



# В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ



ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-178>

© УШКАЛЕНКО Н.Д., ЕРШ А.В., ФИЛАТОВ П.В., ПОЛТАВЧЕНКО А.Г., 2023

## Ускоренный метод иммуноферментного анализа для выявления ортопоксвирусов

Ушкаленко Н.Д., Ерш А.В., Филатов П.В., Полтавченко А.Г.

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

**Введение.** Массовая вакцинация против натуральной оспы была прекращена в 1980 г. вследствие успешной ликвидации заболевания. В то же время возможность применения вируса натуральной оспы в военных или террористических целях, а также заболевания, вызываемые вирусом оспы обезьян в африканском регионе, а в последнее время и в эндемичных районах других континентов, остаются угрозой для невакцинированного населения. В случаях возникновения этих заболеваний большое значение имеет быстрая диагностика, поскольку от неё зависит скорость и в конечном счёте эффективность лечебных и карантинных мероприятий.

**Цель** – создание набора реагентов для иммуноферментного анализа (ИФА), позволяющего быстро и с высокой чувствительностью выявлять ортопоксвирусы (ОПВ) в клинических образцах.

**Материалы и методы.** Методом одностадийного ИФА оценивали эффективность выявления вирусов в криолизатах образцов культуры клеток CV-1, инфицированных вирусами осповакцины, оспы коров, оспы кроликов и экстремелии, а также в клинических образцах инфицированных кроликов и мышей.

**Результаты.** Показано, что ускоренный вариант ИФА позволяет обнаруживать ОПВ в неочищенных вирусных образцах в диапазоне  $5,0 \times 10^2$ – $5,0 \times 10^3$  БОЕ/мл, а в клинических пробах – при вирусной нагрузке, превышающей  $5 \times 10^3$  БОЕ/мл.

**Заключение.** Анализ включает минимальное число операций и может быть выполнен в течение 45 мин, что позволяет использовать его в условиях повышенного уровня биобезопасности. Ускоренный ИФА изготовлен с использованием поликлональных антител, что значительно упрощает производство диагностической системы и снижает его стоимость.

**Ключевые слова:** ортопоксвирусы; вирус оспы коров; вирус осповакцины; вирус экстремелии; вирус оспы кроликов; клинические образцы; иммуноферментный анализ

**Для цитирования:** Ушкаленко Н.Д., Ерш А.В., Филатов П.В., Полтавченко А.Г. Ускоренный метод иммуноферментного анализа для выявления ортопоксвирусов. *Вопросы вирусологии.* 2023; 68(3): 242-251. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-178> EDN: <https://elibrary.ru/qjivtp>

**Для корреспонденции:** Филатов Павел Владимирович, канд. биол. наук, научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: [filatov\\_pv@vector.nsc.ru](mailto:filatov_pv@vector.nsc.ru)

**Участие авторов:** Ушкаленко Н.Д. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Ерш А.В. – проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных; Филатов П.В. – анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Полтавченко А.Г. – концепция и дизайн исследования, одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

**Финансирование.** Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Этическое утверждение.** Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен этическим комитетом организации (протокол 08-09.2020 от 25.09.2020).

Поступила 11.05.2023

Принята в печать 22.06.2023

Опубликована 30.06.2023

## ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-178>

# The rapid ELISA method for detection of orthopoxviruses

Nikita D. Ushkalenko, Anna V. Ersh, Pavel V. Filatov, Alexander G. Poltavchenko

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

**Introduction.** Following the successful eradication of smallpox, mass vaccination against this disease was discontinued in 1980. The unvaccinated population continues to be at risk of infection due to military use of variola virus or exposure to monkeypox virus in Africa and non-endemic areas. In cases of these diseases, rapid diagnosis is of great importance, since the promptness and effectiveness of therapeutic and quarantine measures depend on it.

**The aim of work** is to develop a kit of reagents for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for fast and highly sensitive detection of orthopoxviruses (OPV) in clinical samples.

**Materials and methods.** The efficiency of virus detection was evaluated by single-stage ELISA in the cryolysate of CV-1 cell culture samples infected with vaccinia, cowpox, rabbitpox, and ectromelia viruses, as well as in clinical samples of infected rabbits and mice.

