

tis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*. 2013, 57(4): 1333-1342.

12. Smith B.D., Morgan R.L., Beckett G.A. et al. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Recommendations for the identification of chronic hepatitis C virus infection among persons born during 1945-1965. *MMWR Recomm. Rep.* 2012, 61 (No. RR-4): 1-32. Erratum in: *MMWR Recomm Rep.* 2012, 61: 886.
13. Wasley A., Alter M.J. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis.* 2000, 20: 1-16.

*Поступила 18.12.16*

Контактная информация: Соболева Наталья Васильевна,  
142782, Москва, поселение Московский, поселок Института полиомиелита,  
27 км Киевского шоссе, р.т. (495)841-90-12

## ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*О.В.Борисова<sup>1</sup>, Е.Б.Файзулов<sup>1</sup>, А.А.Марова<sup>1</sup>, В.И.Кукушкин<sup>2</sup>, В.В.Зверев<sup>1</sup>*

### **ПЕРСПЕКТИВЫ И ПРОБЛЕМЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭФФЕКТА ГИГАНТ-СКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА В ДИАГНОСТИКЕ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва; <sup>2</sup>Институт физики твердого тела, Черноголовка

Представлены последние достижения в использовании иммунохимических методов с детекцией методом гигантского комбинационного рассеяния света (ГКР), которые могут найти применение для выявления вирусных маркеров. Как и в случае традиционных иммунохимических анализов, эти методы часто базируются на твердофазном иммунохимическом анализе «сэндвич-типа». Необходимым составляющим иммунохимических методов с ГКР-детекцией являются ГКР-активные субстраты, для создания которых в последние годы было разработано множество подходов. Несмотря на сложность достижения высокой чувствительности и специфичности при анализе многокомпонентных клинических образцов продемонстрирован ряд успешных примеров с многообещающими результатами.

*Журн. микробиол., 2017, № 3, С. 106—114*

Ключевые слова: диагностика вирусных инфекций, эффект гигантского комбинационного рассеяния света, ГКР-репортер, иммунохимические методы, антиген, антитело

*O.V.Borisova<sup>1</sup>, E.B.Fayzuloev<sup>1</sup>, A.A.Marova<sup>1</sup>, V.I.Kukushkin<sup>2</sup>, V.V.Zverev<sup>1</sup>*

### **PROSPECTS AND PROBLEMS OF USING THE EFFECT OF SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING IN THE DIAGNOSIS OF VIRAL INFECTIONS**

<sup>1</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; <sup>2</sup>Institute of Solid State Physics, Chernogolovka, Russia

This review presents the latest advances in the use of surface-enhanced Raman scattering (SERS) immunoassay, which can be used to detect viral markers. As in the case of conventional immunoassays, these methods are often based on «sandwich-type» solid phase immunoassay. In

recent years the necessary components of the immunochemical methods with SERS detection is SERS-active substrates to create a variety of approaches have been developed. Despite the difficulty of achieving high sensitivity and specificity in the analysis of clinical samples, a number of successful examples with promising results have been demonstrated.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 3, P. 106—114

Key words: diagnosis of viral infections, surface-enhanced Raman scattering, SERS reporter molecules, immunochemical techniques, antigen, antibody

Разработка быстрых, чувствительных и селективных методов выявления и идентификации патогенных вирусов, особенно в случаях, требующих неотложной медицинской помощи, остается актуальной задачей здравоохранения. Существующие на сегодняшний день экспресс тест-системы для диагностики вирусных заболеваний доступны только для выявления ограниченного количества возбудителей и основаны преимущественно на реакциях антиген-антитело с визуальной детекцией результата, таких как реакции иммунохроматографии и латекс-агглютинации. Невысокая аналитическая чувствительность этих методов не позволяет их использовать в случаях, когда маркеры инфекции присутствуют в клиническом образце в низкой концентрации, что сильно ограничивает сферу их применения. Высокочувствительное выявление возбудителя возможно с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР), которые однако не являются экспресс-методами и выполняются только в специально оборудованной лаборатории.

