARS-CoV-2 (для сенсора на основе N-антител). В качестве результатов рассматриваются общее время анализа (менее 30 мин), простота отбора проб (необработанная слюна) и портативность (печатный датчик и портативный потенциостат).

Электрод, покрытый ватным наконечником для сбора образца, был успешно использован для обнаружения антигена SARS-CoV-2 и самого вируса [111]. Иммуносенсор был изготовлен путем иммобилизации N-белка на электродах, полу-

ченных трафаретной печатью и модифицированных углеродными нановолокнами, которые были функционализированы электропрививкой диазотия. Обнаружение антигена вируса достигалось путем взятия мазка с последующим конкурентным анализом с использованием фиксированного количества антител к N-белку. Количественное определение проводили квадратно-волновой вольтамперометрией в присутствии раствора $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Предел обнаружения составил 0,8 пг/мл N-белка. Биосенсор не показал значительной перекрестной реактивности с другими вирусными антигенами, такими как грипп А и HCoV, что указывает на высокую селективность метода. Кроме того, биосенсор был успешно применен для обнаружения вирусного антигена в носовых обогащенных пробах, демонстрируя высокую сходимость («введено-найдено»). Это устройство было также успешно использовано для дифференциации здоровых и инфицированных COVID-19 пациентов.

В этом исследовании сообщается об использовании высокостабильного нанокompозита, состоящего из оксида цинка и восстановленного оксида графена (bbZnO/rGO), нанесенного на углеродные электроды, напечатанные методом трафаретной печати, для электрохимического иммунобиосенсорного анализа N-белка SARS-CoV-2 в обогащенных и клинических образцах [112]. Включение солевой (ионной) матрицы для равномерного диспергирования наносмеси исключает многоступенчатый синтез наноматериала на поверхности электрода и обеспечивает стабильное одноэтапное нанопокрывание сенсора. Сенсор тестировали методом электрохимической импедансной спектроскопии. Биосенсор обеспечивает предел обнаружения 21 фг/мл в линейном диапазоне 1–10000 пг/мл и демонстрирует чувствительность 32,07 Ом·мл/пг·мм² для обнаружения N-белка в обогащенных образцах. Биосенсор успешно различает положительные и отрицательные клинические образцы в течение 15 мин.

Электрохимический сенсор для определения N-белка SARS-CoV-2 на основе полимера с молекулярным отпечатком (MIP) был недавно предложен в работе [113]. Ключевым элементом сенсора является одноразовый тонкопленочный электрод, модифицированный MIP для N-белка и связанный с портативным потенциостатом. Сенсор был приготовлен путем модификации электрода Au-TFE пленкой N-белок-MIP, полученной из поли-м-фенилендиамин. В качестве метода измерения использовали дифференциаль-

ную импульсную вольтамперометрию в присутствии окислительно-восстановительного соединения $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Полученный биосенсор показал псевдолинейный ответ на белок в лизирующем буфере до 111 фМ с пределом обнаружения и количественного определения 15 и 50 фМ соответственно. Селективность сенсора была проверена путем сравнения сигналов от других белков: S1, E2 HCV, CD48 и BSA. Сенсор был способен сигнализировать о присутствии N-белка в образцах мазков из носоглотки пациентов с положительным результатом на COVID-19.

3.2. Обнаружение SARS-CoV-2 с помощью ISFET

Биосенсоры на основе FET обладают такими преимуществами, как высокая скорость и низкий предел обнаружения, а также малое время отклика. Использование полупроводниковых технологий позволяет получать множество преобразователей сигнала в рамках одного производственного цикла, совмещать FET-сенсоры с интегральной системой обработки сигнала и с пользовательским интерфейсом. В результате сенсоры на основе транзисторов обладают большим потенциалом использования.

Можно выделить несколько закономерностей, которые выявились при подготовке этого раздела. Во-первых, большая часть FET-биосенсоров в качестве преобразователя сигнала использует графеновые полевые транзисторы, что, возможно, связано с доступностью и дешевизной такой технологии. Во-вторых, в FET-биосенсорах на SARS-CoV-2 обнаружение мишеней происходит напрямую без дополнительных меток. С учетом вышесказанного можно считать, что эти биосенсоры соответствуют ASSURED-критериям для тестирования вне лабораторий в местах оказания помощи: POC (point-of-care) и POCT (point-of-care testing).

Наиболее часто используемым биораспознающим элементом является антитело к S-белку, т.е. FET детектирует взаимодействие антитела и антигена. Вторым по распространенности биораспознающим элементом является одноцепочечная ДНК, и тогда FET детектирует напрямую гибридизацию с мишенью. Многие разработанные FET-биосенсоры использовали для анализа сложные по составу среды, такие как слюна и мазки из носоглотки. При дальнейшем развитии FET-сенсоров необходимо обращать внимание на модификацию поверхности для того, чтобы препятствовать биообрастанию и ложноположительным сигналам при анализе многокомпонентой сложной

матрицы, а также следить за сигналами платформы в случае контрольных образцов.

3.2.1. Определение вирусной РНК

В одной из работ [114] был предложен и продемонстрирован биосенсор на основе FET из углеродных нанотрубок (CNT) для селективного обнаружения РНК SARS-CoV-2. Полевые CNT-транзисторы были изготовлены на гибкой подложке из каптона, а сенсор был получен путем иммобилизации обратной последовательности гена РНК-зависимой РНК-полимеразы SARS-CoV-2 на поверхности CNT-канала транзистора. Ток устройства (I_{ds}) измеряли путем изменения напряжения затвора (V_g) от $-0,5$ до 1 В с шагом $0,02$ В. Измерения датчика проводили путем непрерывного мониторинга I_{ds} с интервалом выборки 1 с. В качестве электрода сравнения использовали Ag/AgCl . Биосенсоры тестировали с синтетическими положительными и контрольными последовательностями-мишенями. Биосенсор продемонстрировал избирательную реакцию обнаружения положительной последовательности-мишени с пределом обнаружения 10 фМ.