**Results.** The method of rapid ELISA was shown to allow the detection of OPV in crude viral samples in the range of  $5.0 \times 10^2$ – $5.0 \times 10^3$  PFU/ml, and in clinical samples with a viral load exceeding  $5 \times 10^3$  PFU/ml.

**Conclusions.** The assay involves a minimum number of operations and can be performed within 45 minutes, which makes it possible to use it in conditions of a high level of biosecurity. Rapid ELISA method was developed using polyclonal antibodies, which significantly simplifies and reduces the cost of manufacturing a diagnostic system.

**Keywords:** *orthopoxviruses; cowpox virus; vaccinia virus; ectromelia virus; rabbitpox virus; clinical samples; ELISA*

**For citation:** Ushkalenko N.D., Ersh A.V., Filatov P.V., Poltavchenko A.G. The rapid ELISA method for detection of orthopoxviruses. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(3): 242-251 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-178> EDN: <https://elibrary.ru/qjivtv>

**For correspondence:** Pavel V. Filatov, PhD (Biol.), Research Officer, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: [filatov\\_pv@vector.nsc.ru](mailto:filatov_pv@vector.nsc.ru)

**Information about the authors:**Ushkalenko N.D., <https://orcid.org/0000-0002-2171-7444>Ersh A.V., <https://orcid.org/0000-0002-9220-1250>Filatov P.V., <https://orcid.org/0000-0001-7763-3808>Poltavchenko A.G., <https://orcid.org/0000-0003-2408-5611>

**Contribution:** Ushkalenko N.D. – the study concept and design, conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Ersh A.V. – conducting of the experiments, analysis and interpretation of the data; Filatov P.V. – analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Poltavchenko A.G. – the study concept and design, final approval of the article for publication.

**Funding.** The research was funded by the state budget.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Ethics approval.** Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the institution (protocol code 08-09.2020 dated 25.09.2020).

Received 11 May 2023

Accepted 22 June 2023

Published 30 June 2023

## Введение

По современной классификации род *Orthopoxvirus* подсемейства Chordoroxvirinae семейства Poxviridae включает 9 видов вирусов, из которых четыре – вирусы натуральной оспы (ВНО), оспы обезьян (ВОО), оспы коров (ВОК) и осповакцины (ВОВ) – патогенны для человека [1]. ВОК и ВОВ у человека вызывают локализованные инфекции, купирующиеся самостоятельно в течение 3–4 недель и редко переходящие в генерализованную форму [2]. Инфицирование ВНО

или ВОО приводит к системным заболеваниям, характеризующимся общей интоксикацией, лихорадкой, своеобразными высыпаниями на коже и (или) слизистых оболочках и нередко заканчивающимся летально [2–4]. Эти вирусы высококонтагиозны, устойчивы к факторам внешней среды и могут передаваться различными путями, что позволяет специалистам рассматривать ВНО и ВОО как потенциальные агенты биологического оружия или биотеррористических актов [5, 6]. Если ВНО к 1980 г. ликвидирован в результате массовой вакцинации, то ВОО продолжает

угрожать жизни людей в эндемичных регионах Африки [7]. Кроме того, участвовавшие эпизоды вывоза ВОО за пределы Африки свидетельствуют о его глобальном значении [4, 8]. Последние случаи распространения ВОО за пределами Африки с мая 2022 г. приобрели массовый характер и были зарегистрированы во многих государствах по всему миру. По данным Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC)<sup>1</sup>, с начала 2022 г. и по 12 февраля 2023 г. в 110 странах зарегистрировано 85 802 лабораторно подтвержденных случаев этого заболевания, 97 из которых закончились летально. По данным ВОЗ<sup>2</sup>, в России зарегистрировано два случая ВОО.