В последнее время наблюдается устойчивый интерес к разработке диагностических тестов с детекцией методом гигантского комбинационного рассеяния света (ГКР). Развитие аналитического приборостроения, включая разработку портативных ГКР-анализаторов [5], способствует развитию методов ГКР-диагностики инфекционных заболеваний, в том числе на месте оказания медицинской помощи. Детекция конкретных маркеров вирусных инфекций представлена в небольшом количестве работ, при этом далеко не все предложенные методы пригодны для выявления биомаркеров в клинических образцах, имеющих сложный состав. Вместе с тем, анализ литературы позволяет выделить подходы, основанные на ГКР-детекции результатов иммунохимического анализа, которые, на наш взгляд, могут найти применение в этиологической диагностике вирусных инфекций.

**Эффект гигантского комбинационного рассеяния света.** Явление неупругого (рамановского или, как его называют в русскоязычной литературе, комбинационного) рассеяния (сокращенно КР) света заключается в том, что при взаимодействии лазерного излучения фиксированной частоты  $\omega_L$  с веществом происходят процессы рассеяния света, которые сопровождаются рождением в этом веществе различных мод колебательных или вращательных возбуждений с характерными частотами  $\Omega_i$ , что приводит к появлению новых линий в спектре рассеянного света, которые сдвинуты от лазерной линии  $\omega_L$  на частоты  $+\Omega_i$  (антистоксовская компонента) и  $-\Omega_i$  (стоксовская компонента). Из набора возбужденных состояний  $\Omega_i$ , измеренного по спектру рассеянного света, можно однозначно сделать заключение о природе молекул, из которых состоит исследуемое вещество. Этот факт и обеспечивает ценность метода комбинационного рассеяния света. Однако вероятность процесса КР (отношение числа фотонов, испытавших рассеяние, к числу налетающих фотонов) чрезвычайно мала. Именно поэтому детектирование спектров КР от малого

количества анализируемых молекул является очень трудной задачей. Однако после открытия явления гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) света [8] появилась возможность экспресс-детектирования следового количества биологических молекул [27, 32], осажденных на наноструктурированные металлические подложки. Высокая чувствительность ГКР-методов достигается за счет резонансного усиления электромагнитного поля вблизи поверхности нано-островковых металлических пленок. Согласно современным представлениям, эффект ГКР объясняется комбинацией причин, среди которых доминирующим является электродинамический вклад, связанный с гигантским увеличением локального электрического поля вблизи острых краев шероховатой поверхности металла.

**Общие схемы ГКР-иммуноанализа белковых молекул.** Методы выявления биомакромолекул с применением принципов ГКР часто базируются на твердофазном иммунохимическом анализе «сэндвич-типа», включающем иммобилизацию антител для иммунного захвата на твердой фазе, инкубацию с исследуемым образцом и детектирующими антителами и отделение от несвязавшихся детектирующих антител [12, 21, 26, 30, 34]. Детектирующие антитела связаны с ГКР-репортером, позволяющим произвести индикацию сигнала. Также может использоваться схема, соответствующая «половинке сэндвича» и реализующая иммунный захват антигена [15].

Мультиплексные иммунохимические методы, в которых одновременно выявляются несколько биомаркеров, обладают такими преимуществами, как высокая пропускная способность, малые объемы анализируемых образцов, относительно низкая цена исследования. Рамановские полосы обычно в 10 — 100 раз уже, чем большинство флуоресцентных, что минимизирует возможное перекрывание спектров различных репортеров в выбранном спектральном диапазоне. Спектральное положение рамановских линий не зависит от длины волны возбуждающего излучения, взаимодействующего с молекулой, что делает возможным использовать один и тот же источник лазерного излучения для различных репортерных молекул. Эти особенности делают ГКР-спектроскопию наиболее совместимой с концепцией мультиплексности по сравнению с другими спектроскопическими методами. Для мультиплексного анализа решающее значение имеет подбор спектрально отличающихся репортерных молекул, а также оптимизация их концентрации.