Разработан портативный бифункциональный электрический детектор на основе графеновых полевых транзисторов для SARS-CoV-2 [115]. Система обнаружения состоит из двух частей: корпусированного биосенсорного чипа, работающего по принципу «включай и работай», и собственной электрической измерительной машины. Каждый чип содержит десять G-FET; специфические зонды одноцепочечной ДНК иммобилизуются на поверхности графена через линкер (N-гидроксисукцинимидного эфира 1-пиренмасляной кислоты). Биосенсор продемонстрировал возможность детектирования гена-мишени РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) SARS-CoV-2 со сверхнизким пределом обнаружения, равным $\sim 0,1$ фг/мл. Для проверки работоспособности сенсора использовали клинические образцы, взятые у десяти пациентов с инфекцией COVID-19 и у восьми здоровых людей. Весь процесс, исключая извлечение мишеней для обнаружения из ротоглоточных мазков, занимает около 10 мин. Заменив зонд одноцепочечной ДНК белком-антигеном SARS-CoV-2, система обнаружения также может детектировать антитела IgM и IgG к SARS-CoV-2 со сверхнизким пределом обнаружения, составляющим ~ 1 фг/мл. Иммуноанализ образцов сыворотки шести пациентов

с COVID-19 и трех здоровых субъектов совпал с результатами оптических методов на основе ПЦР. В работе не использовали контрольные последовательности для характеристики реакции сенсора на мешающие соединения. Однако анализ клинических образцов закрывает этот пробел.

Для обнаружения комплементарных ДНК и вирусных РНК предложен сенсор на основе полевого транзистора с двойным электрическим слоем (EDL-gated BioFET) [116]. FET был создан на заводе «Jumpers Biotech», Тайвань. Зонды одноцепочечной ДНК иммобилизовали на золотой поверхности сенсора, после чего исследовали комплементарную ДНК и вирусную РНК. Гибридизация зонда с мишенью приводила к электрическому перераспределению емкости двойного диэлектрического слоя, что вызывало изменение тока стока полевого транзистора (I_d). Селективность между комплементарной и некомплементарной ДНК была подтверждена, и обнаружение вирусной РНК было тщательно изучено с использованием различных зондов при 25 и 95 °C в разбавленной слюне. Наконец, было успешно подтверждено обнаружение РНК N-гена SARS-CoV-2 в разбавленной слюне человека при концентрации от 1 фМ до 1 пМ.

Разработали быструю (без ДНК-амплификации) платформу для обнаружения РНК SARS-CoV-2 в образцах мазка из горла человека [117]. Сенсор изготовлен на графеновом полевым транзисторе (G-FET), модифицированном наночастицами золота (AuNP), после чего на поверхность AuNP был иммобилизован дополнительный зонд фосфордиамидат-морфолинолигомер (РМО). Измерения тока стока проводили в разбавленном и неразбавленном PBS в качестве жидкостного затвора и при смещении 0,1 В на электроде Ag/AgCl, который использовался в качестве затвора для стабилизации потенциала жидкостного электролита. Этот сенсор позволил провести высокочувствительное тестирование гена RdRp SARS-CoV-2, поскольку РМО не имеет зарядов, что приводит к низкому фоновому сигналу. Метод показал низкий предел обнаружения RdRp в фосфатно-солевом буфере (0,37 фМ), мазке из зева (2,29 фМ) и сыворотке (3,99 фМ) и обеспечил быстрый ответ на образцы пациентов с COVID-19 в течение 2 мин. Разработанный наносенсор был способен анализировать экстракты РНК из 30

реальных клинических образцов. Результаты показывают, что датчик может отличать здоровых людей от инфицированных, что хорошо согласуется с результатами ПЦР (индекс Каппа равен 0,92). Кроме того, было проведено четкое различие между RdRp SARS-CoV-2 и RdRp SARS-CoV.

3.2.2. Определение белков SARS-CoV-2

3.2.2.1. Определение шиповидного белка

Был разработан биосенсор на основе полевого транзистора (FET) для обнаружения шиповидного белка SARS-CoV-2 в клинических образцах [76]. Полевой транзистор был получен на SiO_2/Si субстрате с покрытием графеновыми листами. Поверхность полевого транзистора была модифицирована специфическим антителом против S-белка SARS-CoV-2. Во время измерений поддерживалось постоянное напряжение смещения сток-исток около 10 мВ. Электрический ответный сигнал был нормирован как $[\Delta I/I_0] = (I - I_0)/I_0$, где I – обнаруженный ток в реальном времени, а I_0 – начальный ток. Работоспособность сенсора определяли с использованием антигенного белка культивированного вируса и образцов мазков из носоглотки пациентов с COVID-19. Разработанная система могла обнаруживать шиповый белок в концентрации 1 и 100 фг/мл в фосфатно-солевом буфере и клинической среде соответственно. Кроме того, FET-биосенсор успешно обнаружил SARS-CoV-2 в культуральной среде ($\text{LOD} = 1,6 \times 10^1$ БОЕ/мл) и клинических образцах ($\text{LOD} = 2,42 \times 10^2$ копий/мл).

В работе [118] получен лазерно-индуцированный графеновый полевой транзистор (LIG-FET) для обнаружения SARS-CoV-2. Для изготовления FET использовали LIG с разной степенью восстановления, имеющей пористые графеновые каналы, похожие на устричный риф, для обогащения точек связывания между вирусным белком и сенсорной областью. Целевой белок может быть непосредственно абсорбирован на поверхности канала LIG посредством аффинного взаимодействия графена и белка. Поверхность была модифицирована антителом против шиповидного белка SARS-CoV-2 в $1 \times \text{PBS}$ (фосфатно-солевой буфер) и пассивирована БСА. После иммобилизации специфических антител на поверхности канала FET может обнаруживать S-белок за 15 мин при концентрации 1 пг/мл и 1 нг/мл в PBS и сыворотке крови человека соответственно. Кроме того, сенсор демонстри-

рует высокую специфичность к шиповидному белку SARS-CoV-2 по сравнению с нуклеокапсидным белком. Потенциал модулировался одноконтakтным электродом сравнения Ag/AgCl, помещенным в жидкостной затвор. Проводили измерение I_{ds} в зависимости от V_g .

