

Технология CANARY: принципы работы биосенсора, использование для обнаружения возбудителей инфекционных заболеваний

А.С. Горшков, Д.В. Печенкин, А.В. Кузнецовский

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения
«48 Центральный научно-исследовательский институт»
Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров), 610000,
Российская Федерация, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 119

Поступила 31.05.2019 г.; исправленный вариант 10.09.2020 г. Принята к публикации 21.12.2020 г.

Биосенсоры многократного использования, предназначенные для детекции биохимических аналитов, широко внедрены в клинично-лабораторную практику, однако биосенсоры для выявления патогенных микроорганизмов еще находятся в стадии разработки или внедрения. Одним из таких устройств является биосенсор CANARY (англ. Cellular Analysis and Notification of Antigen Risks and Yields – клеточный анализ и определение рисков и наличия антигена), используемый, в том числе, военным ведомством США для индикации патогенных биологических агентов. *Цель работы* – рассмотреть принципы работы и молекулярно-биологические основы биосенсора CANARY, проанализировать возможные направления работ и перспективы создания отечественных биосенсоров на основе эукариотических клеток. Принципиальная схема CANARY состоит в том, что его рецепторным компонентом является модифицированный с помощью технологии генно-инженерии В-лимфоцит, несущий на поверхности цитоплазматической мембраны специфические IgM-подобные В-клеточные рецепторы. Эти клетки способны специфически распознавать целевой антиген и через белок экворин генерировать фотосигнал. В настоящее время на основе биосенсора CANARY созданы сенсоры для обнаружения возбудителей чумы (100–1000 КОЕ/мл), туляремии (100 КОЕ/мл), сибирской язвы (100–500 спор/мл), натуральной оспы (<500 КОЕ/мл), некоторых токсинов (рицина – 3 нг/мл, ботулинического токсина – 16 пг/мл). Учитывая высокие показатели чувствительности и специфичности метода, относительную простоту и высокую скорость анализа одной пробы, возможность анализа проб аэрозолей, данную технологию следует рассматривать как перспективную основу для создания отечественных биологических сенсоров, предназначенных для обнаружения опасных биологических агентов в биологических образцах, воде, пищевых продуктах, на объектах окружающей среды и в аэрозолях. Особую актуальность сенсорам на основе технологии CANARY придает ухудшение глобальной эпидемической обстановки, вызванное распространением различных штаммов SARS-CoV-2. Для создания отечественного аналога такого биосенсора потребуются тесная кооперация с научными учреждениями, специализирующимися в области молекулярной генетики, и производителями лабораторного оборудования. В статье также показана логика появления и развития технологии CANARY.

Ключевые слова: аэрозоль; В-лимфобласт; В-лимфоцит; безреагентный анализ; биосенсор; IgM-подобные В-клеточные рецепторы; индикация патогенных биологических агентов; технология CANARY; экворин.

Библиографическое описание: Горшков А.С., Печенкин Д.В., Кузнецовский А.В. Технология CANARY: принципы работы биосенсора, использование для обнаружения возбудителей инфекционных заболеваний // Вестник войск РХБ защиты. 2020. Т. 4. № 4. С. 431–440. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2020-4-4-431-440>

В настоящее время актуальным направлением создания средств лабораторной диагностики и детекции различных аналитов яв-

ляется разработка биосенсоров, поскольку они обладают рядом несомненных преимуществ перед другими такими средствами – экспресс-

ностью анализа, высокой чувствительностью и специфичностью реакций, возможностью обнаружения ионных примесей, простых и сложных неорганических и органических молекул, а также возможностью многократного использования [1].

Биосенсор – это устройство безреагентного анализа соединений, состоящее из трех компонентов: рецептора, физического преобразователя (транзьюсера) и реакционной среды. Рецепторный биологический компонент сенсора включает биомолекулы – ферменты, антитела, антигены, нуклеиновые кислоты, иммобилизованные на специальном физическом носителе. Взаимодействуя с исследуемым материалом, рецепторный компонент генерирует ответ (изменяется конформация биомолекул, их масса, локально изменяется pH и др.), который с помощью транзьюсера преобразуется в электрический сигнал [2, 3].

Биосенсоры широко используются в рутинной лабораторной практике. Например, во многих клинично-диагностических лабораториях России активно используется лабораторный анализатор глюкозы и лактата «Biosen C-line» фирмы «EKF Diagnostics»¹ (Великобритания). Данный анализатор имеет в своем составе электрохимический чип-сенсор и характеризуется высокой производительностью, низкой себестоимостью анализа, сниженным потреблением реагентов. Но если биологические сенсоры, предназначенные для определения биохимических субстратов, широко внедрены в практику, то сенсоры для выявления патогенных микроорганизмов находятся в стадии разработки или внедрения. В научной литературе описан электрохимический иммуносенсор для обнаружения родственного SARS-CoV-2 вируса ближневосточного тяжелого респираторного синдрома (MERS) [4].

Одним из сенсоров, который можно использовать как технологическую платформу для обнаружения патогенных микроорганизмов (в том числе и SARS-CoV-2), дополнять и обновлять базу выявляемых аналитов без внесения конструктивных изменений в аппаратно-технологическое обеспечение, является продукт CANARY (англ. Cellular Analysis and Notification of Antigen Risks and Yields – клеточный анализ и определение рисков и наличия антигена), используемый, в том числе, военным ведомством США для индикации патогенных биологических агентов [5].

Цель работы – рассмотреть принципы работы и молекулярно-биологические основы биосенсора CANARY, проанализировать возможные направления работ и перспективы создания отечественных биосенсоров на основе эукариотических клеток.

