



Концентрирование вирусов и электронная микроскопия

И.Д. Петрова , Б.Н. Зайцев, О.С. Таранов

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора Российской Федерации, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

 e-mail: idpetr@vector.nsc.ru

Аннотация. Почти все смертельные вирусные вспышки в последние два десятилетия были вызваны вновь появляющимися вирусами. Для изучения вирусов часто используют электронную микроскопию (ЭМ). Она позволяет получить новые данные о структуре вирусных частиц с высоким разрешением, что представляет интерес как для фундаментальной вирусологии, так и для практической фармацевтической нанобиотехнологии. Кроме того, ЭМ применяется в экологических исследованиях для определения наличия вирусов в окружающей среде, при анализе технологических процессов для производства вакцин и других биотехнологических компонентов, а также в диагностических целях. Несмотря на развитие более чувствительных методов, электронная микроскопия в диагностике остается рабочим методом. Главное преимущество ЭМ – отсутствие специфичности к какой-либо определенной группе вирусов, что способствует работе с неизвестным материалом. Однако основное ограничение метода – относительно высокий предел обнаружения (10^7 частиц/мл), в связи с чем необходимо концентрировать вирусный материал. Не существует какого-то одного наиболее эффективного метода. В зависимости от самого вируса и поставленной цели используются различные комбинации методов и подходов. В настоящее время концентрирование вируса включает операции осаждения, центрифугирования, фильтрации и хроматографии. В обзоре на примере разных вирусов описаны эти основные методы. Существует необходимость в разработке эффективных методик элюирования, которые могут нарушить связь между фильтрующими материалами и вирусами, чтобы повысить степень восстановления. Рассмотрены работы по созданию уникальных ловушек, магнитных шариков, композитных полианилиновых и углеродных нанотрубок и нанотрубок с изменяемым размером для концентрирования вирусных частиц. Приведен пример применения центрифужных концентраторов, в которых вирус осаждается на мембране из полиэфирсульфона. Проанализированные данные указывают на то, что способ концентрирования вирусов или других наночастиц выбирается в каждом конкретном случае в зависимости от поставленной цели и оснащённости лаборатории.

Ключевые слова: концентрирование вирусов; электронная микроскопия; очистка вирусов; выявление вирусов; обзор.

Для цитирования: Петрова И.Д., Зайцев Б.Н., Таранов О.С. Концентрирование вирусов и электронная микроскопия. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(3):276-283. DOI 10.18699/VJ20.620

Concentration of viruses and electron microscopy

I.D. Petrova , B.N. Zaitsev, O.S. Taranov

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

 e-mail: idpetr@vector.nsc.ru

Abstract. Nearly all lethal viral outbreaks in the past two decades were caused by newly emerging viruses. Viruses are often studied by electron microscopy, which provides new high-resolution data on the structure of viral particles relevant to both fundamental virology and practical pharmaceutical nanobiotechnology. Electron microscopy is also applied to ecological studies to detect viruses in the environment, to analysis of technological processes in the production of vaccines and other biotechnological components, and to diagnostics. Despite the advances in more sensitive methods, electron microscopy is still in active use for diagnostics. The main advantage of EM is the lack of specificity to any group of viruses, which allows working with unknown materials. However, the main limitation of the method is the relatively high detection limit (10^7 particles/mL), requiring viral material to be concentrated. There is no most effective universal method to concentrate viruses. Various combinations of methods and approaches are used depending on the virus and the goal. A modern virus concentration protocol involves precipitation, centrifugation, filtration, and chromatography. Here we describe the main concentrating techniques exemplified for different viruses. Effective elution techniques are required to disrupt the bonds between filter media and viruses in order to increase recovery. The paper reviews studies on unique traps, magnetic beads, and composite polyaniline and carbon nanotubes, including those of changeable size to concentrate viral particles. It also describes centrifugal concentrators to concentrate viruses on a polyethersulfone membrane. Our review suggests

that the method to concentrate viruses and other nanoparticles should be chosen with regard to objectives of the study and the equipment status of the laboratory.

Key words: virus concentration; electron microscopy; virus purification; virus detection; review.

For citation: Petrova I.D., Zaitsev B.N., Taranov O.S. Concentration of viruses and electron microscopy. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(3):276-283. DOI 10.18699/VJ20.620

Введение

Для изучения вирусов часто применяют электронную микроскопию (ЭМ). Этим методом можно определить размер и форму вириона, его локализацию в клетке, цитологические изменения клеток. Главное преимущество этого метода заключается в отсутствии специфичности к какой-либо определенной группе вирусов, в отличие от иммунологических или молекулярных тестов. В настоящее время развитие генно-инженерных исследований, использование широкого спектра псевдовиральных объектов при создании новых вакцинных препаратов значительно расширили перечень объектов и задачи электронно-микроскопических исследований. Для проведения ЭМ-исследования необходимо наличие достаточного количества вирусных частиц в образце. Ранее было показано (Reid et al., 2003), что для электронно-микроскопической визуализации концентрация вирионов должна быть не менее 10^7 шт./мл. Поэтому очень часто возникает необходимость очистки и концентрирования вирусного материала. Интересно, что для отработки самих методов концентрирования вирусов также необходима электронная микроскопия. В век нанотехнологий нельзя не упомянуть о том, что просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) используется для контроля производства наночастиц и их применения (Зайцев и др., 2016).

Наряду с классическим применением для изучения строения вирусов, процессов проникновения и распространения их в организме ЭМ используется также в прикладных исследованиях как минимум в трех разных областях: диагностической электронной микроскопии (ДЭМ), экологической электронной микроскопии (обнаружение вирусов в окружающей среде) и вопросах, связанных с технологическими процессами (производство вакцин, других компонентов), когда биотехнологическими методами нарабатывают продукт и необходимо убедиться в его вирусной чистоте.