Разработан быстрый (2–3 мин) электрохимический биосенсор на основе полевого транзистора с углеродными нанотрубками (CNT-FET) [119]. На поверхность Si/SiO₂ методом печати были нанесены углеродные нанотрубки, на которых в области канала транзистора впоследствии иммобилизовались антитела на S1-субъединицу S-белка SARS-CoV-2. Взаимодействие антитела с антигеном характеризуется изменением электрического тока в канале транзистора I_{ds} при стабильном напряжении исток-сток V_{ds} (0,5 В). Коммерческий антиген использовали для характеристики электрического выхода биосенсора. Антиген S1 SARS-CoV-2 в 10 мМ буфере обнаруживался биосенсором CNT-FET в концентрации от 0,1 до 5000 фг/мл с пределом обнаружения 4,12 фг/мл. Тест на селективность проводили с использованием целевых (SARS-CoV-2 S1) и нецелевых (SARS-CoV-1 S1, MERS-CoV S1) антигенов в 10 мМ буфере. Биосенсор показал высокую селективность – отсутствие реакции на антиген S1 SARS-CoV-1 или MERS-CoV S1. Были протестированы образцы слюны с введенным антигеном S1 SARS-CoV-2 и без него. Существенных изменений I_{ds} после закапывания необогащенной слюны не наблюдалось. Однако слюна с антигеном SARS-CoV-2 S1 показала сильную реакцию связывания с иммобилизованным антителом на поверхности сенсора, диапазон исследованных концентраций 0,1–5000 фг/мл. После регенерации отклик сенсора уменьшался менее чем на 10%.

Полевой транзистор на основе полупроводникового дихалькогенида переходного металла (TMDC) WSe₂ был использован для разработки биосенсора против шиповидного белка SARS-CoV-2 *in vitro* [120]. Полевые транзисторы были изготовлены путем фотолитографического позиционирования встречно-штыревых контактных электродов (т.е. истока и стока) на монослойных кристаллах WSe₂, где в качестве затвора выступал электролит. Для приложения смещения к электролиту использовали наконечники зондов Signatone модели SE-BC (бериллиевая медь). Обнаруженный электрический ответный сигнал был нормирован как $[\Delta I/I_0] = (I - I_0)/I_0$, где I – обнаруженный ток в реальном времени, а I_0 – начальный ток. Монослой WSe₂ функцио-

нализовались моноклональным антителом против шиповидного белка S. Биосенсор продемонстрировал предел обнаружения до 25 фг/мкл белка в 0,01-кратном фосфатно-солевом буфере (PBS).

Представлена биофункционализация графеновых полевых транзисторов (GFET) с помощью нанокаркаса из винилсульфированного полиэтилена для улучшенного биосенсорного определения шиповидного белка SARS-CoV-2 и человеческого ферритина – двух мишеней, имеющих большое значение для быстрой диагностики и наблюдения за лицами с COVID-19 [121]. Гетеробифункциональный нанокаркас обеспечивает ковалентную иммобилизацию связывающих белков и полимеров, препятствующих обрастанию, в то время как вся конструкция прикрепляется к графену за счет многовалентных π - π -взаимодействий. В целях оптимизации сенсорной платформы для обнаружения гликопротеинов используют конканавалин А. Моноклональные антитела, специфичные к шиповидному белку SARS-CoV-2 и ферритину человека иммобилизуют далее на нанокаркасе, получая биосенсоры с пределом обнаружения 0,74 и 0,23 нМ и константами аффинности 6,7 и 8,8 нМ соответственно. Обе биосенсорные платформы демонстрируют хорошую специфичность, быстрое время отклика и широкий динамический диапазон (0,1–100 нМ). Кроме того, S-белок SARS-CoV-2 обнаруживается и в образцах мазков из носоглотки.

3.2.2.2. Определение нуклеокапсидного белка

В работе [122] предложен биосенсор для анализа N-белка COVID-19 в искусственной слюне с использованием полевого транзистора с двойным электрическим слоем (EDL) (BioFET). Каждый сенсорный стержень, который был специально разработан и изготовлен на заводе «Jumpers Biotech» (Тайвань), имел 8 датчиков с индивидуальной разводкой металлизации, расположенных в массиве 1×8, где каждый датчик состоял из двух золотых электродов. Входное напряжение затвора (V_g) прикладывалось к одному из электродов (каждого датчика), а выходное напряжение V_g измерялось на выходе затвора полевого транзистора через другой электрод (каждого датчика). Считыватель со встроенным Bluetooth передавал данные на устройства, где результат в реальном времени отображался на iPhone, а необработанные данные сохранялись на ноутбуке для дальнейшего анализа. EDL в виде слоя иммобилизованных антител к N-белку был создан на поверхно-

сти FET. Обнаружение белка нуклеокапсида SARS-CoV-2 подтверждено в пределах (LODs) 0,34 нг/мл (7,44 пМ) и 0,14 нг/мл (2,96 пМ) в PBS и искусственной слюне, соответственно. Специфичность проверялась с использованием антигенов, проявляющих низкую перекрестную реактивность среди MERS-CoV, вируса гриппа А и вируса гриппа В.

Сообщается об анализе N- и S-белков SARS-CoV-2 с использованием крошеного графенового FET с двойным электрическим слоем (EDL) [123]. Полевой транзистор с крошеным графеном позволяет увеличить длину Дебая и уменьшить экранирование заряда биомолекул, а изгиб графена также может открыть запрещенную зону, что экспоненциально увеличивает ток при связывании зарядов [124]. Антитела к N- и S-белкам (приобретенные в «CD Diagnostics») иммобилизовались на графеновых каналах транзистора. Сигнал биосенсора на добавление N-белка исследовали в $1 \times \text{PBS}$, четкий сигнал наблюдался при добавлении 100 аМ. Сигнал биосенсора на добавление S-белка исследовали в $0,1 \times \text{PBS}$, четкий сигнал возникал при добавлении 1 аМ.