Биологический сенсор CANARY в настоящее время активно внедряется в практику различных служб США, занимающихся вопросами защиты от биотерроризма, в том числе Министерства обороны США². Технологическое исполнение биосенсора, выпускаемого фирмой «PathSensors», позволяет выполнять ряд задач по четырем основным направлениям:

- скрининг почтовых отправок (проверка почтовых отправок на предмет контаминации биологическими агентами – первая линия защиты от биотеррористических атак);
- безопасность пищевых продуктов (оценка микробной обсемененности продуктов питания, в том числе полуфабрикатов, готовых к употреблению, улучшение гигиенического мониторинга, обеспечение репутации производителей пищевых продуктов при подозрении на контаминацию возбудителями пищевых инфекций);
- особо опасные заболевания (своевременная диагностика особо опасных инфекционных заболеваний может предотвратить масштабное распространение таких заболеваний, как лихорадка Зика и Эбола);
- сельское хозяйство (тестирование растений на предмет наличия фитопатогенов может быть полезно агрофирмам, ведущим селекционные работы).

Живые эукариотические клетки в качестве рецепторного компонента биосенсоров не применяются. Чаще всего для этих целей используют биомолекулы и целые микробные клетки, поскольку применение сенсоров на основе животных клеток, как правило, ограничивается их специфической чувствительностью к определяемому веществу. Например, клеточная линия Vero высокочувствительна к шига- и шигаподобным токсинам (на основании чего данные токсины имеют синоним «веротоксины»), поэтому клетки Vero были предложены в качестве воспринимающего компонента биосенсора, предназначенного для обнаружения шига-токсина [6]. Аналогичным образом для обнаружения цереулида – токсина *Bacillus cereus*, можно использовать клеточные линии Hep-2 и Ped-2E9 [7]. В последнее время биосенсоры на основе эукариотических клеток

¹ Анализатор глюкозы и лактата «Biosen C-line» URL: <http://ekf-diagnostic.ru/productions/biosen-c.html> (дата обращения: 01.09.2020).

² Biodetection technologies for first responders: 2015 edition. URL: https://www.interagencyboard.org/system/files/resources/Biodetection_Technologies_for_First_Responders_May2015.pdf (дата обращения: 01.09.2020).

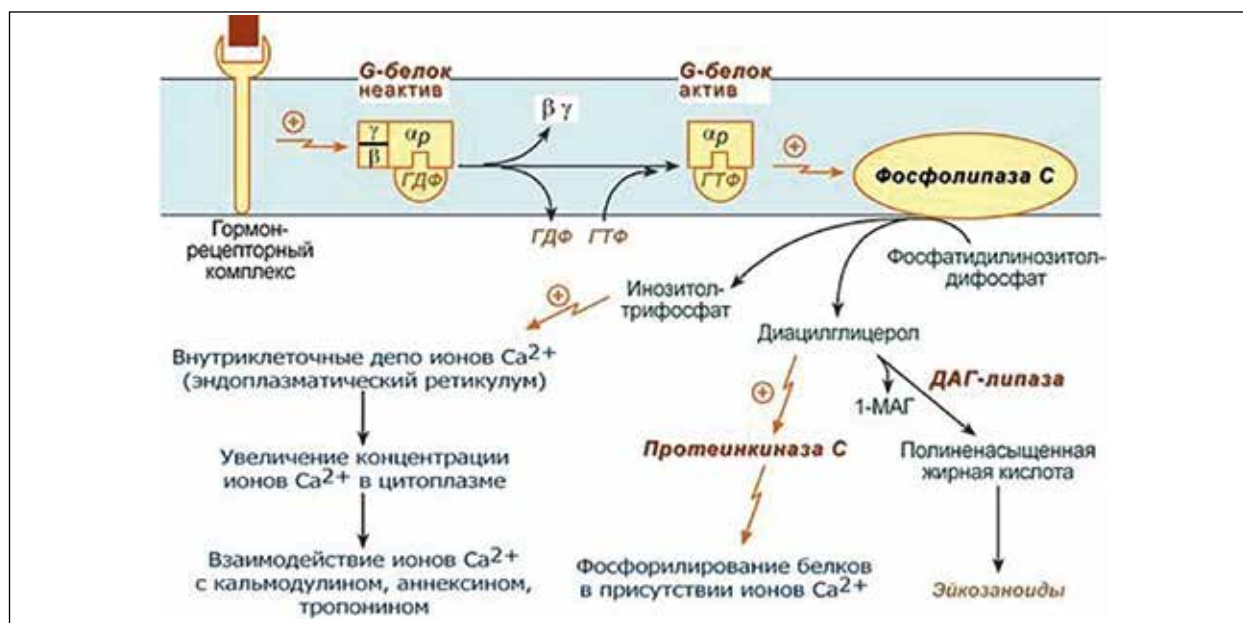


Рисунок 1 – Механизм передачи сигнала, связанный с диацилглицерином и инозитол-трифосфатом. Связывание лиганда с рецептором приводит к активации связанного с рецептором G-белка, который, в свою очередь, активирует фосфолипазу C. Фосфолипаза C катализирует распад фосфатидилинозитол-дифосфата на ИТФ и ДАГ. Эти субстраты способствуют высвобождению ионов Ca^{2+} , крайне необходимых для активации многих белков и ферментов клетки [9]

нашли свое применение в экспериментальной онкологии (тестирование новых противоопухолевых препаратов), в кардиологии (тестирование препаратов, влияющих на сократимость кардиомиоцитов), в гигиенических исследованиях (оценка загрязненности воды) [8].