Заслуживает внимания использование пористых мембран для выделения иммунного комплекса и последующей его индикации, в том числе мембран, полученных методом ионно-трековой технологии с нанесенным на их поверхность тонким слоем золота. Проведение иммунохимического анализа базируется как на полном «сэндвич-методе», так и на концентрировании и выделении на поверхности пористой мембраны иммунных комплексов детектируемых антигенов с золотыми наночастицами, одновременно модифицированными антителами к выявляемому аналиту и ГКР-репортером. Применение пористых трековых мембран позволяет повысить чувствительность анализа при уменьшении времени проведения анализа по сравнению с ИФА [26, 30]. Дополнительным преимуществом пористых мембран является возможность использования простых устройств для активного транспорта анализируемого образца и реагентов [26].

Распространенным способом сепарации иммунных комплексов и несвязавшихся детектирующих антител является применение принципов иммуномагнитной сепарации. Проведение реакции антиген-антитело во взвешенном состоянии с применением сенсibiliзованных антителами магнитных микрочастиц позволяет не только обеспечить эффективную сепарацию, но и ускорить реакцию.

**Типы субстратов для иммунохимического ГКР-анализа.** Необходимым составляющим иммунохимического метода с ГКР-детекцией является ГКР-активный субстрат, обеспечивающий не только высокую чувствительность анализа, но и сепарацию иммунных комплексов. Используемые ГКР-активные субстраты могут использоваться в различных формах: в виде пластинок с комбинацией диэлектрических и металлических слоев (ГКР-подложки); димеризованные наночастицы; наночастицы строения «ядро-оболочка»; трехмерные наночастицы; наноструктуры, полученные с помощью литографии [1, 23]. У всех ГКР-активных субстратов наружный слой представлен наноструктурами благородных металлов, преимущественно серебра (Ag) и золота (Au) (наносферы, нанокубы, треугольные и шестиугольные нанопирамиды, нанопроволоки, частицы грибовидной формы) [3, 16, 23, 36] и т.д. ГКР-подложки изготавливаются в виде непористых и пористых субстратов на основе кремния (Si), стекла, поликарбоната и других материалов. Зачастую кроме наружного металлического наноструктурированного слоя при изготовлении ГКР-подложек используются диэлектрические спейсеры, диэлектрические свойства которых играют важную роль в плазмонном резонансе.

Плазмонные и ГКР-свойства золота и серебра сильно зависят от формы, размера, состава частиц и их диэлектрического окружения. С точки зрения сенсорной чувствительности важно, чтобы мнимая часть диэлектрической проницаемости, которая отвечает за потери в среде, была минимальной. Среди всех металлов в оптическом диапазоне наилучшими характеристиками обладает серебро, на втором месте идет золото. Однако субстраты на основе наноструктурированного серебра очень нестабильны, поэтому на практике широкое применение получили более устойчивые золотые или специально приготовленные стабилизированные серебряные субстраты [10, 24].

В ГКР-иммуноанализе широкое применение получили золотые наносферы, меченные ГКР-репортерами и ковалентно связанные с антителами к выявляемому антигену. После образования иммунного комплекса и отмывки от несвязавшихся компонентов, при облучении лазером образующийся иммунный комплекс детектируется ГКР-анализатором [31]. В качестве ГКР-репортеров часто используют флуоресцентные красители, такие как Cy5, R6G, FITC, а также 4-меркаптобензойная кислота, пиридин, 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная кислота), 4,4'-дипиридил, толуидиновый голубой, малахитовый зеленый [2, 4, 9, 22, 24, 29].

Важное значение имеют работы по увеличению стабильности не только серебряных, но и золотых наночастиц. Широко распространенным методом стало изготовление наночастиц по принципу «core/shell» («ядро/оболочка») — покрытие Ag-наночастиц защитным слоем различного происхождения, например, золота или оксида кремния, к которому привязаны антитела и ГКР-репортеры [34]. Такого рода биметаллические Ag+Au или комбинированные Ag+Au+Si субстраты сочетают высокий коэффициент усиления сигнала, присущий серебряным субстратам, с высокой стабильностью [16, 36, 37]. Так, в работе Khaywah M. Y. et al. «core/shell» наночастицы Au–Ag/Au сохраняли высокий коэффициент усиления даже через год хранения при комнатной температуре [14].