3.2.3. Расчетные работы

Помимо экспериментальных существуют расчетные работы на полевых транзисторах для детекции SARS-CoV-2, которые подтверждают возможность обнаружения вируса с помощью полупроводниковых преобразователей.

В работе [125] представлен биосенсор с двойным затвором и диэлектрической модуляцией FET (DGDMFET) для обнаружения COVID-19. Улучшение чувствительности достигается за счет использования новой схемы двойного металлического затвора с различными рабочими зонами (Au ближе к истоку, W ближе к стоку) и слой оксида хрома (Cr_2O_3), который вырезается вертикально для образования нанозазора. В то же время плотность заряда на интерфейсе поддерживается равной примерно $1,0 \times 10^{11} \text{ см}^{-2}$ в слое Si/SiO₂. В этом исследовании предполагается, что изменение в диэлектрической проницаемости вблизи чувствительной поверхности приводит к значительному сдвигу порогового напряжения полевого транзистора. В работе [125] рассчитано детектирование SARS-CoV-2 двумя способами: 1) распознавание S-белка, 2) распознавание ДНК. Диапазоны диэлектрической проницаемости ДНК варьирует от 1 до 64. Шиповый белок вируса SARS Cov-2 имеет диэлектрическую проницаемость между 1 и 4. Предлагаемый биосенсор по-

казывает увеличение на 12% пороговой чувствительности для диэлектрической проницаемости вирусного белка $K' = 4,1$.

Аналогичным образом в работе [126] разработан сенсор на основе кремниевого нанопроволочного полевого транзистора (SiNW-FET) с использованием полуэмпирического подхода. Свойства электронного транспорта для обнаружения шиповидного белка COVID-19 моделируются и изучаются авторами. Конфигурация транзистора представляла собой исток, сток и канал, а также электрод затвора, расположенный под каналом. Концентрация антитела и антигена на SiNW-FET поддерживалась низкой (одна молекула), чтобы сократить время, необходимое для проведения моделирования. Различные свойства электронного транспорта, такие как спектр пропускания, проводимость и электронный ток, исследуются с помощью полуэмпирического моделирования, которое сочетается с неравновесной функцией Грина. В разработанном сенсоре оптимальные результаты были получены при фиксированном потенциале смещения между левым и правым электродами (+0,15 и -0,15 эВ). При фиксировании напряжения смещения на уровне 0,3 В были получены наилучшие показания чувствительности. Ожидалось, что ориентационный эффект белка и антитела будет очень небольшим и не должен влиять на обнаружение. Это исследование подтвердило, что разработанный SiNW-FET можно использовать в качестве датчика для обнаружения вируса COVID-19. Кроме того, селективность разработанного сенсора проверяется путем изучения свойств электронного транспорта для других вирусов, включая грипп, ротавирус и ВИЧ.

В работе рассматривается альтернативный подход, основанный на обнаружении летучего органического соединения в качестве биомаркера COVID-19 через графеновый полевой транзистор с Pt (Pt-GFET) [127]. Изменение химии поверхности графена при добавлении Pt влияет на его зонную структуру и открывает запрещенную зону на 0,15 эВ. Атомы Pt служат также сайтом связывания для биомаркера этилбутирата. Расчеты теории функции плотности используются для получения электронных свойств графена, декорированного платиной, с адсорбцией и без адсорбции этилбутирата. Установлено, что адсорбция биомаркера увеличивает ширину запрещенной зоны в ленточной структуре графена и изменяет эффективную массу носителя и эффективную плотность состояний. Однако адсорбция вызывает снижение подвижности носителей,

что приводит к уменьшению силы тока устройства. Устройство разработано с использованием FEM в COMSOL Multiphysics, DC. Исследование показывает, что при адсорбции биомаркера происходит изменение V_n от 1,08 до 1,23, что объясняется изменением плотности носителя в устройстве и трактуется как сенсорные параметры. Кроме того, результаты показывают, что увеличение концентрации биомаркера позволяет получить более высокие напряжения затвора. Следовательно, Pt-GFET может определить этилбутират – летучий биомаркер COVID-19.

Заключение

В настоящем обзоре обсуждаются текущие стратегии электрохимической сенсорной платформы для обнаружения SARS-CoV-2. В большинстве исследований электрохимических биосенсоров в качестве молекул биораспознавания использовали антитела и одноцепочечная ДНК. Элементы биораспознавания были иммобилизованы в основном либо непосредственно на поверхности рабочего электрода (или канала транзистора), либо через дополнительные модификации поверхности. При разработке пре-

образователей сигнала стремились увеличить чувствительность считывания сигнала от взаимодействия с мишенями. Их также миниатюризировали, для того чтобы сделать биосенсор портативным. Интеграция самых чувствительных платформ электрохимических датчиков со смартфонами позволяет конечному пользователю быстро получить результаты.