Отличие и уникальность биосенсора CANARY от всех других сенсоров на основе эукариотических клеток состоит в том, что генерируемый клеткой ответ никак не связан с проявлениями токсичности определяемого аналита. К тому же, живая эукариотическая клетка – носитель специфических моноклональных антител – является одновременно рецептором и трансдьюсером данного сенсора, что крайне редко встречается в технологии биосенсоров.

Для понимания принципа функционирования CANARY необходимо знать механизм внутриклеточной сигнализации в животных клетках. Путь передачи сигнала от биологически активного вещества (медиатора, гормона) клетке достаточно сложен и реализуется через систему химических посредников – специальных G-белков, связанных с ними ферментных систем и вторичных мессенджеров [9]. В роли мессенджеров выступают циклические нуклеотиды – цАМФ и цГМФ, а также диацилглицерин (ДАГ) и инозитол-трифосфат (ИТФ)³

[10–12]. Через цАМФ реализуется действие гормонов гипофиза, адреналина, кальцитонина, вазопрессина, через ДАГ и ИТФ реализуется передача сигнала активации клеток иммунной системы (рисунок 1).

В этом случае связывание лиганда с трансмембранным рецептором приводит к активации G-белка, который активирует фосфолипазу C. Фосфолипаза C расщепляет фосфатидилинозитол-дифосфат на ДАГ и ИТФ, которые являются вторичными мессенджерами данного пути. В дальнейшем метаболические пути передачи сигнала расходятся, и каждый из двух вторичных мессенджеров является отправной точкой сложного каскада биохимических реакций, которые ведут к развитию различных эффектов. Одним из эффектов инозитол-трифосфата является быстрое открытие кальциевых каналов и высвобождение кальция, в первую очередь из главного внутриклеточного кальциевого депо – эндоплазматической сети. Эффекты диацилглицерина – медленные, реализуются в основном посредством белков семейства Ras, приводят к активации транскрипции, увеличению подвижности клеток и их делению.

Эволюционно сложилось, что в лимфоидных клетках преобладает именно описанный выше механизм передачи сигнала с вовлечением в каскад вторичных мессен-

³ Инозитолтрифосфат и ДАГ тоже являются вторичными мессенджерами. URL: <http://biokhimija.ru/gormony/fosfolipaza.html> (дата обращения: 01.09.2020).

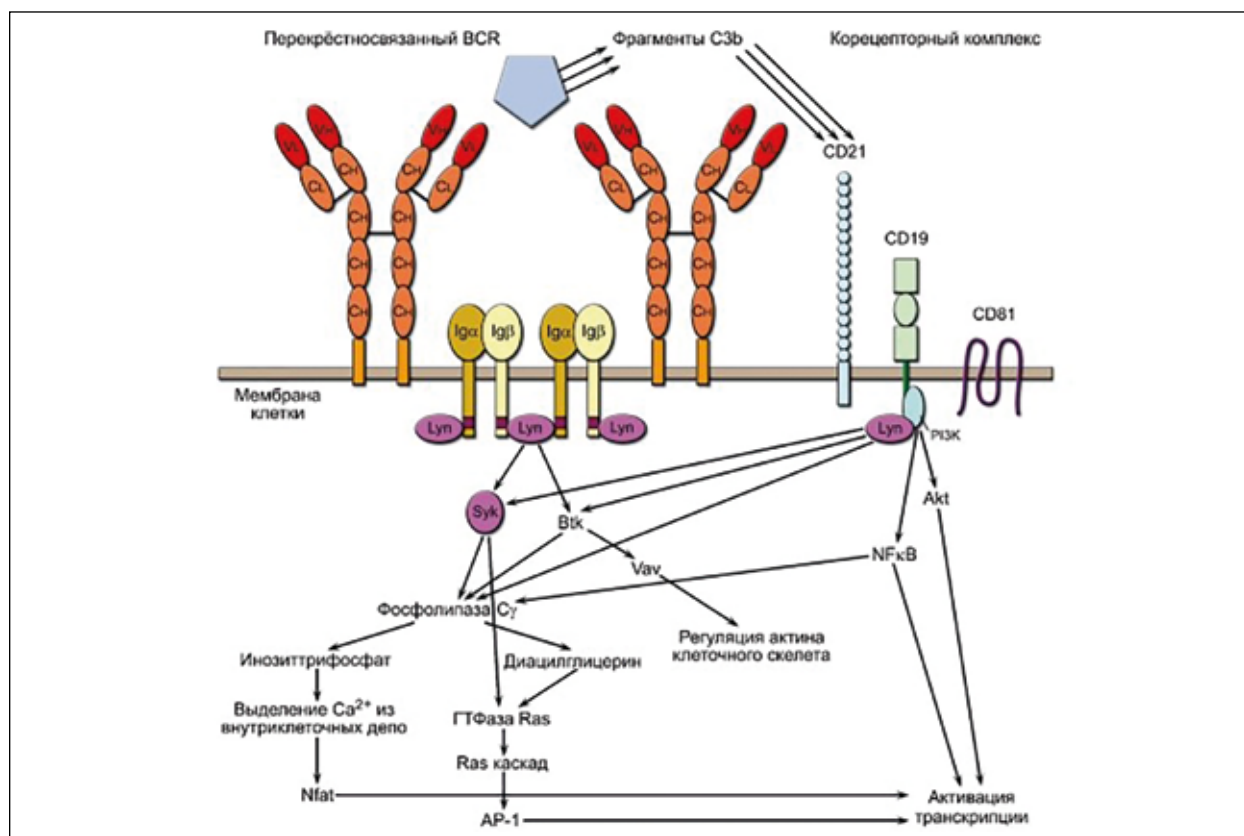


Рисунок 2 – Механизм передачи сигнала через В-клеточный рецептор.