Диагностическая электронная микроскопия

Несмотря на развитие более чувствительных методов, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР) или иммуноферментный анализ (ИФА), электронная микроскопия в диагностике остается рабочим методом (Goldsmith, Miller, 2009; Gentile, Gelderblom, 2014). Основное преимущество электронной микроскопии при диагностике инфекционных заболеваний – универсальность: в одном образце можно наблюдать «всё», без априорного знания вероятной идентичности микроорганизмов, присутствующих в образце (Hazelton, Gelderblom, 2003). Другое достоинство электронной микроскопии – высокая скорость процесса, который занимает 10–15 мин, а также большой диапазон размеров исследуемых объектов. Анализировать в ЭМ можно как жидкие, так и тканевые образцы, и никакой предварительной информации не требуется, как в случае

диагностики на основе нуклеиновых кислот (ПЦР) или антител (ИФА).

Главный недостаток ДЭМ – ограничение по концентрации вирионов в образцах. Для преодоления этого ограничения применяют разные приемы концентрирования: ультрацентрифугирование, ультрафильтрацию, исследование ультратонких срезов и др. В работе (Beniac et al., 2014) описывается метод концентрирования вирусов фильтрацией прямо на опорную ЭМ-сетку с углеродной дырочной подложкой Quantifoil R1/4 (Quantifoil Micro Tools GmbH, Großlobbichau, Германия). Такой прием вместе с использованием сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) позволяет улучшить порог обнаружения вирусов до концентрации 10^2 вирусов на мл.

Диагностическая электронная микроскопия – это ценный метод наблюдения за вновь возникающими заболеваниями и потенциальными агентами биотерроризма. Наконец, ультраструктурные исследования, проводимые с помощью электронной микроскопии, дают возможность детально исследовать морфогенез вирусов, вирус-клеточное взаимодействие и патогенетические аспекты вирусных инфекций, в том числе при разработке профилактических и лечебных препаратов.

Электронная микроскопия в экологических исследованиях

Использование ЭМ для экологических целей (определение наличия вирусов в окружающей среде) очевидно, но бывает достаточно редко. Чаще всего объектом изучения является загрязнение водных ресурсов, и объемы исследуемого материала практически безграничны. Одна из немногих работ по анализу морской воды описана в 1999 г. (Alonso et al., 1999). Процесс включал два этапа: концентрирование большого объема морской воды с помощью системы тангенциальной фильтрации потока и ультрафильтрации с применением центробежного концентратора с последующей визуализацией с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Те же методы были и в более поздней работе (Sun et al., 2014), в которой исследовали более 150 л морской воды из акватории порта Янган (Yangshan Deep-Water Port, юго-восток Шанхая, Китай). Однако ЭМ используется достаточно редко, для аналитической части предпочтительны более чувствительные методы, прежде всего ПЦР. Это связано с однородностью возможных объектов, которые обычно известны или предполагаются. На этапе обнаружения инфекционного агента ЭМ часто заменяется методом ПЦР.

Анализ биотехнологических процессов

Вакцины относятся к наиболее эффективным лекарственным средствам общественного здравоохранения с отличными показателями безопасности. Поскольку вакцины производятся на основе биологических материа-

лов, существует необходимость защиты от возможного загрязнения случайными агентами. Широко обсуждается необходимость контроля материалов, полученных при биотехнологических производствах (Sheets, 2013). Производство вирусных вакцин и других клеточных биофармацевтических препаратов представляет собой сложный технологический процесс, включающий использование разных биологических материалов (например, различных клеточных субстратов, таких как куриные яйца с эмбрионом, первичные клеточные культуры и непрерывные клеточные линии). Весь процесс потенциально уязвим к загрязнению случайными агентами, которые могут непреднамеренно вводиться с используемыми материалами или из источников окружающей среды. Примером таких исследований служит работа (Reid et al., 2003), в которой сравнивается три метода оценки ретровирусного загрязнения в супернатантах культур мышинных и СНО клеточных линий: прямой подсчет вирионов в смеси с латексом (предел использования 10^7 шт./мл), центрирование ультрацентрифугированием в прерывистом градиенте плотности сахарозы и ЭМ (10^5 шт./мл) и метод тонкого среза гомогенной матрицы из вирусных частиц, клеточного дебриса и агара (чувствительность 10^5 шт./мл). Очевидна недостаточность рутинной ЭМ для регистрации вирусного загрязнения.

В различных областях биотехнологии: разработке вакцин и адъювантов, создании биологически активных комплексов, разработке контрастирующих агентов, адресной доставке, микроэлектронике – используются вирусоподобные частицы, которые исследуются ЭМ. Так, получение сферических частиц (СЧ) из вируса табачной мозаики контролировалось с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Показано, что СЧ можно визуализировать без контрастирующих агентов с помощью ПЭМ (Трифонов и др., 2015).

Методы концентрирования вирусов

Не существует какого-то одного наиболее эффективного метода концентрирования вируса. В зависимости от самого вируса и поставленной цели применяются различные комбинации методов и подходов. В настоящее время концентрирование вируса включает операции осаждения, центрифугирования, фильтрации и хроматографии (Transfiguracion et al., 2007; Vicente et al., 2011).

Осаждение

Осаждение вируса обычно достигается с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ), сульфата аммония или фосфата кальция. Преципитация удобна для получения вирусов как в малых, так и больших количествах и обладает тем преимуществом, что обеспечивает отделение вируса от большей части посторонних белков. Так, для концентрирования и очистки вируса гриппа птиц типа А (10 различных штаммов) из вирусосодержащих суспензий был успешно применен широко используемый метод осаждения и очистки вируса гриппа с помощью ПЭГ-6000 с последующим ультрацентрифугированием и осветлением (Исмагамбетов и др., 2017). Еще в одной работе (Рябинникова и др., 2015) представлены данные по очистке и концентрированию вируса ринопневмонии лошадей (РПЛ) с

применением различных методов. Установлено, что концентрирование вируса РПЛ с использованием ПЭГ-6000 и добавлением 0.5 М хлорида натрия с последующей очисткой методом диализа позволяет получать концентрат с высокой инфекционной и антигенной активностью. Показано, что метод адсорбции в присутствии ПЭГ давал препараты вируса, которые можно было использовать для приготовления инактивированной вакцины против РПЛ.