Все чаще при конструировании ГКР-биосенсоров используют магнитные частицы. Существенное преимущество таким субстратам дают суперпарамагнитные свойства оксида железа, входящего в состав ядра микрочастиц, что позволяет легко собрать их магнитом, обеспечивая процессы сепарации и отмывки. Оболочка в суперпарамагнитных частицах может быть золотой, конъюгированной с антителами, реже с антигенами [29], либо в системе детекции

применяется два типа частиц, сенсibilизированных антителами — магнитные и золотые, меченные ГКР-репортером [2, 4, 9].

В последних работах часто используют частицы с более сложным строением. Так, были описаны трехслойные частицы с серебряным ядром и двуслойной оболочкой: внутренний слой  $\text{SiO}_2$  и наружный слой  $\text{Ag}$  [19]. Другим примером трехслойных частиц являются «золотые звезды». Ядром в таких частицах выступают золотые наночастицы в форме звезды, внутренняя оболочка представляет собой ГКР-репортер, а наружная — еще один слой  $\text{Au}$  [Yang T. et al., 2016]. Еще одним сложным субстратом являются «золотые наноагрегаты», полученные путем контролируемой агрегации золотых наночастиц, инкапсулированных вместе с ГКР-репортерами в оболочку из оксида кремния [18]. Все эти работы имеют целью повышение чувствительности теста и/или стабильности ГКР-субстратов.

**ГКР-детекция вирусов по «молекулярным отпечаткам пальцев».** В научной литературе представлен ряд работ по ГКР-детекции вирусов в образцах без применения ГКР-репортеров («label-free») — по «молекулярным отпечаткам пальцев», то есть характерным линиям рамановского спектра. Интерпретация получаемых рамановских спектров чистых химических соединений проводится с помощью программного обеспечения ГКР-анализатора путем сличения получаемого спектра с библиотекой спектров разных соединений. Однако ГКР-идентификация даже чистых культур микроорганизмов представляет особую проблему ввиду сложности химического состава их поверхностных элементов и требует применения сложных алгоритмов хемометрического анализа.

В ряде работ описывается ГКР-детекция вирусов без иммунного захвата. В одном исследовании применялись ГКР-активные поверхности на основе наночастиц золота для обнаружения и распознавания препаратов семи видов вирусов млекопитающих [7]. Используя высокоочищенные концентрированные препараты вирусов (от 8 до 9 lg БОЕ/мл), авторам не только удалось обнаружить достоверные различия в спектрах оболочечных и безоболочечных вирусов, но и дифференцировать ГКР-спектры разных вирусов. Во второй работе [6] были проанализированы ГКР-спектры восьми штаммов ротавирусов, относящихся к разным G/P генотипам, и с 96% надежностью выявлены различия между ними. Ротавирусы перед ГКР-анализом размножали в клетках MA-104 и исследовали в виде клеточных лизатов. Прикладное значение подобных работ остается под вопросом, однако они демонстрируют принципиальную возможность выявлять видовые и штаммовые различия между вирусами путем хемометрического анализа получаемых ГКР-спектров.

Применение иммунного захвата с последующим ГКР-анализом по «молекулярным отпечаткам пальцев» позволяет работать с неочищенными препаратами вируса, поскольку перед измерением имеется возможность удалить несвязавшиеся компоненты путем отмывки. Примером использования иммунного захвата антигена с последующей детекцией по характерным ГКР-спектрам, или так называемым «молекулярным отпечаткам пальцев», является работа по выявлению вирусоподобных частиц ВИЧ [15]. В работе продемонстрирована линейная зависимость интенсивности рамановских пиков от логарифма концентрации антигена.