В-клеточный рецептор после связывания со специфическим антигеном через корецепторный комплекс и G-белки активирует различные сигнальные киназы (PI3K, Akt), транскрипционные факторы (NFκB) и фосфолипазу C. Эти молекулы через свои метаболические каскады приводят к «включению» генов, позволяющих клетке делиться (по A. Nair с соавт. [9] с изменениями)

джеро диацилглицерина и инозитол-трифосфата [13]. Но если большинство клеток организма отвечают на стимуляцию гормонами, медиаторами, биологически активными веществами, то основным стимулом для лимфоцитов является антиген, распознаваемый специальными В-клеточными рецепторами (B-cells receptor, BCR), которые так же, как и рецепторы гормонов, связаны с G-белками. В-клеточные рецепторы содержат в своем составе молекулы, очень похожие на иммуноглобулины IgM и отличающиеся от секреторных IgM только якорным трансмембранным доменом и тесной связью с кофакторными молекулами Igα (CD 79α) и Igβ (CD 79β) [13].

Для эффективной активации лимфоцита необходимо не просто связывание антигена с иммуноглобулиновой молекулой в составе BCR, а перекрестная сшивка двух или более BCR, для чего молекула антигена должна иметь повторяющиеся эпитопы [14]. В результате описанных выше сложных каскадов запускается процесс деления клетки (рисунок 2).

Биологический смысл этих процессов – заставить клетки, распознавшие «свой» антиген,

дать потомство, которое будет продуцировать антитела той же специфичности, что и В-клеточный рецептор. На тканевом уровне это выражается в накоплении определенного клона лимфоцитов, специфичного к распознанному антигену и продукцией специфических антител. Генетические перестройки, происходящие в процессе созревания клеток такого клона, приводят к «смене ориентации» клетки: на смену мембранной форме IgM, которая была ранее в составе BCR, приходит секреторная форма IgM. Таким образом, клетка из «ловца антигенов» становится «фабрикой антител». Традиционно данный процесс использовали для оценки гуморального звена иммунитета в РБТЛ (реакция бласттрансформации лимфоцитов), для постановки которой было необходимо не менее 72 ч (стандартное время, необходимое клетке для запуска процесса деления). Нетрудно догадаться, что при этом оценивались медленные эффекты вторичного мессенджера ДАГ, в то время как быстрый отклик на ИТФ был неустойчивым.

С развитием методов люминесцентной микроскопии, проточной цитометрии и лю-

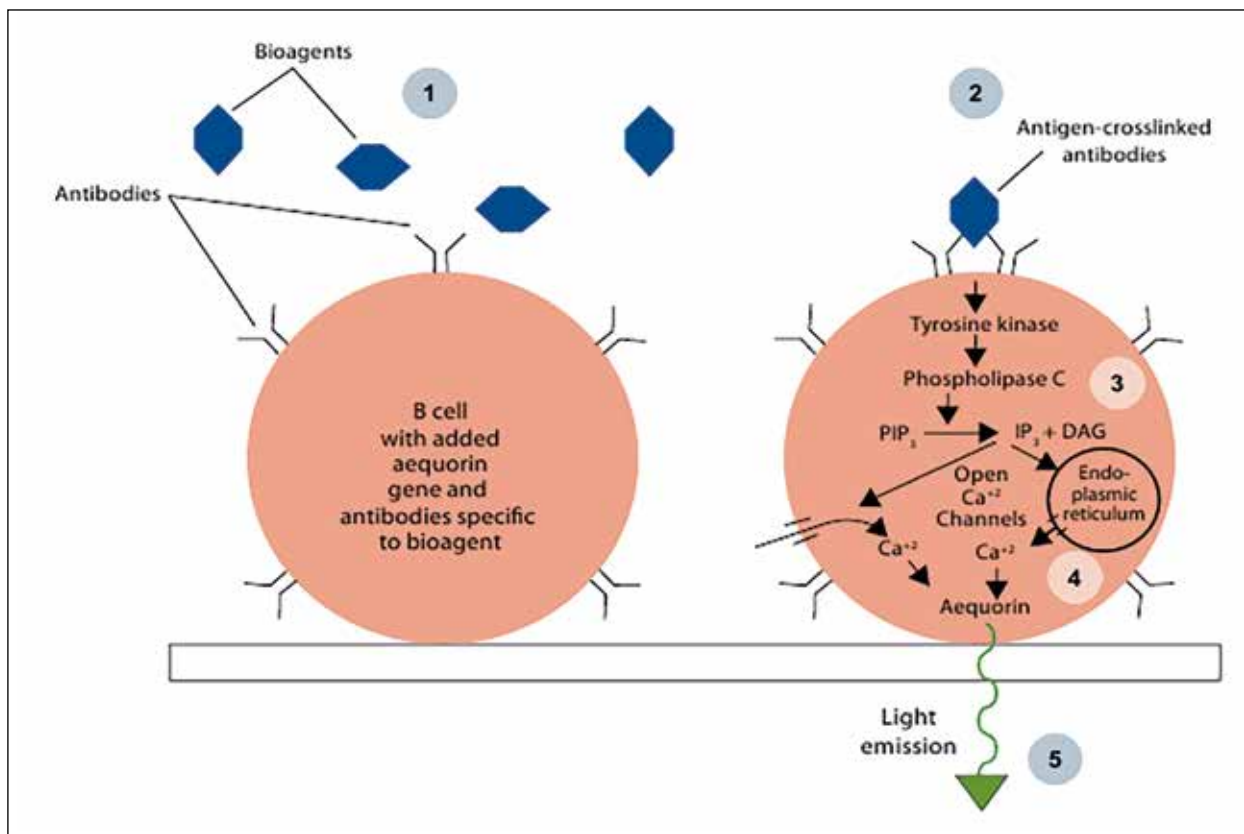


Рисунок 3 – Механизм работы биосенсора CANARY, приводится по M.S. Petrovick с соавт. [15].
 1 – биоагенты; 2 – антиген, перекрестно связавшийся с поверхностным IgM-рецептором; 3 – каскад передачи внутриклеточных сигналов; 4 – кальций-зависимая активация экворина; 5 – аппаратная регистрация люминесценции [15]