В системе мероприятий по борьбе с ВОО (МР 3.1.0290-22)<sup>3</sup> большое значение имеет ранняя диагностика заболевания, так как от этого зависит эффективность профилактических, лечебных и карантинных мероприятий [9]. Диагноз не может быть поставлен только по анамнестическим данным и клиническим признакам, поскольку симптоматика ВОО сходна с проявлениями многих других инфекционных заболеваний. Дифференциальная диагностика может быть проведена лабораторными методами для выявления вирусных частиц, вирусной ДНК или вирусных белков. Выявление морфологически характерных ортопоксвирусов (ОПВ) методом электронной микроскопии (ЭМ) с негативным контрастированием может быть выполнено быстро, но только при концентрации вирусных частиц, превышающей  $10^6$ – $10^8$  вир/мл. Различные варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяют не только выявлять сотни и даже десятки копий вирусной ДНК, но и дифференцировать виды ОПВ, однако такой анализ может быть выполнен в строго контролируемых лабораторных условиях в течение нескольких часов [10–12]. И ЭМ, и ПЦР требуют дорогостоящего оборудования и обученного персонала, что мало подходит для эндемичных африканских регионов с ограниченной лабораторной инфраструктурой [13, 14].

Иммунохимические методы не могут дифференцировать виды ОПВ вследствие выраженной перекрестной реактивности вирусных белков, однако они менее прихотливы к условиям анализа и могут выполняться быстрее ПЦР. Так, известен иммунохроматографический (lateral flow immunoassay) тест Orthopox BioThreat Alert, позволяющий выявить ОПВ в концентрациях  $10^6$ – $10^7$  БОЕ/мл в течение 20–25 мин [9]. Другим примером может служить немецкая иммуно-

фильтрационная система AVICAP (Antibody Immuno Column for Analytical Processes), допускающая достоверное выявление ОПВ при их содержании в образце, превышающем  $10^4$  БОЕ/мл, в течение 45 мин [15]. Оба теста могут выполняться во внелабораторных условиях. Иммуноферментный анализ (ИФА) с захватом антигена хоть и требует регистрирующей аппаратуры, но уже стал рутинным методом, который может быть использован в минимально оснащенной лаборатории. Известен вариант ИФА с использованием сочетания моно- и поликлональных антител, позволяющий регистрировать ОПВ в концентрации, превышающей  $10^4$  БОЕ/мл [16], а также ИФА на основе пары тщательно подобранных моноклональных антител, допускающий детекцию ОПВ при вирусной нагрузке выше  $1 \times 10^3$  БОЕ/мл [15]. Оба метода достигают высокой чувствительности за счёт длительных инкубаций, увеличивающих время анализа примерно до 3 ч.

Ранее мы сообщали о разработке автономного теста, основанного на дот-иммуноанализе с использованием кроличьих поликлональных антител к ВОВ, допускающего выявление ОПВ в концентрации  $10^3$ – $10^4$  БОЕ/мл за 36 мин во внелабораторных условиях [17]. В настоящей статье описан вариант ИФА на основе поликлональных антител, позволяющий провести быструю и чувствительную детекцию ОПВ.

## Материалы и методы

### Материалы

В работе использовали казеин, бычий сывороточный альбумин (БСА), tween-20, сахарозу, готовый к использованию раствор тетраметилбензидина (ТМБ), пероксидазу хрена RZ = 3, Proclin 300, фосфатно-солевой буфер (ФСБ) фирмы Sigma-Aldrich (Германия), а также химические реактивы отечественного производства с квалификацией не ниже ЧДА (чистый для анализа).

### Вирусы

Вирус вакцины штамм LIVP (ВОВ), штамм GRI-90 (ВОК), штамм К-1 (вирус экстремелии – ВЭ) и штамм Утрехт (вирус оспы кроликов – ВОКр). Культивирование и титрование вирусов в монослое клеточной культуры CV-1 выполняли согласно ранее описанной методике [17]. В работе использовали криолизаты инфицированных клеток (два цикла замораживания – оттаивания).

### Клинические образцы

В качестве клинических образцов использовали образцы крови и органов 6-месячного кролика породы шиншилла массой 2,0–2,5 кг, интраназально инфицированного вирусом ВОКр в дозе  $10^4$  БОЕ, и образцы органов мышей линии BALB/c с массой тела 13–16 г, интраназально инфицированных ВОВ (ЛИВП)-4 в дозах  $10^6$  и  $10^8$  БОЕ/животное.