В немногочисленных работах по ГКР-детекции вирусов по «молекулярным отпечаткам пальцев» (безметочная технология) ГКР-спектры для вирусов были получены с использованием концентрированных препаратов коллекционных штаммов вирусов, вирусоподобных частиц, либо лизатов зараженных вирусом клеточных культур. В них не представлены данные по идентификации

вирусов в составе клинических образцов или в смеси двух и более разных вирусов, что, вероятно, связано с высоким уровнем «паразитного» сигнала. Очевидно, что такие результаты не демонстрируют каких-то преимуществ «label-free» ГКР-детекции перед стандартными методами выявления вирусов.

Интересно, что больший прогресс достигнут в работах по безметочной ГКР-идентификации разных видов патогенных бактерий [Wu H. et al., 2015]. Однако и в области диагностики бактериальных инфекций прорыва пока нет, поскольку большинство работ предусматривает длительный этап выделения чистых культур бактерий.

**Выявление вирусных маркеров в иммуноанализе с применением ГКР-репортеров.** Одна из первых работ по иммунохимической ГКР-детекции вирусов посвящена выявлению маркера гепатита В — Hbs-антигена [33]. Твердофазный ГКР-иммуноанализ проводился на силиконовом или кварцевом субстрате с ковалентно иммобилизованными на его поверхности поликлональными антителами к Hbs-антигену. После инкубации с образцами, содержащими Hbs-антиген в различной концентрации, и последующей отмывки иммуночипа проводилась вторая инкубация с золотыми наночастицами, модифицированными 4-меркаптобензойной кислотой и мышинными моноклональными антителами к Hbs-антигену. После химического покрытия золотых наночастиц слоем серебра проводилось измерение ГКР-спектров 4-меркаптобензойной кислоты. По калибровочному графику зависимости интенсивности сигнала при  $1585\text{ см}^{-1}$  от концентрации был определен предел обнаружения Hbs-антигена, который составил  $0,5\text{ нг/мл}$ . Общая продолжительность анализа была более 4 часов, однако авторы статьи не проводили оптимизацию метода.

Более высокая чувствительность выявления Hbs-антигена в плазме была достигнута с использованием ряда технических решений. В работе использованы не только золотые модифицированные наночастицы, но и ГКР-активный стабильный субстрат, ранее разработанный авторами [12]. Детектирующие антитела и ГКР-репортер (основной фуксин) были ковалентно иммобилизованы на поверхности золотых «наноцветов», состоящих из золотых наночастиц. Проведение анализа в микрожидкостном устройстве также повышало эффективность иммунохимической реакции и приводило к улучшению функциональных характеристик метода. Разработанный метод позволил проводить количественное определение Hbs-антигена в низких концентрациях с пределом обнаружения  $0,01\text{ МЕ/мл}$ , что соответствует чувствительности коммерческих иммуноферментных наборов реагентов.

Описан метод выявления нуклеопротеина вируса гриппа на оригинальном ГКР-субстрате, представляющем собой последовательные слои серебра и золота на оксидах индия и олова [13]. Специфичность выявления вирусного белка определяли золотые наночастицы  $25\text{ нм}$ , модифицированные ГКР-репортером ТВВТ (4,4'-тиобисбензентиол) и антителами. Метод с использованием двухслойного субстрата показал четырехкратное усиление по сравнению с однослойным золотым покрытием. Однако следует отметить, что схема проведения анализа выявления нуклеопротеина вируса гриппа А соответствовала прямому иммунохимическому анализу, в котором выявляемый антиген в разных концентрациях ковалентно присоединялся к субстрату. Такой метод непригоден для детекции антигенов в реальных биологических образцах, имеющих сложный белковый состав.

Такой же недостаток присущ методу, предложенному для субтипирования вируса гриппа. ГКР-иммуноанализ включал иммобилизацию выявляемого

антигена на твердой фазе, которой служила нитроцеллюлозная мембрана [18]. После нанесения антигена мембрану инкубировали в суспензии золотых наночастиц, конъюгированных с ГКР-репортером и типоспецифическими антителами к H1N1, H3N2 или H5N1. Авторы заявляют о более высокой чувствительности ГКР-детекции вируса в сравнении с иммуноферментным анализом (30 нг/мл против 1 мкг/мл), проводившимся по аналогичной схеме.