минометрии стало возможным слежение за быстропротекающими процессами изменения концентрации внутриклеточных катионов, в первую очередь кальция. Данные методы были объединены в группу под названием «Ca-flux», дословно «кальцевый ток». Были разработаны несколько групп низкомолекулярных флуоресцентных маркеров, которые светятся с усиленной интенсивностью или меняют длину волны испускаемого свечения при взаимодействии с кальцием.

Также были созданы генно-инженерные белки, подобным образом реагирующие на присутствие свободного кальция в цитоплазме, например, экворин. Тем не менее, долгое время данные знания были востребованы только в академической науке для исследования тонких взаимодействий в системе «лиганд/рецептор». Таким образом, стало возможно оценить факт взаимодействия антиген/BCR не через 3 суток (по пролиферации клеток), а практически мгновенно (по кальцевому току).

Объединить накопленные знания в единое целое и получить практическую реализацию (создание биосенсора) удалось группе исследователей под руководством M.S. Petrovick [15–

18]. Для этого были сконструированы следующие, казалось бы, несвязанные процессы и явления:

- знание структуры BCR и механизма связывания антигена с ним;
- использование неволебуемых ранее эффектов инозитол-трифосфата для оценки факта взаимодействия антиген/BCR;
- использование метода «Ca-flux» для оценки кальцевого тока.

Принципиальная схема биосенсора состоит в следующем: в технологии CANARY биосенсором является генно-инженерный В-лимфоцит, несущий на поверхности цитоплазматической мембраны специфические IgM-подобные В-клеточные рецепторы, способные распознавать целевой антиген и генерировать в ответ на связывание с ним фотосигнал. В технологии CANARY антиген, перекрестно связываясь с мембранным IgM-рецептором, изменяет конформацию G-белка. Активация G-белка приводит к активации фосфолипазы C (phospholipase C, PLC). Активированная PLC расщепляет фосфатидилинозит дифосфат (phosphatidylinositol biphosphate, PIP₂) на инозитол-трифосфат (inositol triphosphate, IP₃) и диацилглицерин (diacylglycerol, DAG). IP₃ от-

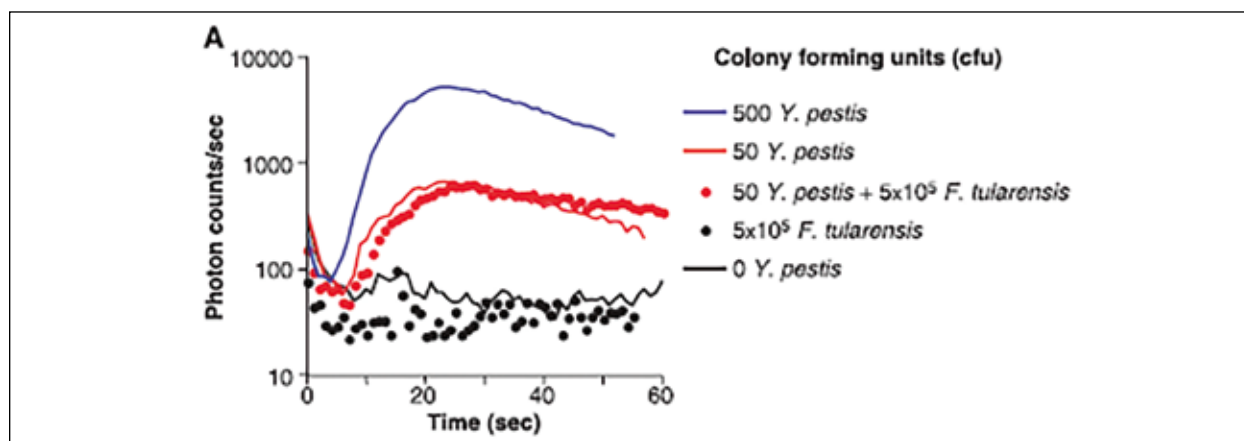


Рисунок 4 – Результаты испытаний биосенсора на примере выявления F1-антигена возбудителя чумы, приведено по Т.Н. Rider с соавт. [18]

крывает кальциевые каналы. Для регистрации кальциевого тока в технологии биосенсора используется белок экворин, который светится при взаимодействии с кальцием (рисунок 3) [15].

Для создания биосенсора требовалось получение специальных В-клеточных линий. На первом этапе работы авторы клонировали гены варибельных участков иммуноглобулинов из генетического материала гибридом, полученных к антигенным детерминантам выбранных биоагентов. Полученные последовательности ДНК были встроены в экспрессионную кассету (вектор), данным вектором были трансформированы В-лимфоциты человека и проведена селекция клеток с максимальным содержанием мембранных иммуноглобулиновых рецепторов. На втором этапе проведена трансформация отобранных лимфоцитов вектором с геном экворина. Вторичная селекция клеток позволила получить популяцию клеток, которые при встрече с антигеном дали люминесцентный сигнал [15–18].

Впервые данные по испытанию биосенсора были опубликованы в 2003 г. в журнале Science [18] (рисунок 4).