Для концентрирования вируса ящура и энтеровируса свиней (7-го серотипа) методом осаждения установлено, что полиэтиленполиамин (ПЭПА) с массой 16000 Д более подходит, нежели ПЭГ-6000 (Бахуташвили и др., 2002). Выявлено, что наиболее полное осаждение вируса ящура происходит при 0.1 и 0.2 % концентрации ПЭПА. Потери вируса в этом случае составили 0.74 и 0.11 % соответственно. Показано, что вакцины, приготовленные из препаратов, полученных осаждением двумя способами, различаются по эффективности. Предпочтительно применять ПЭПА, так как в этом случае вакцина в три раза эффективнее.

Центрифугирование и градиент плотности

Центрифугирование – это простой в применении метод крупномасштабного разделения, основанный на различиях в плотности. Из-за малых размеров вирусных частиц требуются высокая скорость и сильная центробежная сила, которые могут сделать частицы неинфекционными (Bugova, Loffe, 2005). Альтернативным механизмом является центрифугирование в градиенте плотности сахарозы, хлорида цезия (CsCl) или йодиксанола. В случае с сахарозой раствор очень вязкий и гиперосмотический. Градиент плотности йодиксанола представляет собой низковязкую систему, которая может образовывать изосмотический раствор и поддерживать функциональность вируса (Gias et al., 2008). При применении градиента йодиксанола (Segura et al., 2006) показаны извлечение ретровируса 37 % и многообещающая чистота 95 %. Для выделения вируса гриппа лошадей из вирусосодержащей аллантоисной жидкости применяли ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы и ионообменную хроматографию на ДЕАЕ-целлюлозе (Тайлакова и др., 2011). Определено, что полная адсорбция вируса на ионообменник проходит в буферном растворе с pH 7.0, а для элюирования необходим буфер, содержащий 0.5 М раствор хлористого натрия с pH 7.4. В результате получены препараты вируса со степенью очистки от балластных белков 98 %.

Фильтрация

Для концентрирования энтеровирусов из воды различных водных объектов разработан унифицированный метод мембранной фильтрации в режиме микрофильтрации (МФ) на модуле МФМ 0142 в комплекте с мембраной ММК1 (Санамян и др., 2006). Установлены высокая эффективность для концентрирования энтеровирусов из воды разной степени загрязнения (питьевой, подземной, речной и сточной в пределах нормируемых объемов) и сокращение времени концентрирования до 42 мин. Наиболее эффективной из исследуемых мембран была фильтрующая мембрана, типа ММК (микропористая мембрана капроновая), модифицированная 0.5 % соединениями

аминов. При изучении механизма концентрирования человеческого аденовируса 2 (HAdV-2) (Lu et al., 2016) использовали микрофильтрационные мембраны из полых волокон ($d = 0.2$ мкм) в зависимости от концентрации вируса в диапазоне от 1.3×10^7 до 3.4×10^8 копий/мл.

Для оптимизации извлечения вируса гепатита А из воды были исследованы мембраны на основе полиамида, нитрата целлюлозы, ацетата целлюлозы и полиэфирсульфона (Залесских, Быстрова, 2018). В качестве префильтров были стекловолокно, картон и полипропилен. Показано, что наиболее эффективной комбинацией мембран для фильтрации воды с большим количеством примесей являются картонные либо полипропиленовые фильтры для предварительной фильтрации и полиамидный фильтр – для основного этапа. Фильтрацию проб проводили на аппарате напорной фильтрации (АФ-142К, «Владисарт», Владимир) при прохождении воды объемом до 10 л под давлением 2 атм.

Для эпиднадзора за кишечными вирусами человека необходимо концентрирование вируса из сточных вод. Для этого обычно обрабатываются большие объемы (100–1000 л) воды. Наиболее часто использовали метод VIRADEL с применением микропористых фильтров. Положительно заряженные фильтры не требуют предварительной подготовки образцов и способны концентрировать вирусы из воды в более широком диапазоне рН, чем электроотрицательные фильтры. Связано это с тем, что вирусная поверхность обычно заряжена отрицательно. Широко используется электроположительный фильтр ViroSorb 1MDS. В последнее время к нему добавили положительно заряженные фильтры NanoCeram (Soto-Beltran et al., 2013). Элюирование вирусов из фильтров после концентрирования осуществляли с помощью органических (экстракт говядины) или неорганических растворов (полифосфаты натрия). Затем элюаты повторно концентрировали для уменьшения объема образца и улучшения обнаружения вируса. Большинство фильтров продемонстрировало высокую эффективность удержания вируса, а методы элюирования и повторного концентрирования вирусов имели разную степень успеха из-за биологической изменчивости вирусов, присутствующих в воде (Ikner et al., 2012).

Для фильтрации растворов белков плазмы, производства продуктов плазмы и широкого спектра биофармацевтических продуктов была применена нанофильтрация (НФ). Мембраны НФ, в зависимости от используемого материала, делятся на две основные группы: керамические и полимерные. Привлекли к себе внимание гибридные мембраны НФ из-за хороших результатов фильтрации в неоптимальных условиях. В качестве верхнего слоя в гибридных мембранах испытывали различные полимеры, такие как полиэфирсульфон (Maximous et al., 2009), полидиметилсилоксан (Yousefi et al., 2017), поливинилпирролидон (Dong et al., 2013) и полисульфон (Ghaee et al., 2017). Использование полимеров для получения гибридных мембран НФ дает возможность изменять размер пор, химические и зарядные свойства поверхностей мембран. Нанофильтрация все чаще становится обычным этапом в фармацевтическом производстве, поскольку не вызывает проблем с токсичностью (Doodeji, Zerafat, 2018). Одним

из основных этапов производства вакцины является получение очищенного вирусного концентрата. Для концентрирования вируса гриппа и удаления низкомолекулярных примесей лучше всего подходит полиэфирсульфоновая мембрана 300 кД в сочетании со слабым раствором анионного детергента (Кызин и др., 2014).