Корочка с пустулы на месте вакцинации человека, отпавшая на 29-е сутки после введения осповакцины, получена из Медсанчасти № 163 в виде обезличенного образца.

<sup>1</sup>CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Monkeypox in the U.S., 2022a. Available at: <https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/response/2022/index.html> (дата обращения: 11 мая 2023).

<sup>2</sup>2022-23 Mpox (Monkeypox) Outbreak: Global Trends World Health Organization Produced on 09 May 2023. Available at: [https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx\\_global/](https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx_global/) (дата обращения: 11 мая 2023).

<sup>3</sup>МР 3.1.0290-22 Методические рекомендации «Противоэпидемические мероприятия, направленные на предупреждение возникновения и распространения оспы обезьян». М., 2022. 27 с.

### Контроли

Для контроля специфичности анализа применяли неинфицированную культуру клеток CV-1, обработанную так же, как вирусные препараты.

В качестве гетерогенных контролей использовали антигены вирусов, вызывающих экзантематозные заболевания: вирус кори (штамм НовО/96), выращенный на монослое клеток Vero, очищенный центрифугированием в градиенте плотности сахарозы и инактивированный прогреванием в течение 1 ч при 56 °С; антиген вируса краснухи и антиген вируса ветряной оспы закупали у фирмы Faron Inc. (Китай). Все гетерогенные контроли использовали в концентрации 1 мкг/мл.

### Антитела

Поликлональные антитела к ВОВ получали из гипериммунной сыворотки кролика путём двукратного осаждения 4М-сульфатом аммония. Иммунизацию кроликов проводили по ранее описанной методике [17].

### Набор для ИФА

Сорбцию антител в 96-луночные высокосорбционные полистироловые планшеты NEST (Nest Biotechnology, Китай) выполняли из ФСБ в объёме 200 мкл/яч в течение 20 ч при 4 °С. Блокировку ячеек в объёме 250 мкл проводили ФСБ, содержащим 0,2% казеина и 1% сахарозы, в течение 1 ч при 37 °С. Планшеты высушивали 12 ч при 30 °С, запаивали в фольгированную упаковку под вакуумом и хранили до использования при 4 °С. Конъюгат поликлональных антител с пероксидазой хрена получали по ранее описанному методу [18]. Полученный конъюгат диализовали против ФСБ, добавляли 50% глицерина и хранили с при –20 °С.

### Выполнение анализа

Анализ образцов выполняли в одну стадию, совмещая инкубации образца и конъюгата. Разведение образцов и конъюгата выполняли в растворе, содержащем ФСБ pH 7,2; 0,1% казеина; 0,5% БСА; 0,2% tween-20; 0,05% фенола и 0,05% Proclin 300. В ячейки сенсibilизированного планшета вносили по 100 мкл рабочего разведения конъюгата, а затем по 100 мкл подготовленных образцов вирусных суспензий или по 30 мкл тканевых гомогенатов. Планшет инкубировали 30 мин в термошейкере («Биосан», Латвия) при 37 °С и 600 об/мин. Отмывали 7 раз раствором ФСБ, содержащим 0,1% tween-20 в объёме 350 мкл/яч, вносили по 200 мкл/яч раствора ТМБ и инкубировали 10 мин в термошейкере при 37 °С и 600 об/мин. Реакцию останавливали добавлением 75 мкл/яч 0,5 М раствора серной кислоты. Регистрацию оптической плотности (ОП) проводили с использованием спектрофотометра Thermo Scientific Varioskan LUX (Thermoscientific, США) при длине волны 450 нм.

### Статистическая обработка

Все эксперименты выполняли в трёх повторах, по данным которых рассчитывали среднее значение ОП ( $M$ ), доверительный интервал ( $\Delta x$ ) для довери-

тельной вероятности 95% ( $p = 0,95$ ) и коэффициент вариации ( $K$ ). На втором этапе, используя данные ИФА серий разведений вирусного препарата (табл. 1), в полулогарифмических координатах строили график зависимости ОП<sub>450</sub> препарата от lg его титра (Т). Строили аппроксимирующую прямую, получали её уравнение и величину достоверности аппроксимации. Расчёты выполняли с использованием статистических функций программы Microsoft Excel. На основании этих данных оценивали ориентировочный титр вирусов в клинических образцах.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен этическим комитетом организации (протокол 08-09.2020 от 25.09.2020).