Как следует из рисунка 4, чувствительность метода составила всего 50 колониеобразующих единиц (КОЕ, colony forming units – CFU) *Yersinia pestis* в пробе, что на несколько порядков выше чувствительности других существующих методов анализа. Добавление в анализируемую смесь $5 \cdot 10^5$ микробных клеток *Francisella tularensis* не влияло на специфичность анализа. Уровень сигнала при исследовании пробы с тулярийным микробом соответствовал фону [16]. При этом скорость анализа пробы находилась в пределах минуты, что на порядок выше скорости классических методов обнаружения инфекционных агентов (ИФА, ПЦР). По данным авторов, этап пробоподготовки (магнитная сепарация) автоматизи-

рован и также занимал непродолжительное время.

По данным обзора средств биодетекции, активно использующихся силовыми ведомствами США, чувствительность сенсора составляет:

- для возбудителя сибирской язвы – 100–500 спор/мл;
- для рицина – 400 пг;
- для ботулинического токсина – 16 пг;
- для возбудителя чумы – 100–1000 КОЕ/мл;
- для возбудителя натуральной оспы <500 КОЕ/мл;
- для возбудителя туляремии – 100 КОЕ/мл.

По опубликованным в 2017 г. данным, чувствительность сенсора CANARY при индикации *Bacillus anthracis Ames35* (споры) составляет 10^3 спор/мл, при индикации рицина – 3 нг/мл, что превосходит аналогичные показатели взятых для сравнения иммунохроматографических тестов [5].

Технологическое обеспечение метода первоначально было представлено прибором Zephyr Pathogen Identifier и его мобильным вариантом для анализа жидких образцов и проб аэрозолей (Panther) с целью мониторинга почты на предмет контаминации возбудителем сибирской язвы и вирусом атипичной пневмонии. В настоящее время компания «PathSensors» выпускает три технологических варианта приборов, которые рассчитаны на разные объемы лабораторной работы: PathSensors Navigator, Zephyr Pathogen Identifier и BioFlash-E® Biological Identifier (рисунок 5).

Прибор PathSensors Navigator предназначен для скрининга жидких и сухих проб на предмет наличия патогенных биологических агентов, рассчитан на лаборатории с большим потоком проб и работу с 96-луночными планшетами. Прибор Zephyr Pathogen Identifier предназначен для работы в лабора-



Рисунок 5 – Технологические платформы, использованные в технологии CANARY¹.
A – PathSensors Navigator; Б – Zephyr Pathogen Identifier; В – BioFlash-E® Biological Identifier

¹ Сайт компании PATHSENSORS. URL: <https://pathsensors.com/technology/biodetection-platforms/> (дата обращения: 01.09.2020).

ториях с небольшой поточностью (менее 40 тестов в сутки). Прибор BioFlash-E® Biological Identifier предназначен для анализа проб аэрозолей.

По данным сайта компании «PathSensors», уже созданы культуры лимфоцитов, специфично реагирующие на присутствие 21 патогена⁴. В списке агентов для обнаружения производителем заявлены: возбудители чумы, туляремии, сибирской язвы, натуральной оспы, лихорадок Денге, Эбола, Зика, возбудитель птичьего гриппа, рицин и ботулинический токсин, а также ряд растительных патогенов (фитофтора, *Citrus leprosis virus*, *Potyvirus spp.* и др.). Тем не менее, опубликованные результаты исследований тактико-технических характеристик сенсора (чувствительность, специфичность) имеются только в отношении возбудителей чумы, сибирской язвы, туляремии, натуральной оспы, а также рицина и ботулинического токсина.

Весной 2020 г. на сайте компании «PathSensors» появилась информация о том, что ее специалистами ведутся разработки клеточного сенсора для обнаружения вируса SARS-CoV-2 в образцах внешней среды и биологических образцах пациентов⁵. Предполагалось, что биосенсор будет доступен для исследовательских целей в мае 2020 г., а данные о валидации нового продукта SARS-CoV-2 будут доступны в июне 2020 г. Тем не менее, в настоящее время мы не обнаружили опубликованных результатов научных работ по данной проблеме.

Учитывая высокие показатели чувствительности и специфичности метода, относительную простоту и высокую скорость выполнения анализа одной пробы, возможность анализа проб аэрозолей, данную технологию следует рассматривать как перспективную основу для создания биологических сенсоров на основе генно-инженерных клеток (эукариотический биосенсор с регистрацией внутриклеточного кальциевого тока), предназначенных для обнаружения возбудителей инфекционных заболеваний. Поскольку технология CANARY в описанном варианте сложна для воспроизведения, то становится целесообразной ее модификация с целью сокращения трудозатрат и упрощения методологии создания эукариотического биосенсора, например, путем использования гибридом. Известно, что в данном направлении уже проводится работа коллективом авторов из Ирана [19]. Исследователи предлагают в качестве платформы для сенсора использовать гибридомы, секретирующие моноклональные антитела к О-антигену возбудителя холеры. Клетки гибридом не полностью переключаются на синтез секреторного иммуноглобулина и частично сохраняют его мембранные формы (BCR). Эти данные были положены в основу методологии раннего скрининга гибридом методом клеточного сортирования [20]. По-видимому, существующего в гибридомах уровня экспрессии BCR хватает для генерации значимого уровня кальциевого тока в ответ на встречу клеток с целевым антигеном, а для создания сенсора потребуется только один

⁴ CANARY: Technology for rapidly identifying biological agents. URL: https://www.ll.mit.edu/publications/technotes/TechNote_CANARY.pdf (дата обращения: 01.09.2020).

⁵ Sars-CoV-2-biosensor. URL: <https://pathsensors.com/psi-sars-cov-2-biosensor/> (дата обращения: 01.09.2020).