Проведены исследования методов элюирования и повторного концентрирования вирусов (Falman et al., 2019). Сточные воды первично концентрировали с помощью картриджных фильтров ViroCap, а затем – с использованием говяжьего экстракта Celite, плоского дискового фильтра ViroCap, концентрирующих пипеток InnovaPrep, осаждения ПЭГ/NaCl и флокуляции обезжиренным молоком. В экспериментах с полиовирусом типа 1 (ПВ 1) из пяти протестированных методов самыми эффективными были осаждение ПЭГ/NaCl и флокуляция обезжиренным молоком. Оптимизация метода флокуляции обезжиренным молоком привела к большему извлечению ПВ 1, по сравнению с осаждением ПЭГ/NaCl, почти в два раза.

Фильтрация в тангенциальном потоке – широко используемая методика фильтрации по размеру (Wickramasinghe et al., 2005). На примере вируса гриппа был апробирован двустадийный процесс для очистки и концентрирования вирусных частиц.

Хроматография

Хроматография – это метод разделения, основанный на взаимодействии между целевым вирусом и матрицей колонки. Функциональность разделения в целом зависит от заряда, размера, гидрофобности и средства.

Метод ионообменной хроматографии заключается в использовании явления ионного обмена между неподвижной твердой и подвижной жидкой фазами. Он позволяет разделять вирусные частицы схожей структуры и морфологии при условии, что они имеют различный суммарный заряд и/или распределение заряда на своих внешних поверхностях (Rušćić et al., 2015). Для смывания вируса необходимы различные концентрации соли, что может применяться к любой смешанной инфекции, если вирусы имеют разные изоэлектрические точки. А. Ali и M.J. Roossinck (2008) сообщили о простой методике разделения и концентрирования при смешанной инфекции вируса хлорового пигмента вигны и вируса мозаики огурца.

Монолитные носители позволили применять хроматографию для очистки и концентрирования различных вирусов (Svec et al., 2011; Krajačić et al., 2017). В отличие от классических хроматографических носителей, где массоперенос основан на диффузии, а поры относительно малы, монолиты характеризуются массопереносом, значительно усиленным конвекцией, а каналы имеют размеры несколько микрон. I. Gutiérrez-Aguirre с коллегами (2009) показали, что подложки CIM QA эффективно связывали ротавирусы, присутствующие в пробах стула, а также в пробах водопроводной и речной воды. Концентрирование ротавирусов достигалось путем элюции связанных вирусов 1 М раствором NaCl. Полученные вирусы сохраняли свою целостность, что подтверждалось с помощью ЭМ.

Эксклюзионная хроматография (или гель-фильтрация в случае водной жидкой фазы) – это жидкостная хроматография, основанная на различной способности молекул

разного размера проникать в поры неионогенного геля, который служит неподвижной фазой. В этом методе разделения использовали плотно упакованную матрицу из силикагеля или агарозного геля (Barth et al., 1994). Главными преимуществами этого метода были низкая стоимость смол и простота в эксплуатации. Тем не менее методика страдает от отсутствия избирательности, требует работы с низкой скоростью потока, а также имеет низкую производительность. На примере вируса клещевого энцефалита отработан метод гель-фильтрации на колонке Superdex 200 (Havlik et al., 2014). Полученные образцы были исследованы: 1) иммунологически (дот-блот) для проверки биологической активности, 2) с помощью газофазного макромолекулярного анализатора GEMMA для определения размера частиц и 3) с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) и просвечивающей электронной микроскопии для получения информации о размере и форме вирусных частиц. Средний диаметр инактивированных вирионов клещевого энцефалита, определенный с помощью измерения GEMMA, составлял 46.6 ± 0.5 нм, в отличие от изображений АСМ и ПЭМ, показывающих диаметры около 58 ± 4 и 52 ± 5 нм соответственно.

Хроматография гидрофобного взаимодействия основана на адсорбции частиц на слабо гидрофобной поверхности при высоких концентрациях соли с последующим элюированием с нисходящим градиентом соли. На поверхности вирусов присутствуют гидрофобные области, которые связываются с иммобилизованными гидрофобными лигандами на хроматографических носителях (Roettger et al., 1989). Недостаток этого метода показан на примере аденовируса (Schagen et al., 2000). Установлено, что большая концентрация соли может не только снижать иммуногенность вируса, но и способствовать агрегированию вирусных частиц.

При концентрировании вируса путем его связывания биоаффинным сорбентом использовали криогель поливинилового спирта с размером пор 0.04–2.0 мкм (Лозинский и др., 2013). Применение этого сорбента апробировано на примере концентрирования вируса гриппа типа А H1N1 и H3N2, вируса парагриппа ГП₆, вируса оспы и вируса ящура. Биоаффинный сорбент на основе вязкоупругого нехрупкого и гидролитически стабильного криогеля поливинилового спирта позволяет проводить концентрирование вируса не только в хроматографическом (колоночном) варианте, но и в реакторах с перемешиванием сорбента, что существенно интенсифицирует массообменные процессы. Достоинство этого метода и в том, что обеспечивается возможность концентрирования наряду с мелкими даже самых крупных вирусов (0.5 мкм и более). Кроме того, биоаффинный сорбент может, согласно этому изобретению, содержать одновременно с антителами иммобилизованные ферменты, модифицирующие вирус.

Другие методы

Для мониторинга открытых водных объектов на наличие вируса гриппа была создана специальная установка (Левченко и др., 2007). Использовали магнимоносорбенты, матрицей которых является твердая магнитная основа с иммобилизованными антителами.

Исследована сорбция вирусов гриппа на полианилиновые (ПАНИ) и углеродные нанотрубки (УНТ), а также на композиты – ПАНИ (нанотрубки и гранулы) с добавлением серебра и без него (Иванова и др., 2015). Установлено повышение сорбционной способности ПАНИ-трубок при включении в них серебра в случае аллантаоисных вирусов гриппа А. По совокупности свойств наиболее перспективный материал для сорбции вирусов в водных растворах – композиты ПАНИ-нанотрубок с содержанием серебра 30 %.