### Результаты

Результаты оценки чувствительности ИФА при определении культуральных препаратов ОПВ приведены в табл. 1.

Калибровочные графики для ВОВ и ВОКр, построенные на основе данных табл. 1, приведены на рис. 1 и 2 соответственно.

Результаты исследования клинических образцов кролика, инфицированного ВОКр, и расчётные данные о содержании вируса в образцах, полученные по калибровочному графику для ВОКр (рис. 2), приведены в табл. 2.

Характеристики клинических образцов мышей, инфицированных ВОВ, результаты их ИФА и расчётные данные о содержании вируса в образцах, полученные по калибровочному графику для ВОВ (рис. 1), приведены в табл. 3.

### Обсуждение

В предыдущих публикациях мы описывали разработку автономного набора для выявления ОПВ методом дот-иммуноанализа на белковых матрицах с использованием поликлональных антител против ВОВ, как иммобилизованных на подложке антител захвата, так и в качестве антител детекции, связанных с частицами коллоидного золота. При этом мы сравнивали два варианта реализации анализа: двухстадийный, в котором этапы инкубации с образцом и в конъюгате выполняются отдельно, и одностадийный, где эти этапы совмещены. Установлено, что одностадийный вариант позволяет не только сократить время анализа, но и увеличить чувствительность выявления ОПВ в неочищенных вирусных препаратах, по сравнению с двухстадийной постановкой анализа. При этом лимит определения разных видов ОПВ укладывался в диапазон от  $6,2 \times 10^2$  для ВОКр до  $8,0 \times 10^3$  БОЕ/мл для ВОК [19]. Показано, что прирост чувствительности может быть объяснён агрегацией частиц золотого конъюгата на вирионах и субвирусных структурах [20]. В настоящей работе мы попытались реализовать одностадийный (ускоренный) формат ИФА для вы-

Таблица 1. Результаты иммуноферментного анализа культуральных препаратов ортопоксвирусов