Несмотря на то, что электрохимические биосенсоры доказали свою способность диагностировать клинические образцы SARS-CoV-2, их применение сталкиваются с некоторыми ограничениями при переходе от лабораторного анализа к обнаружению на месте. Необходимо дальнейшее изучение многочисленных вопросов, включая стабильность и воспроизводимость электрохимических биосенсоров, процессы подготовки образцов, масштабирование разработки устройств и коммерциализацию электрохимических биосенсоров в качестве диагностических устройств. Это необходимо для того, чтобы сделать электрохимические биосенсоры точной платформой для быстрых, простых, надежных и портативных датчиков в целях массового скрининга инфекции COVID-19.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Coronavirus Cases: Statistics and Charts – Worldometer [Electronic resource]. URL: <https://www.worldometers.info/coronavirus/coronavirus-cases/> (accessed: 06.12.2022).
2. Taxon Details | ICTV [Electronic resource]. URL: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202101868 (accessed: 06.12.2022).
3. Wu F. et al. // Nature. 2008. Vol. 579 (DOI: 10.1038/s41586-020-2008-3).
4. Zhou P. et al. // Nature. 2020. Vol. 588 (DOI: 10.1038/s41586-020-2951-z.).
5. Pinto D. et al. // Nature. 2020. Vol. 583 (DOI: 10.1038/s41586-020-2349-y).
6. Fan Y. et al. Bat Coronaviruses in China. 2019 (DOI: 10.3390/v11030210).
7. Gu H. et al. // Virus Evolution. 2020. Vol. 6. N 1. P. veaa032 (DOI 10.1093/ve/veaa032)
8. He J. et al. // J. Med. Virol. John Wiley and Sons Inc, 2021. Vol. 93. N 2. P. 820 (DOI: 10.1002/jmv.26326).
9. Singhal T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). 2098 (DOI: 10.1007/s12098-020-03263-6).
10. Han A.Y. et al. // Chem. Senses. Oxford Academic. 2020. Vol. 45. N 6. P. 423 (DOI: 10.1093/chemse/bjaa040).
11. Wu Z., McGoogan J.M. // JAMA. American Medical Association. 2020. Vol. 323. N 13. P. 1239 (DOI: 10.1001/jama.2020.2648).
12. Zubair A.S. et al. // JAMA Neurol. American Medical Association. 2020. Vol. 77. N 8. P. 1018 (DOI: 10.1001/jamaneurol.2020.2065).
13. Desforges M. et al. // Viruses 2020. Vol. 12. P. 14. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2019. Vol. 12. N 1. P. 14 (DOI: 10.3390/v12010014).
14. Zanin L. et al. // Acta Neurochir (Wien). Springer, 2020. Vol. 162. N 7. P. 1491 (DOI: 10.1007/s00701-020-04374-x).
15. Costa F.F. et al. // Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev. 2020. Vol. 14. N 5. P. 809 (DOI: 10.1016/j.dsx.2020.06.016).
16. Takeuchi O., Akira S. // Immunol. Rev. John Wiley & Sons. Ltd. 2009. Vol. 227. N 1. P. 75 (DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00737.x).
17. Saito T., Gale M. // Curr. Opin. Immunol. 2007. Vol. 19. N 1. P. 17 (DOI: 10.1016/j.coi.2006.11.003).
18. Ragab D. et al. // Front. Immunol. Frontiers Media S.A. 2020. Vol. 11. P. 1446 (DOI: 10.3389/fimmu.2020.01446).
19. Turner M.D. et al. // Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res. 2014. Vol. 1843. N 11. P. 2563 (DOI: 10.1016/j.bbamer.2014.05.014).