На модели вируса животных (цирковирус свиней 2 типа) изучена эффективность ГКР-иммуноанализа с использованием разветвленных золотых наночастиц, меченных р-меркаптобензойной кислотой и ковалентно связанных с моноклональными антителами к капсидному белку вируса [20]. Предел чувствительности выявления цирковиральных вирионов составил  $8 \times 10^2$  копий/мл, а в опытах на клинических образцах наблюдался удовлетворительный уровень совпадения с результатами ПЦР — 75 и 87,5% для отрицательных и положительных сывороток соответственно.

Оригинальный подход для детекции респираторно-синцитиального вируса (РСВ) заключался в использовании рамановских свойств окисленной формы 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ) [35]. Авторы установили, что только окисленная форма ТМВ имеет выраженный рамановский спектр с максимумами при  $1191 \text{ см}^{-1}$ ,  $1346 \text{ см}^{-1}$  и  $1606 \text{ см}^{-1}$ . Использовались компоненты коммерческого набора для иммуноферментного сэндвич-метода выявления РСВ, основанного на колориметрической детекции результата ферментативной реакции пероксидазы с субстратной системой, включающей ТМВ. Рамановский спектр измерялся после взаимодействия окисленной формы ТМВ с серебряными наночастицами, при этом была достигнута чувствительность в 20 раз выше, чем при колориметрической детекции.

Возможность мультиплексного выявления белков в ГКР-иммуноанализе экспериментально обоснована в ряде работ с использованием модельных антигенов — IgG мыши и человека и онкологических маркеров [17, 28]. Чувствительность выявления модельных антигенов достигала высоких значений — 1 фг/мл с возможностью количественного определения аналита. В работе J.P. Nolan et al. разработаны принципы мультиплексного ГКР-анализа на золотых наночастицах с автоматизированным учетом результатов в проточном ГКР-анализаторе, подобном проточному цитофлуориметру [25]. Одним из преимуществ проточного ГКР-анализатора является применение лишь одного лазера и детектора и потенциально более высокая степень мультиплексности, по сравнению с применением проточных цитофлуориметров. Примером применения мультиплексного ГКР-иммуноанализа вирусных антигенов служит работа J. Neng et al. Описан иммунохимический метод, основанный на ГКР-спектроскопии, для одновременной детекции двух аналитов: поверхностного антигена вируса Лихорадки Западного Нила и капсидного антигена вируса Лихорадки Долины Рифт [21]. Образование сэндвича происходило между парамагнитными частицами, модифицированными поликлональными антителами, специфичными к каждому из целевых маркеров, и золотыми наночастицами с экспонированными на их поверхности парами антитело и ГКР-репортер, также соответствующими каждому из аналитов. Количественное определение антигенов проводилось по зависимости интенсивности рамановских пиков, характерных для каждого из репортеров, от логарифма концентрации. В работе показана высокая чувствительность — предел обнаружения вирусного антигена составил  $\sim 5$  фг/мл в фосфатном буферном растворе и  $\sim 25$  пг/мл в растворе с бычьей сывороткой.

В последние годы в научных публикациях активно ведется поиск оптимального технического решения для создания биосенсоров, сочетающих