Table 1. ELISA results of OPV culture preparations

Образец (штамм) Sample (strain)	Разведения Dilution	Титр, БОЕ/мл Titer, PFU/ml	Результаты ИФА (ОП <sub>450</sub> ), ELISA results (OD <sub>450</sub> ), M ± Δx
Вирус осповакцины (ЛИВП) Vaccinia virus (LIVP)	0	1,1 × 10 <sup>7</sup>	–
	1 : 10	1,1 × 10 <sup>6</sup>	4,302 ± 0,352
	1 : 100	1,1 × 10 <sup>5</sup>	4,211 ± 0,368
	1 : 200	5,5 × 10 <sup>4</sup>	3,965 ± 0,277
	1 : 400	2,7 × 10 <sup>4</sup>	3,256 ± 0,202
	1 : 800	1,3 × 10 <sup>4</sup>	1,901 ± 0,154
	1 : 1600	6,8 × 10 <sup>3</sup>	1,221 ± 0,135
	1 : 3200	3,4 × 10 <sup>3</sup>	0,826 ± 0,082
	1 : 6400	1,7 × 10 <sup>3</sup>	0,374 ± 0,039
	1 : 12 800	8,6 × 10 <sup>2</sup>	0,318 ± 0,025
Вирус оспы коров (GRI-90) Cowpox virus (GRI-90)	0	9,8 × 10 <sup>6</sup>	–
	1 : 100	9,8 × 10 <sup>4</sup>	1,875 ± 0,154
	1 : 200	4,9 × 10 <sup>4</sup>	1,174 ± 0,130
	1 : 400	2,4 × 10 <sup>4</sup>	0,746 ± 0,101
	1 : 800	1,2 × 10 <sup>4</sup>	0,501 ± 0,071
	1 : 1600	6,1 × 10 <sup>3</sup>	0,417 ± 0,044
	1 : 3200	3,0 × 10 <sup>3</sup>	0,292 ± 0,021
	1 : 6400	1,5 × 10 <sup>3</sup>	0,252 ± 0,025
	1 : 12 800	7,6 × 10 <sup>2</sup>	0,240 ± 0,019
	Вирус оспы кроликов (Утрехт) Rabbit poxvirus (Utrecht)	0	1,0 × 10 <sup>6</sup>
1 : 10		1,0 × 10 <sup>5</sup>	1,625 ± 0,172
1 : 100		1,0 × 10 <sup>4</sup>	0,907 ± 0,108
1 : 200		5,0 × 10 <sup>3</sup>	0,654 ± 0,083
1 : 400		2,5 × 10 <sup>3</sup>	0,508 ± 0,054
1 : 800		1,2 × 10 <sup>3</sup>	0,471 ± 0,063
1 : 1600		6,2 × 10 <sup>2</sup>	0,356 ± 0,046
1 : 3200		3,1 × 10 <sup>2</sup>	0,311 ± 0,036
1 : 6400		1,6 × 10 <sup>2</sup>	0,239 ± 0,020
Вирус экстремелии (К-1) Ectromelia virus (K-1)		0	2,3 × 10 <sup>6</sup>
	1 : 100	2,3 × 10 <sup>4</sup>	0,931 ± 0,106
	1 : 200	1,1 × 10 <sup>4</sup>	0,705 ± 0,061
	1 : 400	5,7 × 10 <sup>3</sup>	0,515 ± 0,052
	1 : 800	2,8 × 10 <sup>3</sup>	0,346 ± 0,043
	1 : 1600	1,4 × 10 <sup>3</sup>	0,238 ± 0,037
Контроль клеточной культуры Cell culture control	0	0	0,085 ± 0,031
Гетерогенные контроли Heterologous controls	Антиген вируса ветряной оспы Chickenpox virus antigen	0	0,102 ± 0,037
	Антиген вируса кори Measles virus antigen	0	0,093 ± 0,032
	Антиген вируса краснухи Rubella virus antigen	0	0,097 ± 0,028
Оптическая плотность критическая Optical density critical The cut-off optical density value			0,250