шаг – генетическая модификация гибридом вектором с геном экворина (предпочтительна стабильная, но достаточно и транзистентной экспрессии). Таким образом, существенно сокращается время, необходимое для разработки одного типа клеток-рецепторов.

Создание и поддержание генетически модифицированных клеток-сенсоров намного сложнее, чем изготовление классических тест-систем для выявления биопатогенов, основанных на методах ПЦР, ИФА и ИХА. Кроме того, при создании отечественного эукариотического биосенсора необходимо учитывать следующие проблемы:

- создание сенсора-аналога по технологии CANARY затратно в финансовом и временном плане;

- созданный сенсор будет пригоден для обнаружения одной антигенной детерминанты инфекционного агента; для создания системы выявления другого возбудителя (или другой антигенной детерминанты того же возбудителя) работу по созданию, тестированию библиотеки генов иммуноглобулинов и получению большого числа промежуточных клеточных линий придется повторять;

- для выявления одного возбудителя возможно потребуются создание нескольких биосенсоров с разной эпитопной специфичностью мембранных рецепторов;

- поскольку хранение генно-инженерных лимфоцитов возможно только в азотном банке, то потребуются разработка технологии сохранения биосенсора в условиях гипобиоза при температуре бытового холодильника (для возможности использования в составе мобильных лабораторий);

- ввиду своей биологической природы сенсор затруднительно использовать для анализа смесей, содержащих цитотоксичные примеси, что потребует разработку этапа пробоподготовки;

- закупка готовых клеток-сенсоров (генно-инженерных лимфоцитов, специфичных к определенному биопатогену) за рубежом, вероятнее всего, неперспективна, поскольку последние могут быть предварительно обработаны антимицотическим агентом или иным ингибитором, что исключило бы возможность их самостоятельного наращивания для предотвращения нарушения коммерческих прав.

Биологический сенсор CANARY на основе генно-инженерных лимфоцитов при детекции патогенных биологических агентов обладает рядом преимуществ перед сенсорами, использующими методы, уже ставшими рутинными (ПЦР, ИФА и ИХА). Эти преимущества – высокая чувствительность анализа, экспрессность (порядка 100 с/анализ) и возможность анализа проб аэрозолей, позволяют оперативно обнаружить биологическое нападение при минимальном количестве биологического агента в отобранных пробах и компенсируют сложность его создания. Поэтому разработка сенсоров данного типа является перспективным направлением совершенствования отечественных средств обнаружения биопатогенов. Для создания отечественного варианта аналога такого биосенсора потребуются тесная кооперация с научными учреждениями, специализирующимися в области молекулярной генетики, и производителями лабораторного оборудования.

Информация о конфликте интересов

Авторы заявляют, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

Сведения о рецензировании

Статья прошла открытое рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала и в РИНЦе.

Список источников / References

1. Amini K., Kraatz H-B. Recent developments in biosensor technologies for pathogen detection in water // JSM Environmental Science Ecology. 2015. V. 3. № 1. P. 1012.
2. Уткин Д.В., Осина Н.А., Куклев В.Е. и др. Биосенсоры: современное состояние и перспективы применения в лабораторной диагностике особо опасных инфекционных болезней // Проблемы особо опасных инфекций. 2009. № 102. С. 11–14.
- Utkin D.V., Osina N.A., Kuklev V.E. et al.

Biosensors: modern state and prospects for using in the diagnostics of particularly dangerous infection diseases // Problems of Particularly Dangerous Infections. 2009. № 102. P. 11–14 (in Russian).

3. Asal M., Özen Ö., Şahinler M., Polatoğlu İ. Recent developments in enzyme, DNA and immuno-based biosensors // Sensors (Basel). 2018. V. 18. № 6. P. 1924. <https://doi.org/10.3390/s18061924>

4. Layqah L.A., Eissa S. An electrochemical immunosensor for the corona virus associated with the

Middle East respiratory syndrome using an array of gold nanoparticle-modified carbon electrodes // *Microchim. Acta*. 2019. V. 186. № 4. P. 224. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3345-5>

5. Bartholomew R.A., Ozanich R.M., Arce J.S. et al. Evaluation of immunoassays and general biological indicator tests for field screening of *Bacillus anthracis* and ricin // *Health Secur.* 2017. V. 15. № 1. P. 81–96. <https://doi.org/10.1089/hs.2016.0044>

6. Xing J.Z., Zhu L., Huang B. et al. Microelectronic-sensing assay to detect presence of Verotoxins in human faecal samples // *J. Appl. Microbiol.* 2012. V. 113. № 2. P. 429–37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05321.x>

7. Banerjee P., Kintzios S., Prabhakarpandian B. Biotoxin detection using cell-based sensor // *Toxins (Basel)*. 2013. V. 5. № 12. P. 2366–2383. <https://doi.org/10.3390/toxins5122366>

8. Gupta N., Renugopalakrishnan V., Liepmann D. et al. Cell-based biosensors: recent trends, challenges and future perspectives // *Biosens. Bioelectron.* 2019. V. 141. P. 111435. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111435>

9. Nair A., Chauhan P., Saha B., Kubatzky K.F. Conceptual evolution of cell signaling // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 13. P. 3292. <https://doi.org/10.3390/ijms20133292>

10. Eichmann T.O., Lass A. DAG tales: the multiple faces of diacylglycerol – stereochemistry, metabolism, and signaling // *Cell. Mol. Life. Sci.* 2015. V. 72. № 20. P. 3931–3952. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1982-3>

11. Berridge M.J. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease // *Physiol. Rev.* 2016. V. 96. № 4. P. 1261–1296. <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2016>

12. Bevilacqua A., Bizzarri M. Inositols in

insulin signaling and glucose metabolism // *Int. J. Endocrinol.* 2018. V. 2018. P. 1968450. <https://doi.org/10.1155/2018/1968450>

13. Hagen S., Brachs S., Kroczeck C., Fürnrohr B.G. et al. The B cell receptor-induced calcium flux involves a calcium mediated positive feedback loop // *Cell Calcium*. 2012. V. 51. № 5. P. 411–417. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.01.004>

14. Иммунология: структура и функции иммунной системы: учебное пособие / Р.М. Хаитов. 2013. 280 с.