специфичность иммунохимического взаимодействия с высокой чувствительностью детекции методом гигантского комбинационного рассеяния света. Однако большинство работ проведено на модельных системах, а чувствительность и специфичность анализа не установлены испытаниями на реальных клинических образцах. В то же время, для традиционных иммунохимических методов, представляющих неотъемлемую часть клинической лабораторной диагностики, разработана обширная реагентная база, приобретен опыт оптимизации функциональных характеристик анализа. Для разработки новой платформы, которая сможет сравниться по своей эффективности с методами ИФА и ПЦР и обеспечит выигрыш в экспрессности и эргономичности метода, необходима опора на эту базу и совместные усилия специалистов различного профиля.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №16-15-10332).*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кукушкин В.И., Гришина Я.В., Егоров С.В., Соловьев В.В., Кукушкин И.В. Комбинированный диэлектрический и плазмонный резонанс для гигантского рассеяния света. Письма в ЖЭТФ. 2016, 8: 572-577.
2. Bao F., Yao J.L., Gu R.A. Synthesis of magnetic Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Au core/shell nanoparticles for bioseparation and immunoassay based on surface-enhanced Raman spectroscopy. Langmuir. 2009, 18: 10782-10787.
3. Charles D.E., Aherne D., Gara M. et al. Versatile solution phase triangular silver nanoplates for highly sensitive plasmon resonance sensing. ACS Nano. 2010, 1: 55-64.
4. Chon H., Lee S., Son S.W. et al. Highly sensitive immunoassay of lung cancer marker carcinoembryonic antigen using surface-enhanced Raman scattering of hollow gold nanospheres. Anal. Chem. 2009, 8: 3029-3034.
5. Driscoll A.J., Harpster M.H., Johnson P.A. The development of surface-enhanced Raman scattering as a detection modality for portable in vitro diagnostics: progress and challenges. Phys. Chem. Chem. Phys. 2013, 47: 20415-20433.
6. Driskell J.D., Zhu Y., Kirkwood C.D. et al. Rapid and sensitive detection of rotavirus molecular signatures using surface enhanced Raman spectroscopy. PLoS One. 2010, 4: e10222.
7. Fan C., Hu Z., Riley L.K. et al. Detecting food- and waterborne viruses by surface-enhanced Raman spectroscopy. J. Food. Sci. 2010, 5: M302-307.
8. Fleischmann M., Hendra P.J., McQuillan A.J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. Chemical Physics Letters. 1974, 2: 163-166.
9. He Y., Wang Y., Yang X. et al. Metal organic frameworks combining CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles as highly efficient SERS sensing platform for ultrasensitive detection of N-terminal Pro-Brain natriuretic peptide. ACS Appl. Mater. Interfaces. 2016, 12: 7683-7690.
10. Jia K., Khaywah M.Y., Li Y. et al. Strong improvements of localized surface plasmon resonance sensitivity by using Au/Ag bimetallic nanostructures modified with polydopamine films. ACS Appl. Mater. Interfaces. 2014, 1: 219-227.
11. Jiang T., Wang X., Zhou J. et al. Hydrothermal synthesis of Ag@MSiO<sub>2</sub>@Ag three core-shell nanoparticles and their sensitive and stable SERS properties. Nanoscale. 2016, 9: 4908-4914.
12. Kaminska A., Witkowska E., Winkler K. et al. Detection of hepatitis B virus antigen from human blood: SERS immunoassay in a microfluidic system. Biosens Bioelectron. 2015, 46: 1-6.
13. Karnorachaia K., Sakamotoa K., Laochareonsukc R. et al. Extrinsic surface-enhanced Raman scattering detection of 1 influenza A virus enhanced by two-dimensional gold@silver core-shell nanoparticle arrays, RSC Advances. 2016, 6: 97791-97799.
14. Khaywah M.Y., Jradi S., Louarn G. et al. Ultrastable, uniform, reproducible, and highly sensitive bimetallic nanoparticles as reliable large scale SERS substrates. J. Phys. Chem. 2015, 46: 26091-26100.
15. Lee J.H., Kim B.C., Oh B.K. et al. Rapid and sensitive determination of HIV-1 virus based on surface enhanced raman spectroscopy. J. Biomed. Nanotechnol. 2015, 12: 2223-2230.