На примере вируса гепатита А (ВГА) сравнивали различные связывающие углеводы лектины, включая конканавалин А (Con A), агглютинин зародышей пшеницы и агглютинин сои, по их средству связывания с вирусом (Ko et al., 2018). Con A показал более высокую аффинность связывания по сравнению с другими лектинами. Con A-связанное иммуномагнитное разделение в сочетании с ОТ-ПЦР позволяло обнаруживать ВГА при разбавлении 10^{-4} от исходной концентрации вируса (титр равен 10^4 инфекционным дозам для культуры клеток на мл). Это указывает на то, что Con A может быть перспективным кандидатом для концентрирования ВГА.

В нескольких исследованиях (Flavigny et al., 2004; Sakudo et al., 2009b) показано, что магнитные шарики, покрытые таким анионным полимером, как полиметилвиниловый эфир малеинового ангидрида, могут быть использованы для эффективного захвата различных типов вируса. К ним относятся вирус иммунодефицита человека типа 1 (Sakudo, Ikuta, 2012), респираторно-синцитиальный вирус (Sakudo et al., 2009a), вирус болезни Борна (Sakudo et al., 2011b), вирус гриппа (Sakudo et al., 2008) и вирус лихорадки денге (Sakudo et al., 2011a). В дальнейшем этот метод применили и к аденовирусу (Sakudo et al., 2016).

Японские ученые (Mogi et al., 2016) разрабатывали новый метод концентрирования вируса. Они предложили и экспериментально продемонстрировали устройство для концентрирования вируса с использованием зоны истощения ионов, создаваемой поляризацией ионов. Эффективность оценивали с применением флуоресцентных наночастиц, бакуловируса, альбумина и декстрана. В результате все образцы были успешно сконцентрированы предлагаемым способом.

Новая стратегия концентрирования вируса разработана с использованием экспрессии гена человеческого рецептора полиовируса (hPVR) на поверхности клеток *Escherichia coli* (Abbaszadegan et al., 2011). Способность модифицированных бактериальных клеток захватывать вирусные частицы подтверждали с помощью ПЭМ. Такой подход открывает новую перспективу для эффективного захвата и концентрирования переносимых водой вирусов.

При работе с полевыми образцами создавали уникальные микроустройства углеродных нанотрубок с изменяемым размером (УНТ-STEM), которые эффективно обогачали и концентрировали вирусы (Yeh et al., 2016). Межтрубное расстояние между УНТ можно было устанавливать в диапазоне от 17 до 325 нм, чтобы точно соответствовать размеру различных вирусов. Благодаря этому устройству авторы успешно определили два новых штамма.

В недавно опубликованной статье (Зайцев и др., 2019) описано использование центрифужного концентратора Vivaspin. Концентрирование вирусных частиц происходит на двойной вертикальной мембране из полиэфирсульфона. После центрифугирования мембрану извлекали из концентратора и оценивали количество осажденных на мембране частиц с помощью электронного микроскопа, применяя метод ультратонких срезов.

Заключение

При выборе метода концентрирования вирусов большое значение имеет цель, которую хотят достигнуть исследователи. Экологические, фармацевтические и медицинские задачи требуют разных подходов. При изучении загрязнения воды для получения результата через фильтры прогоняются сотни литров воды из определенной акватории, после этого происходит отбор вирусного материала, оседающего на поверхности и в объеме заряженных фильтров. Затем чаще всего следует второй этап с применением других фильтров с калиброванными порами (Тарасов и др., 2012). В последнее время достигнут определенный успех в разработке материалов для мембран фильтрации. Однако извлечение вирусов с поверхности и объема мембран еще далеко не полное.

Для улучшения технологии концентрирования вирусов следует сосредоточить внимание на поверхностных взаимодействиях между вирусами и фильтрующими материалами. В частности, существует необходимость в разработке эффективных методик элюирования, которые могут нарушить связь между фильтрующими материалами и вирусами, чтобы повысить степень восстановления. При диагностических исследованиях для конкретного пациента объем материала ограничен несколькими миллилитрами. Во многих случаях, особенно при смешанной инфекции, одним из самых надежных критериев обнаружения вируса является электронная микроскопия. Конечно, изготовление ультратонких срезов доступно только хорошо оснащенным ЭМ-лабораториям, для которых ЭМ-диагностика вирусной инфекции – обычная работа.

Список литературы / References

- Бахуташвили Т.О., Гусев А.А., Дудников А.И., Михалишин В.В., Шипилов В.И. Способ концентрирования вирусов. Патент РФ № 1834289, 2002.
[Bakhtashvili T.O., Gusev A.A., Dudnikov A.I., Mikhailishin V.V., Shipilov V.I. A Method for Concentrating Viruses. Patent RF № 1834289, 2002. (in Russian)]
- Зайцев Б.Н., Таранов О.С., Рудометова Н.Б., Щербактова Н.С., Ильичев А.А., Карпенко Л.И. Оптимизированный метод подсчета количества вирусных частиц с помощью электронной микроскопии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019; 23(3):237-242. DOI 10.18699/VJ19.498.
[Zaitsev B.N., Taranov O.S., Rudometova N.B., Shcherbakova N.S., Il'ichev A.A., Karpenko L.I. Optimized method for counting viral particles using electron microscopy. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(3): 237-242. DOI 10.18699/VJ19.498. (in Russian)]
- Зайцев В.П., Золотых Д.С., Леонова В.Д., Ларская К.С., Крат И.П., Оробинская В.Н., Коновалов Д.А. Наночастицы: методы получения, анализа, активность, токсичность. Современ. наука и инновации. 2016;3(15):197-218.