20. Tisoncik J.R. et al. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* American Society for Microbiology. 2012. Vol. 76. N 1. P. 16 (DOI: 10.1128/MMBR.05015-11).
21. Conti P. et al. // *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. 2020. Vol. 34. N 2. P. 327 (DOI: 10.23812/CONTI-E).
22. Chaplin D.D. // *J. Allergy Clin. Immunol.* Mosby. 2010. Vol. 125. N 2. P. S3–S23 (DOI: 10.1016/j.jaci.2009.12.980).
23. Fathi N., Rezaei N. // *Cell Biol. Int.* John Wiley & Sons. Ltd. 2020. Vol. 44. N 9. P. 1792 (DOI: 10.1002/cbin.11403).
24. Chen N. et al. // *Lancet*. 2020. Vol. 395. N 10223. P. 507 (DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7).
25. Yan R. et al. // *Science*. 2020. Vol. 367. N 6485. P. 1444 (DOI: 10.1126/science.abb2762).
26. Pachetti M. et al. // *J. Transl. Med. BioMed. Central*. 2020. Vol. 18. N 1. P. 1 (DOI: 10.1186/s12967-020-02344-6).
27. Wang C. et al. // *J. Med. Virol.* John Wiley & Sons. Ltd. 2020. Vol. 92. N 6. P. 667 (DOI: 10.1002/jmv.25762).
28. Corman V.M. et al. // *Eurosurveillance*. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2020. Vol. 25. N 3. P. 2000045 (<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>).
29. Mobed A., Sepehri Shafigh E. // *Microchem. J.* Elsevier. 2021. Vol. 164. P. 106094 (DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045).
30. Shen Y., Anwar T. Bin, Mulchandani A. // *Sensors and Actuators Reports*. Elsevier, 2021. Vol. 3. P. 100025 (DOI: 10.1016/j.snr.2021.100025).
31. Yang Y. et al. // *Innov. Cell Press*, 2020. Vol. 1. N 3. P. 100061 (DOI: 10.1016/j.xinn.2020.100061).
32. Arevalo-Rodriguez I. et al. False-negative results of initial RT-PCR assays for COVID-19: A systematic review // *PLoS One*. Public Library of Science, 2020. Vol. 15. N 12. P. e0242958 (DOI: 10.1371/journal.pone.0242958).
33. Ai T. et al. // *Radiology*. Radiological Society of North America Inc. 2020. Vol. 296. N 2. P. E32–E40 (DOI: 10.1148/radiol.2020200642).
34. Kupferschmidt, K. // *Science*. 2020. Vol. 367. N 6483. P. 1176–1177 (DOI: 10.1126/science.367.6483.1176).
35. Perchetti G.A. et al. // *J. Clin. Virol.* Elsevier, 2020. Vol. 129. P. 104499 (DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104499).
36. Tahamtan A., Ardebili A. // *Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results*. 2020. Vol. 20. N 5. P. 453–454 (DOI: 10.1080/14737159.2020.1757437).
37. Azahar Ali M. et al. // *Adv. Mater.* John Wiley & Sons, Ltd. 2021. Vol. 33. N 7. P. 2006647 (DOI: 10.1002/adma.202006647).
38. Baek Y.H. et al. // *Emerg. Microbes Infect.* Taylor and Francis Ltd., 2020. Vol. 9. N 1. P. 998–1007 (DOI: 10.1080/22221751.2020.1756698).
39. Pang B. et al. // *Anal. Chem.* American Chemical Society. 2020. Vol. 92. N 24. P. 16204–16212 (DOI: 10.1021/acs.analchem.0c04047).
40. Zhu X. et al. // *Biosens. Bioelectron.* Elsevier, 2020. Vol. 166. P. 112437 (DOI: 10.1016/j.bios.2020.112437).
41. Rocha P.R.F. et al. // *Sci. Reports* 2016 61. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 6. N 1. P. 1–10 (DOI: 10.1038/srep34843).
42. Bradbury A., Plückthun A. // *Nat.* 2015 5187537. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 518. N 7537. P. 27–29 (DOI: 10.1038/518027a).
43. Castillo J. et al. // *Biosens. Bioelectron.* Elsevier, 2005. Vol. 20. N 10. P. 2116–2119 (DOI: 10.1016/j.bios.2004.09.013).
44. Arnaout R. et al. SARS-CoV2 Testing: The Limit of Detection Matters / *bioRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory, 2020. P. 2020.06.02.131144 (DOI: 10.1101/2020.06.02.131144).
45. Lee H.K. et al. // *J. Vet. Sci.* 2010. Vol. 11. N 2. P. 165–167 (DOI: 10.4142/jvs.2010.11.2.165).
46. Long Q.X. et al. // *Nat. Med.* 2020. 266. Nature Publishing Group, 2020. Vol. 26. N 6. P. 845–848 (DOI: 10.1038/s41591-020-0897-1).
47. Guan W. et al. // *N. Engl. J. Med.* Massachusetts Medical Society. 2020. Vol. 382. N 18. P. 1708–1720 (DOI: 10.1056/NEJMoa2002032).
48. Quesada-González D., Merkoçi A. // *Biosens. Bioelectron.* Elsevier, 2015. Vol. 73. P. 47–63 (DOI: 10.1016/j.bios.2015.05.050).
49. Fang Y. et al. // *Radiology*. Radiological Society of North America Inc. 2020. Vol. 296. N 2. P. E115–E117 (DOI: 10.1148/radiol.2020200432).
50. Jiang S., Hillyer C., Du L. // *Trends Immunol.* Elsevier Current Trends, 2020. Vol. 41. N 5. P. 355–359 (DOI: 10.1016/j.it.2020.03.007).
51. Tikellis C., Thomas M.C. // *Int. J. Pept.* 2012. Vol. 2012 (DOI: 10.1155/2012/256294).
52. Muniyappa R., Gubbi S. // *Am. J. Physiol. – Endocrinol. Metab.* American Physiological Society, 2020. Vol. 318. N 5. P. E736–E741 (DOI: 10.1152/ajpendo.00124.2020).
53. McBride R., van Zyl M., Fielding B.C. // *Viruses* 2014. Vol. 6, Pages 2991–3018. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. 2014. Vol. 6. N 8. P. 2991 (DOI: 10.3390/v6082991).
54. Cubuk J. et al. // *bioRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory. 2020. P. 2020.06.17.158121 (DOI: 10.1101/2020.06.17.158121).
55. Krishnamurthy H.K. et al. // *PLoS One*. Public Library of Science, 2020. Vol. 15. N 11. P. e0242655 (DOI: 10.1371/journal.pone.0242655).
56. Wang H. et al. // *ACS Cent. Sci.* American Chemical Society, 2020. Vol. 6. N 12. P. 2238 (DOI: 10.1021/acscentsci.0c00742).
57. Jiang H. wei et al. // *Nat. Commun.* 2020 111. Nature Publishing Group. 2020. Vol. 11. N 1. P. 1 (DOI: 10.1038/s41467-020-17488-8).