Immunology: structure and function of immune system / R.M. Haitov. 2013. 280 p. (in Russian).

15. Petrovick M.S., Harper J.D., Nargi F.E. et al. Rapid sensors for biological-agent identification // *Lincoln Laboratory J.* 2007. V. 17. № 1. P. 63–84.

16. Patent US WO 2008/048300 A2 (2008).

17. Patent US 2010/0062415 A1 (2010).

18. Rider T.H., Petrovick M.S., Nargi F.E. et al. A B cell-based sensor for rapid identification of pathogens // *Science*. 2003. V. 301. № 5630. P. 213–215. <https://doi.org/10.1126/science.1084920>

19. Zamani P., Sajedi R.H., Hosseinkhani S., Zeinoddini M., Bakhshi B. A luminescent hybridoma-based biosensor for rapid detection of *V. cholerae* upon induction of calcium signaling pathway // *Biosens. Bioelectron.* 2016. V. 79. P. 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.12.018>

20. Price P.W., McKinney E.C., Wang Y. et al. Engineered cell surface expression of membrane immunoglobulin as a means to identify monoclonal antibody-secreting hybridomas // *J. Immunol. Methods*. 2009. V. 343 № 1. P. 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.01.005>

Об авторах

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров), 610000, Российская Федерация, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 119.

Горшков Антон Сергеевич. Научный сотрудник научно-исследовательского отдела, канд. мед. наук.

Печенкин Денис Валериевич. Начальник научно-исследовательского отдела, канд. мед. наук.

Кузнецовский Андрей Владимирович. Начальник отдела планирования НИР – заместитель начальника филиала по НИР, канд. биол. наук.

Контактная информация для всех авторов: 23527@mil.ru

Контактное лицо: Печенкин Денис Валериевич; 23527@mil.ru

CANARY Technology: Working Principles of Biosensor, Detection of Infectious Pathogens

A.S. Gorshkov, D.V. Pechenkin, A.V. Kuznetsovskiy

Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation (Kirov), Oktyabrsky Avenue 119, Kirov 610000, Russian Federation

Received 31.05.2019. Corrected variant 10.09.2020. Accepted for publication 21.12.2020.

Reusable biosensors for the detection of biochemical analytes are widely used in clinical and laboratory practice. However, biosensors for the detection of pathogenic microorganisms are still under development or implementation. One of these devices is CANARY biosensor (Cellular Analysis and Notification of Antigen Risks and Yields), used by the US Army to indicate pathogenic biological agents. The *aim of this article* is to consider operating principles and molecular-biological foundations of CANARY biosensor, to analyze the possible directions of work and the prospects for creating domestically made biosensors based on eukaryotic cells. The concept of CANARY is that its receptor component is a B-lymphocyte, modified using genetic engineering, which carries specific IgM-like B-cell receptors on the surface of the cytoplasmic membrane. These cells are able to specifically recognize the target antigen and generate a photosignal through the aequorin protein. Currently, biosensors are already created for the detection of causative agents of plague (100–1000 CFU / ml), tularemia (100 CFU / ml), anthrax (100–500 spores / ml), smallpox (<500 CFU / ml), some toxins (ricin – 3 ng / ml, botulinum toxin – 16 pg / ml). They are based on the CANARY biosensor. Due to high sensitivity and specificity of this method, the relative simplicity and high speed of analysis of one sample, the possibility of analyzing aerosol samples, this technology should be considered as a promising basis for the creation of domestically made biological sensors to detect hazardous biological agents in biological samples, water, food, ecological samples and in aerosols. The deterioration of the global epidemic situation caused by the spread of various strains of SARS-CoV-2 makes sensors based on CANARY technology especially relevant. To create a domestic analogue of such a biosensor, close cooperation with scientific institutions that specialize in molecular genetics and manufacturers of laboratory equipment is required.

Keywords: aerosol; B-lymphoblast; B lymphocytes; reagent-free analysis; biosensor; IgM-like B-cell receptors; indication of pathogenic biological agents; CANARY technology; aequorin.

For citation: Gorshkov A.S., Pechenkin D.V., Kuznetsovskiy A.V. CANARY Technology: Working Principles of Biosensor, Detection of Infectious Pathogens // Journal of NBC Protection Corps. 2020. V. 4. № 4. P. 431–440. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2020-4-4-431-440>

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

Peer review information

The article has been peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board and from Russian Science Citation Index database.

References

See P. 438–439

Authors

Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation (Kirov), Oktyabrsky Avenue 119, Kirov 610000, Russian Federation.
Anton Sergeyevich Gorshkov. Researcher of the Scientific and Researcher Department. Candidate of Medical Science.

Denis Valeryevich Pechenkin. Chief of the Scientific and Research Department. Candidate of Medical Science.

Andrey Vladimirovich Kuznetsovskiy. Chief of the Department of Planning of Science and Research – Deputy Chief of the Branch. Candidate of Biological Science.

Contact information for all authors: 23527@mil.ru

Contact person: Denis Valeryevich Pechenkin; 23527@mil.ru