- [Zaitsev V.P., Zolotykh D.S., Leonova V.D., Larskaya K.S., Krat I.P., Orobinskaya V.N., Kononov D.A. Nanoparticles: methods for production and analysis, activity, and toxicity. *Sovremennaya Nauka i Innovatsii = Modern Science and Innovation*. 2016;3(15):197-218. (in Russian)]
- Залесских А.А., Быстрова Т.Н. Совершенствование системы эпидемиологического надзора за гепатитом А на основе оптимизации вирусологического и серологического мониторинга. Медицинский альманах. 2018;4(55):70-74. DOI 10.21145/2499-9954-2018-4-70-74.
[Zallesskih A.A., Bystrova T.N. Improvement of the hepatitis A epidemiological surveillance system based on the optimization of virological and serological monitoring. *Meditsinskiy Al'manakh = Medical Almanac*. 2018;4(55):70-74. DOI 10.21145/2499-9954-2018-4-70-74. (in Russian)]
- Иванова В.Т., Иванова М.В., Сапурина И.Ю., Бурцева Е.И., Трушаква С.В., Исаева Е.И., Кириллова Е.С., Степанова Н.В., Оскерко Т.А. Сравнительное исследование углеродных нанотрубок и полимерных композитов, содержащих наночастицы серебра, в качестве сорбентов вирусов гриппа А и В. *Вопр. вирусологии*. 2015;60(3):25-30.
[Ivanova V.T., Ivanova M.V., Sapurina I.Yu., Burtseva E.I., Trushakova S.V., Isaeva E.I., Kirillova E.S., Stepanova N.V., Oskerko T.A. A comparative study of carbon nanotubes and polymer composites containing silver nanoparticles as sorbents of influenza viruses A and B. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology*. 2015;60(3): 25-30. (in Russian)]
- Исмагамбетов Б.М., Кошметов Ж.К., Богданова М.И., Наханова Г.Д., Нурабаев С.Ш., Сейсенбаева М.С., Сансызбай А.Р., Касенов М.М. Получение диагностических препаратов к подтипам вируса гриппа типа А. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. Сер. Биол. науки*. 2017;10:260-264.
[Ismagambetov B.M., Koshemetov Zh.K., Bogdanova M.I., Nakhanova G.D., Nurabaev S.Sh., Seysenbaeva M.S., Sansyzbai A.R., Kasenov M.M. Design of diagnostic products for influenza A subtypes. *Mezhdunarodnyy Zhurnal Prikladnykh i Fundamental'nykh Issledovaniy. Seriya Biologicheskie Nauki = International Journal of Applied and Fundamental Research. Biological Series*. 2017;10: 260-264. (in Russian)]
- Кызын А.А., Загидуллин Н.В., Гелич Л.В., Тимербаева Р.Х., Исрафилов А.Г. Очистка и концентрирование вируса гриппа методом микро- и ультрафильтрации. *Вестн. Башкир. ун-та*. 2014;19(4): 1223-1227.
[Kyzin A.A., Zagidullin N.V., Gelich L.V., Timerbaeva R.H., Israfilov A.G. Purification and concentration of influenza virus by micro- and ultrafiltration. *Vestnik Bashkirskogo Universiteta = Bulletin of Bashkir University*. 2014;19(4):1223-1227. (in Russian)]
- Левченко И.В., Ефременко В.И., Львов Д.К., Жарникова И.В., Дерябин П.Г., Василенко Н.Ф., Исаева Е.И., Ботиков А.В. Разработка магнитоиммосорбентных тест-систем и установка для селективного концентрирования для выявления вирусов гриппа птиц. *Матер. IX съезда Всерос. науч.-практ. об-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. М.*, 2007;1:248-249.
[Levchenko I.V., Efremenko V.I., L'vov D.K., Zharnikova I.V., Deryabin P.G., Vasilenko N.F., Isaeva E.I., Botikov A.V. Development of magneto-immunosorbent test systems and a device for selective concentration for the detection of avian influenza viruses. *Proceedings of the 9th Congress of the All-Russia Research and Practical Society of Epidemiologists, Microbiologists, and Parasitologists. Moscow*, 2007;1:248-249. (in Russian)]
- Лозинский В.И., Плиева Ф.М., Исаева Е.И., Зубов А.Л. Способ концентрирования вируса. Патент. 2013. <http://www.findpatent.ru/patent/213/2130069.html>.
[Lozinskiy V.I., Plieva F.M., Isaeva E.I., Zubov A.L. A Method of Concentrating Virus. Patent. 2013. Available at: <http://www.findpatent.ru/patent/213/2130069.html>. (in Russian)]