16. Lee K.E., Hesketh A.V., Kelly T.L. Chemical stability and degradation mechanisms of triangular Ag, Ag@Au, and Au nanoprisms. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2014, 24: 12407-12414.
17. Li M., Kang J.W., Sukumar S. et al. Multiplexed detection of serological cancer markers with plasmon-enhanced Raman spectro-immunoassay. *Chem. Sci.* 2015, 7: 3906-3914.
18. Lin Y.J., Wu C.Y., Li T. et al. A rapid and sensitive early diagnosis of influenza virus subtype via surface enhanced Raman scattering. *J. Biosens Bioelectron.* 2014, 5: 150.
19. Lin H.Y., Huang C.H., Hsieh W.H. et al. On-line SERS detection of single bacterium using novel SERS nanoprobe and a microfluidic dielectrophoresis device. *Small.* 2014, 22: 4700-4710.
20. Luo Zh., Li W., Lu D. et al. A SERS-based immunoassay for porcine circovirus type 2 using multi-branched gold nanoparticles. *Microchim. Acta.* 2013, 180: 1501-1507.
21. Neng J., Harpster M.H., Wilson W.C. et al. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) detection of multiple viral antigens using magnetic capture of SERS-active nanoparticles. *Biosens Bioelectron.* 2013, 41: 316-321.
22. Neng J., Harpster M.H., Zhang H. et al. A versatile SERS-based immunoassay for immunoglobulin detection using antigen-coated gold nanoparticles and malachite green-conjugated protein A/G. *Biosens Bioelectron.* 2010, 3: 1009-1015.
23. Netzer N.L., Qiu C., Zhang Y. et al. Gold-silver bimetallic porous nanowires for surface-enhanced Raman scattering. *Chem. Commun. (Camb).* 2011, 34: 9606-9608.
24. Nie S., Emory S.R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *Science.* 1997, 5303: 1102-1106.
25. Nolan J.P., Duggan E., Liu E. et al. Single cell analysis using surface enhanced Raman scattering (SERS) tags. *Methods.* 2012, 3: 272-279.
26. Penn M.A., Drake D.M., Driskell J.D. Accelerated surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)-based immunoassay on a gold-plated membrane. *Anal. Chem.* 2013, 18: 8609-8617.
27. Sheng R. Ni F., Cotton T.M. Determination of purine bases by reversed-phase high-performance liquid chromatography using real-time surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal. Chem.* 1991, 5: 437-442.
28. Shin M.H., Hong W., Sa Y. et al. Multiple detection of proteins by SERS-based immunoassay with core shell magnetic gold nanoparticles. *Vib. Spectrosc.* 2014, 72: 44-49.
29. Wang J., Wu X., Wang C. et al. Facile synthesis of Au-coated magnetic nanoparticles and their application in bacteria detection via a SERS method. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2016, 31: 19958-19967.
30. Wigginton R.K., Vikesland P.J. Gold-coated polycarbonate membrane filter for pathogen concentration and SERS-based detection. *Analyst.* 2010, 6: 1320-1326.
31. Wu L., Wang Z., Zong S. et al. A SERS-based immunoassay with highly increased sensitivity using gold/silver core-shell nanorods. *Biosens Bioelectron.* 2012, 1: 94-99.
32. Xu H., Bjerneld E., Kall M. et al. Spectroscopy of single hemoglobin molecules by surface enhanced Raman scattering. *Phys. Rev. Lett.* 1999, 21: 4357-4360.
33. Xu S., Ji X., Xu W. et al. Immunoassay using probe-labelling immunogold nanoparticles with silver staining enhancement via surface-enhanced Raman scattering. *Analyst.* 2004, 1: 63-68.
34. Yang Y., Shi J., Kawamura G. et al. Preparation of Au-Ag, Ag-Au core-shell bimetallic nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering. *Scripta Materialia*, 2008, 58: 862-865.
35. Zhan L., Zhen S.J., Wan X.Y. et al. A sensitive surface-enhanced Raman scattering enzyme-catalyzed immunoassay of respiratory syncytial virus. *Talanta.* 2016, 148: 308-312.
36. Zhang C., Jiang S.Z., Yang C. et al. Gold@silver bimetal nanoparticles/pyramidal silicon 3D substrate with high reproducibility for high-performance SERS. *Sci. Rep.* 2016, 6: 25243.
37. Zhang X. Du X. Carbon nanodot-decorated Ag@SiO<sub>2</sub> nanoparticles for fluorescence and surface-enhanced Raman scattering immunoassays. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2016, 1: 1033-1040.

*Поступила 25.11.16*

Контактная информация: Борисова Ольга Васильевна, к.х.н.,  
115088, Москва, 1-я Дубровская ул., 15, р.т.(495) 674-54-97