58. Xu J. et al. // *Viruses* 2020, Vol. 12, Page 244. Multi-disciplinary Digital Publishing Institute. 2020. Vol. 12. N 2. P. 244 (DOI: 10.3390/v12020244).
59. SARS-CoV-2 / COVID-19 Antibodies for Research Use | www.antibodies-online.com [Electronic resource]. URL: <https://www.antibodies-online.com/areas/infectious-disease/covid-19/sars-cov-2-antibodies/> (accessed: 06.12.2022).
60. Kondo T. et al. // *Sci. Adv.* American Association for the Advancement of Science, 2020. Vol. 6. N 42. P. 3916 (DOI: 10.1126/sciadv.abd3916).
61. Kwon J. et al. // *J. Biomed. Nanotechnol.* American Scientific Publishers. 2019. Vol. 15. N 7. P. 1609 (DOI: 10.1166/jbn.2019.2789).
62. Narayan C. et al. // *Analyst.* The Royal Society of Chemistry. 2020. Vol. 145. N 4. P. 1473 (DOI: 10.1039/C9AN01943J).
63. Song Y. et al. // *Anal. Chem.* American Chemical Society. 2020. Vol. 92. N 14. P. 9895 (DOI: 10.1021/acs.analchem.0c01394).
64. Chen Z. et al. // *Virol. Sin.* Science Press. 2020. Vol. 35. N 3. P. 351 (DOI: 10.1007/s12250-020-00236-z).
65. Ahidjo B.A. et al. // *ACS Infect. Dis.* American Chemical Society. 2020. Vol. 6. N 7. P. 1624 (DOI: 10.1021/acsinfecdis.0c00236).
66. Brownlee C. In *Nano*, Volume 14, Issue 5 // *ACS Nano*. American Chemical Society, 2020. Vol. 14. N 5. P. 5157 (DOI: 10.1021/acsnano.0c03930).
67. Lu R. et al. // *Lancet.* Elsevier. 2020. Vol. 395. N 10224. P. 565 (DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8).
68. Tian B. et al. // *Biosens. Bioelectron.* Elsevier, 2020. Vol. 165. P. 112356 (DOI: 10.1016/j.bios.2020.112356).
69. CDC – Page Not Found [Electronic resource]. URL: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/virus-requests> (accessed: 06.12.2022) (69. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/virus-requests.html>).
70. Diagnostic testing for SARS-CoV-2 [Electronic resource]. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2> (accessed: 06.12.2022) (70. <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>).
71. Chan J.F.W. et al. // *J. Clin. Microbiol.* American Society for Microbiology. 2020. Vol. 58. N 5. P. e00310-20 (DOI: 10.1128/JCM.00310-20).
72. Chu D.K.W. et al. // *Clin. Chem.* Oxford Academic. 2020. Vol. 66. N 4. P. 549 (DOI: 10.1093/clinchem/hvaa029).
73. Lv D. feng et al. // *Clin. Chim. Acta.* Elsevier, 2020. Vol. 506. P. 172 (DOI: 10.1016/j.cca.2020.03.032).
74. Qiu H. et al. // *Lancet Infect. Dis.* Elsevier, 2020. Vol. 20. № 6. P. 689–696 (DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30198-5).
75. Sago C.D. et al. // *J. Mater. Chem. B.* The Royal Society of Chemistry, 2018. Vol. 6. № 44. P. 7197 (DOI: 10.1039/C8TB01642A).
76. Seo G. et al. // *ACS Nano.* NLM (Medline), 2020. Vol. 14. № 4. P. 5135 (DOI: 10.1021/acsnano.0c02823).
77. Wrapp D. et al. // *Science.* The American Association for the Advancement of Science. 2020. Vol. 367. N 6483. P. 1260 (DOI 10.1126/science.abb2507).
78. Benjamin D.C., Perdue S.S. // *Methods.* Academic Press. 1996. Vol. 9. N 3. P. 508 (DOI: 10.1006/meth.1996.0058).
79. Dougan D.A. et al. // *Protein Eng. Des. Sel.* Oxford Academic. 1998. Vol. 11. N 1. P. 65 (DOI: 10.1093/protein/11.1.65).
80. Gupta A.M., Chakrabarti J., Mandal S. // *Microbes Infect.* Elsevier Masson, 2020. Vol. 22. N 10. P. 598 (DOI: 10.1016/j.micinf.2020.10.004).
81. Korber B. et al. // *Cell.* Cell Press, 2020. Vol. 182. N 4. P. 812.e19 (DOI: 10.1016/j.cell.2020.06.043).
82. Gast M., Sobek H., Mizaikoff B. // *TrAC Trends Anal. Chem.* Elsevier, 2019. Vol. 114. P. 218 (DOI: 10.1016/j.trac.2019.03.010).
83. Parisi O.I. et al. // (Preprint). 2020. Vol. 120709. № bioRxiv. P. 07/05/21 (83. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.28.120709v1.full.pdf>).
84. Kosack C.S., Page A.-L., Klatser P.R. // *Bull World Heal. Organ.* 2017 (DOI: 10.2471/BLT.16.187468).
85. Tripathy S., Shiv A., Singh G. // *Trans. Indian Natl. Acad. Eng.* 2020 52. Springer, 2020. Vol. 5. N 2. P. 205 (DOI: 10.1007/s41403-020-00103-z).
86. de Eguilaz M.R., Cumba L.R., Forster R.J. // *Electrochem. commun.* Elsevier, 2020. Vol. 116. P. 106762 (DOI: 10.1016/j.elecom.2020.106762).
87. Pan Y. et al. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples // *Lancet Infect. Dis.* Elsevier, 2020. Vol. 20. N 4. P. 411 (DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30113-4).
88. Qiu G. et al. // *ACS Nano.* American Chemical Society, 2020. Vol. 14. N 5. P. 5268 (DOI: 10.1021/acsnano.0c02439).
89. Alafeef M. et al. // *ACS Nano.* American Chemical Society, 2020. Vol. 14. N 12. P. 17028 (DOI: 10.1021/acsnano.0c06392).
90. Song Z. et al. // *Anal. Chem.* American Chemical Society, 2021. Vol. 93. N 14. P. 5963 (DOI: 10.1021/acs.analchem.1c00724).
91. Chaibun T. et al. // *Nat. Commun.* 2021 121. Nature Publishing Group. 2021. Vol. 12. N 1. P. 1 (DOI: 10.1038/s41467-021-21121-7).
92. Fan Z. et al. // *Biosens. Bioelectron.* Elsevier, 2021. Vol. 178. P. 113015 (DOI: 10.1016/j.bios.2021.113015).
93. Peng Y. et al. // *Biosens. Bioelectron.* 2021. Vol. 186. P. 113309 (DOI: 10.1016/j.bios.2021.113309).
94. Zhao H. et al. // *Sensors Actuators B Chem.* 2021. Vol. 327. P. 128899 (DOI: 10.1016/j.snb.2020.128899).
95. Hashemi S.A. et al. // *Biosens. Bioelectron.* 2021. Vol. 171. P. 112731 (DOI: 10.1016/j.bios.2020.112731).
96. Yousefi H. et al. // *J. Am. Chem. Soc.* American