- Рябинникова А.И., Матраимов М.Б., Шалгынбаев Э.К., Рыстаева Р.А., Орынбаев М.Б. Очистка и концентрирование вируса риноневмонии лошадей. Наука, новые технологии и инновации Кыргызстана. 2015;4:129-131.
[Ryabinnikova A.I., Matraimov M.B., Shalgynbaev E.K., Rystaeva R.A., Orynbaev M.B. Purification and concentration of horses rhinopneumonia virus. Nauka, Novye Tekhnologii i Innovatsii Kyrgyzstana = Science, New Technologies, and Innovations in Kyrgyzstan. 2015;4:129-131. (in Russian)]
- Санамян А.Г., Дмитриева Р.А., Доскина Т.В., Лаврова Д.В., Недачин А.Е. Использование мембранного модуля МФМ 0142 для концентрации вирусов при санитарно-вирусологическом контроле водных объектов. Гигиена и санитария. 2006;6:74-76.
[Sanamyun A.G., Dmitrieva R.A., Doskina T.V., Lavrova D.V., Nedachin A.E. Use of a membrane module MPM 0142 for the concentration of viruses in the sanitary-virological surveillance of water objects. Gigiena i Sanitariya = Hygiene and Sanitation. 2006;6:74-76. (in Russian)]
- Тайлакова Э.Т., Червякова О.В., Садикалиева С.О., Султанкулова К.Т., Зайцев В.Л., Турганбаева А.С., Сансызбай А.Р. Оптимизация условий очистки и концентрирования вируса гриппа лошадей. Вестн. науки КазАТУ им. С. Сейфуллина. 2011;4(71):14-23.
[Taylakova E.T., Chervyakova O.V., Sadikalieva S.O., Sultankulova K.T., Zaitsev V.L., Turganbaeva A.S., Sansyzbay A.R. Optimization of conditions for purification and concentration of equine influenza virus. Vestnik Nauki KazATU imeni S. Seifullina = Herald of Science of the Seifullin Kazakh AgroTechnical University. 2011;4(71):14-23. (in Russian)]
- Тарасов А.В., Федотов Ю.А., Лепешин С.А., Панов Ю.Т., Окулов К.В., Вдовина А.И. Применение мембран с положительным поверхностным зарядом для санитарно-вирусологического контроля воды. Изв. Самар. науч. центра РАН. 2012;14(1-9):2372-2376.
[Tarasov A.V., Fedotov Yu.A., Lepeshin S.A., Panov Yu.T., Okulov K.V., Vdovina A.I. The use of membranes with a positive surface charge for sanitary and virological control of water. Izvestiya Samarskogo Nauchnogo Tsentra Rossiyskoy Akademii Nauk = Proceedings of the Samara Research Center of the Russian Academy of Sciences. 2012;14(1-9):2372-2376. (in Russian)]
- Трифоновна Е.А., Никитин Н.А., Кирпичников М.П., Карпова О.В., Атабеков И.Г. Способ получения и характеристика сферических частиц – новых биогенных платформ. Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2015;4:46-50.
[Trifonova E.A., Nikitin N.A., Kirpichnikov M.P., Karpova O.V., Atabekov I.G. A method of production and characterization of spherical particles, new biogenic platforms. Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seriya 16. Biology = Moscow University Bulletin. Series 16. Biology. 2015;4:46-50. (in Russian)]
- Abbaszadegan M., Alum A., Abbaszadegan H., Stout V. Cell surface display of poliovirus receptor on *Escherichia coli*, a novel method for concentrating viral particles in water. Appl. Environ. Microbiol. 2011;77(15):5141-5148.
- Ali A., Roossinck M.J. A simple technique for separation of *Cowpea chlorotic mottle virus* from *Cucumber mosaic virus* in natural mixed infections. J. Virol. Methods. 2008;153:163-167.
- Alonso M.C., Rodriguez J., Borrego J.J. Enumeration and isolation of viral particles from oligotrophic marine environments by tangential flow filtration. Int. Microbiol. 1999;2(4):227-232.
- Barth H.G., Jackson C., Boyes B.E. Size exclusion chromatography. Anal. Chem. 1994;66(12):595-620.
- Beniac D.R., Siemens C.G., Wright C.J., Booth T.F. A filtration based technique for simultaneous SEM and TEM sample preparation for the rapid detection of pathogens. Viruses. 2014;6:3458-3471. DOI 10.3390/v6093458.
- Burova E., Loffe E. Chromatographic purification of recombinant adenoviral and adeno-associated viral vectors: methods and implications. Gene Ther. 2005;12:5-17.
- Dong H., Xiao K., Li X., Ren Y., Guo S. Preparation of PVDF/Al₂O₃ hybrid membrane via the sol-gel process and characterization of the hybrid membrane. Desalin. Water Treat. 2013;51(19-21):3685-3690.
- Doodeji M.S., Zerafat M.M. A review on the applications of nano filtration in virus removal and pharmaceutical industries. Glob. J. Nanomed. 2018;3(5):555624. DOI 10.19080/GJN.2018.03.555624.
- Falman J.C., Fagnant-Sperati C.S., Kossik A.L., Boyle D.S., Meschke J.S. Evaluation of secondary concentration methods for poliovirus detection in wastewater. Food Environ. Virol. 2019;11(1):20-31.
- Flavigny E., Gaboyard M., Merel P., Fleury H. Magnetic particle-mediated virus concentration for clinical virology. In: 104th General Meeting of the American Society for Microbiology, New Orleans, American Society for Microbiology. May 22-27, 2004. Washington, DC, 2004.
- Gentile M., Gelderblom H.R. Electron microscopy in rapid viral diagnosis: an update. New Microbiol. 2014;37:403-422.
- Ghaee A., Zerafat M.M., Askari P., Sabbaghi S., Sadatnia B. Fabrication of polyamide thin-film nanocomposite membranes with enhanced surface charge for nitrate ion removal from water resources. Environ. Technol. 2017;38(6):772-781.
- Gias E., Nielsen S.U., Morgan L.A.F., Toms G.L. Purification of human respiratory syncytial virus by ultracentrifugation in iodixanol density gradient. J. Virol. Methods. 2008;147(2):328-332.
- Goldsmith C.S., Miller S.E. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. Clin. Microbiol. Rev. 2009;552-563.
- Gutiérrez-Aguirre I., Banjac M., Steyer A., Poljsak-Prijatelj M., Peterka M., Strancar A., Ravnikar M. Concentrating rotaviruses from water samples using monolithic chromatographic supports. J. Chromatogr. 2009;1216(13):2700-2704.
- Havlik M., Marchetti-Deschmann M., Friedbacher G., Messner P., Winkler W., Perez-Burgos L., Tauer C., Allmaier C. Development of a bio-analytical strategy for characterization of vaccine particles combining SEC and nanoES GEMMA. Analyst. 2014;139(6):1412-1419.
- Hazelton P.R., Gelderblom H.R. Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. Emerg. Infect. Dis. 2003;9:294-303.
- Ikner L.A., Gerba C., Bright K. Concentration and recovery of viruses from water: a comprehensive review. Food Environ. Virol. 2012;4(2):41-67.
- Ko S.-M., Cho S.-Y., Oh M.-J., Vaidya B., Kim D. Application of concanavalin A-linked magnetic beads for the detection of hepatitis A virus. J. Food Prot. 2018;81(12):1997-2002.
- Krajacic M., Ravnikar M., Strancar A., Gutiérrez-Aguirre I. Application of monolithic chromatographic supports in virus research. Electrophoresis. 2017;38:22-23.
- Lu R., Li Q., Yin Z., Xagorarakis I., Tarabara V., Nguyen T. Effect of virus influent concentration on its removal by microfiltration: The case of human adenovirus 2. J. Membr. Sci. 2016;497:120-127.
- Maximous N., Nakhla G., Wan W., Wong K. Preparation, characterization and performance of Al₂O₃/PES membrane for wastewater filtration. J. Membr. Sci. 2009;341(1-2):67-75.
- Mogi K., Hayashida K., Honda A., Yamamoto T. Development of virus concentration device by controlling ion depletion zone for ultrasensitive virus sensing. Trans. Sens. Micromachines. 2016;136(9):363-369.
- Reid G.G., Milne E.W., Coggins L.W., Wilson N.J., Smith K.T., Shepherd A.J. Comparison of electron microscopic techniques for enumeration of endogenous retrovirus in mouse and Chinese hamster cell line used for production of biologics. J. Virol. Methods. 2003;108:91-96.
- Roettger B.F., Myers J.A., Ladisch M.R., Regnier F.E. Adsorption phenomena in hydrophobic interaction chromatography. Biotechnol. Prog. 1989;5(3):79-88.
- Ruščić J., Gutiérrez-Aguirre I., Žnidarič M.T., Kolundžija S., Slana A., Barut M., Ravnikar M., Krajačić M. A new application of monolithic supports: The separation of viruses from one another. J. Chromatogr. A. 2015;1388:69-78.