- Chemical Society. 2021. Vol. 143. N 4. P. 1722 (DOI: 10.1021/jacs.0c10810).
97. Idili A. et al. // ACS Sensors. American Chemical Society. 2021. Vol. 6. N 8. P. 3093 (DOI: 10.1021/acssensors.1c01222).
98. Yakoh A. et al. // Biosens. Bioelectron. 2021. Vol. 176. P. 112912 (DOI: 10.1016/j.bios.2020.112912).
99. Nascimento E.D. et al. // Sensors Actuators B Chem. 2022. Vol. 353. P. 131128 (DOI: 10.1016/j.snb.2021.131128).
100. Ayankojo A.G. et al. // Sensors Actuators B Chem. 2022. Vol. 353. P. 131160 (DOI: 10.1016/j.snb.2021.131160).
101. Mahari S. et al. // bioRxiv. Cold Spring Harbor Laboratory. 2020. P. 2020.04.24.059204 (101. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.24.059204v3>).
102. Mavrikou S. et al. // Sensors 2020. Vol. 20. Page 3121. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020. Vol. 20. N 11. P. 3121 (DOI: 10.3390/s20113121).
103. Kiew L.V. et al. // Biosens. Bioelectron. 2021. Vol. 183. P. 113213 (DOI: 10.1016/j.bios.2021.113213).
104. Vadlamani B.S. et al. // Sensors 2020. Vol. 20. P. 5871. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020. Vol. 20. N 20. P. 5871 (DOI: 10.3390/s20205871).
105. Mojsoska B. et al. // Sensors 2021. Vol. 21. P. 390. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. Vol. 21. N 2. P. 390 (DOI: 10.3390/s21020390).
106. Torres M.D.T. et al. // Matter. Cell Press, 2021. Vol. 4. N 7. P. 2403 (DOI: 10.1016/j.matt.2021.05.003).
107. de Lima L.F. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. National Academy of Sciences, 2021. Vol. 118. N 30. P. e2106724118 (DOI: 10.1073/pnas.2106724118).
108. Zaccariotto G.C. et al. // Mater. 2021. Vol. 14. P. 4230. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. Vol. 14. N 15. P. 4230 (DOI: 10.3390/ma14154230).
109. Abrego-Martinez J.C. et al. // Biosens. Bioelectron. 2022. Vol. 195. P. 113595 (DOI: 10.1016/j.bios.2021.113595).
110. Fabiani L. et al. // Biosens. Bioelectron. 2021. Vol. 171. P. 112686 (DOI: 10.1016/j.bios.2020.112686).
111. Eissa S., Zourob M. // Anal. Chem. American Chemical Society. 2021. Vol. 93. N 3. P. 1826 (DOI: 10.1021/acs.analchem.0c04719).
112. Haghayegh F. et al. // ACS Appl. Mater. Interfaces. American Chemical Society. 2022. Vol. 14. N 8. P. 10844 (DOI: 10.1021/acsami.1c24475).
113. Raziq A. et al. // Biosens. Bioelectron. 2021. Vol. 178. P. 113029 (DOI: 10.1016/j.bios.2021.113029).
114. Thanishaichelvan M. et al. // Mater. Today Proc. 2022. Vol. 49. P. 2546 (DOI: 10.1016/j.matpr.2021.05.011).
115. Ke G. et al. // Sci. China Mater. 2020 643. Springer, 2020. Vol. 64. N 3. P. 739 (DOI: 10.1007/s40843-020-1577-y).
116. Paulose A.K. et al. // Adv. Mater. Technol. John Wiley & Sons. Ltd. 2022. Vol. 7. N 1. P. 2100842 (DOI: 10.1002/admt.202100842).
117. Li J. et al. // Biosens. Bioelectron. 2021. Vol. 183. P. 113206 (DOI: 10.1016/j.bios.2021.113206).
118. Cui T.-R. et al. // Mol. 2021. Vol. 26. P. 6947. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. Vol. 26. N 22. P. 6947 (DOI: 10.3390/molecules26226947).
119. Zamzami M.A. et al. // Bioelectrochemistry. 2022. Vol. 143. P. 107982 (DOI: 10.1016/j.bioelechem.2021.107982).
120. Fathi-Hafshejani P. et al. // ACS Nano. American Chemical Society, 2021. Vol. 15. N 7. P. 11461 (DOI: 10.1021/acsnano.1c01188).
121. Piccinini E. et al. // Adv. Mater. Interfaces. John Wiley & Sons. Ltd. 2022. Vol. 9. N 15. P. 2102526 (DOI: 10.1002/admi.202102526).
122. Chen P.H. et al. // Sensors Actuators B Chem. 2022. Vol. 357. P. 131415 (DOI: 10.1016/j.snb.2022.131415).
123. Hwang M.T. et al. // Adv. Mater. Technol. John Wiley & Sons, Ltd, 2021. Vol. 6. N 11. P. 2100712 (DOI: 10.1002/admt.202100712).
124. Hwang M.T. et al. // Nat. Commun. 2020. 111. Nature Publishing Group. 2020. Vol. 11. N 1. P. 1 (DOI: 10.1038/s41467-020-15330-9).
125. Kumar S., Chauhan R.K., Kumar M. // Silicon 2022. Springer, 2022. P. 1 (DOI: 10.1007/s12633-022-01865-7).
126. Wasfi A. et al. // Nanomater. 2022. Vol. 12. P. 2638. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2022. Vol. 12. N 15. P. 2638 (DOI: 10.3390/nano12152638).
127. Singh P., Sohi P.A., Kahrizi M. // Phys. E Low-dimensional Syst. Nanostructures. North-Holland, 2022. Vol. 135. P. 114972 (DOI: 10.1016/j.physe.2021.114972).

Сведения об авторах

Андрианова Мария Сергеевна – науч. сотр. научно-исследовательской лаборатории интегральных биохимических наносенсоров научно-производственного комплекса «Технологический центр», канд. хим. наук (smariika1987@gmail.com);

Панова Ольга Сергеевна – инженер научно-исследовательской лаборатории интегральных биохимических наносенсоров научно-производственного комплекса «Технологический центр», бакалавр (panovaolya691@gmail.com);

Титов Алексей Александрович – вед. инженер научно-исследовательской лаборатории интегральных биохимических наносенсоров научно-производственного комплекса «Технологический центр», канд. биол. наук (alextitov2187@mail.com);

Комарова Наталья Владимировна – ст. науч. сотр. научно-исследовательской лаборатории интегральных биохимических наносенсоров научно-производственного комплекса «Технологический центр», канд. хим. наук (nat.v.kom@gmail.com);

Кузнецов Александр Евгеньевич – зав. научно-исследовательской лаборатории интегральных биохимических наносенсоров научно-производственного комплекса «Технологический центр», канд. хим. наук (kae@tcen.ru).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 05.01.2023;
одобрена после рецензирования 10.02.2023;
принята к публикации 15.02.2023.