- Sakudo A., Baba K., Ikuta K. Capturing and concentrating adenovirus using magnetic anionic nanobeads. *Int. J. Nanomedicine*. 2016;11:1847-1857.
- Sakudo A., Baba K., Tsukamoto M., Ikuta K. Use of anionic polymer, poly(methyl vinyl ether-maleic anhydride)-coated beads for capture of respiratory syncytial virus. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009a;19(15):4488-4491.
- Sakudo A., Baba K., Tsukamoto M., Sugimoto A., Okada T., Kobayashi T., Kawashita N., Takagi T., Ikuta K. Anionic polymer, poly(methyl vinyl ether-maleic anhydride)-coated beads-based capture of human influenza A and B virus. *Bioorg. Med. Chem.* 2009b;17(2):752-757.
- Sakudo A., Ikuta K. Efficient capture of infectious H5 avian influenza virus utilizing magnetic beads coated with anionic polymer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;377(1):85-88.
- Sakudo A., Ikuta K. A technique for capturing broad subtypes and circulating recombinant forms of HIV-1 based on anionic polymer-coated magnetic beads. *Int. J. Mol. Med.* 2012;30(2):437-442.
- Sakudo A., Masrinoul P., Tanaka Y., Ikuta K. Capture of dengue virus type 3 using anionic polymer-coated magnetic beads. *Int. J. Mol. Med.* 2011a;28(4):625-628.
- Sakudo A., Tanaka Y., Ikuta K. Capture of infectious borna disease virus using anionic polymer-coated magnetic beads. *Neurosci. Lett.* 2011b;494(3):237-239.
- Schagen F.H.E., Rademaker H.J., Rabelink M., van Ormondt H., Faltaux F.J., van der Eb A.J., Hoeben R.C. Ammonium sulphate precipitation of recombinant adenovirus from culture medium: an easy method to increase the fetal virus yield. *Gene Ther.* 2000;7(18):1570-1574.
- Segura M.M., Garnier A., Kamen A. Purification and characterization of retrovirus vector particles by rate zonal ultracentrifugation. *J. Virol. Methods.* 2006;133(1):82-91.
- Sheets R.L. Opinion on adventitious agents testing for vaccines: Why do we worry so much about adventitious agents in vaccines? *Vaccine*. 2013;31(26):2791-2795.
- Soto-Beltran M., Ikner L.A., Bright K.R. Effectiveness of poliovirus concentration and recovery from treated wastewater by two electro-positive filter methods. *Food Environ. Virol.* 2013;5:91-96.
- Sun G., Xiao J., Wang H., Gong C., Pan U., Yan S., Wang Y. Efficient purification and concentration of viruses from a large body of high turbidity seawater. *MethodsX*. 2014;1:197-206. DOI 10.1016/j.mex.2014.09.001.
- Svec F., Perry G. Wang (Ed.). Monolithic chromatography and its modern applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011;401:1459-1460. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5175-0>.
- Transfiguracion J., Jorio H., Meghrou J., Jacob D., Kamen A. High yield purification of functional baculovirus vectors by size exclusion chromatography. *J. Virol. Methods.* 2007;142(1-2):21-28.
- Vicente T., Roldão A., Peixoto C., Carrondo M.J.T., Alves P.M. Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. *J. Invertebr. Pathol.* 2011;107:42-48.
- Wickramasinghe S.R., Kalbfuss B., Zimmermann A., Thom V., Reichl U. Tangential flow microfiltration and ultrafiltration for human influenza A virus concentration and purification. *Biotechnol. Bioeng.* 2005;92(2):199-208.
- Yeh Y.T., Tang Y., Sebastian A., Dasgupta A., Perea-Lopez N., Albert I., Lu H., Terrones M., Zeng C.-Y. Tunable and label-free virus enrichment for ultrasensitive virus detection using carbon nanotube arrays. *Sci. Adv.* 2016;2(10):e1601026. DOI 10.1126/sciadv.1601026.
- Yousefi M.H., Zerafat M.M., Shokri-Doodeji M.D., Sabbaghi S. Investigation of dip-coating parameters effect on the performance of Alumina-Polydimethylsiloxane nanofiltration membranes for desalination. *J. Water Environ. Nanotechnol.* 2017;2(4):235-242.

ORCID ID

I.D. Petrova orcid.org/0000-0002-0276-9839
B.N. Zaitsev orcid.org/0000-0001-6359-465X
O.S. Taranov orcid.org/0000-0002-6746-8092

Благодарности. Исследование проводилось в рамках выполнения государственного задания ГЗ-7/18 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 10.07.2019. После доработки 18.11.2019. Принята к публикации 20.11.2019.