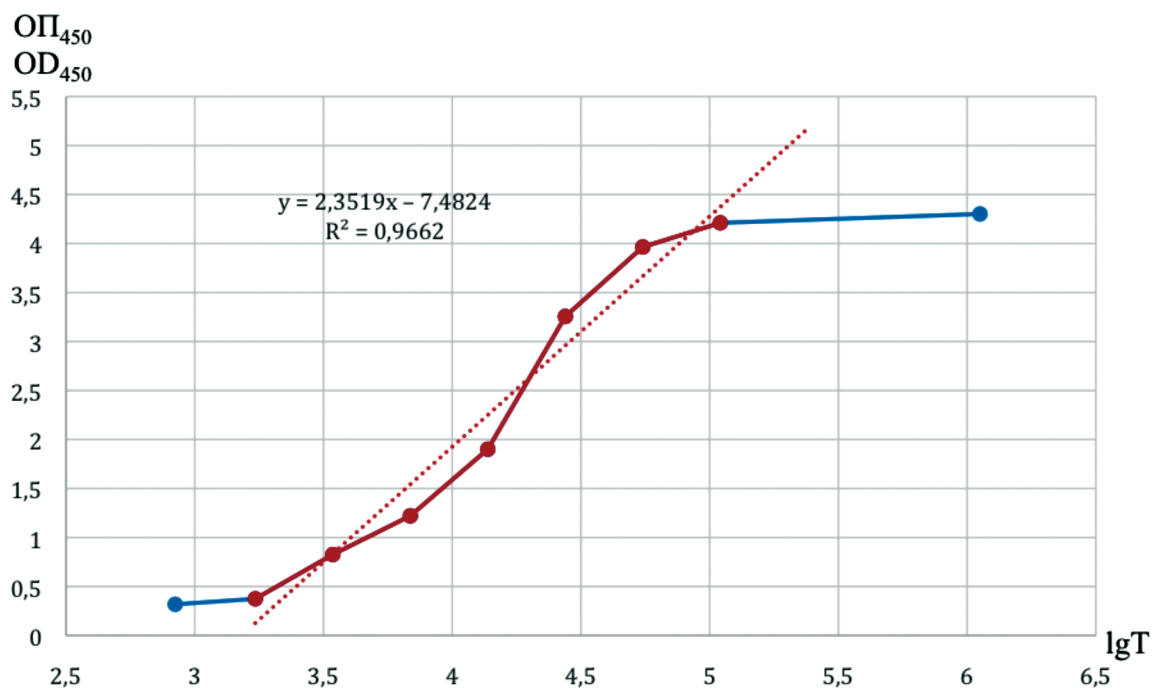


Рис. 1. Калибровочный график для вируса осповакцины

Fig. 1. Calibration plot for vaccinia virus

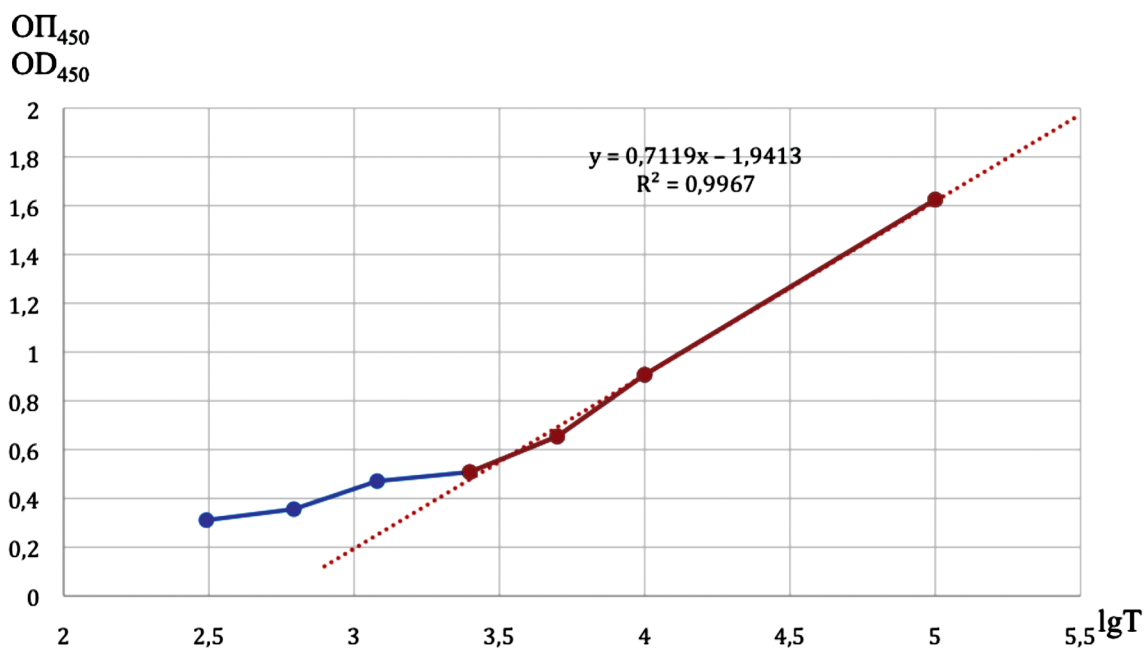


Рис. 2. Калибровочный график для вируса оспы кроликов

Fig. 2. Calibration plot for rabbitpox virus

явления ОПВ в культуральных вирусных препаратах и клинических образцах. Результаты исследования серий двукратных разведений культуральных препаратов ОПВ приведены в табл. 1.

Данные табл. 1 свидетельствуют о том, что ускоренный ИФА со всеми препаратами вирусов обеспечивает более высокую чувствительность, чем дот-иммуно-

анализ на основе тех же антител. Лимит определения всех использованных ОПВ укладывается в диапазон от  $3,1 \times 10^2$  БОЕ/мл для ВОКр до  $3,0 \times 10^3$  БОЕ/мл для ВОК. С учётом возможных погрешностей в титровании вируса и постановке ИФА чувствительность ускоренного варианта выявления ОПВ в неочищенных препаратах можно обозначить диапазоном

**Таблица 2. Ориентировочная оценка титра вируса оспы кролика в клинических образцах инфицированного кролика методом ускоренного иммуноферментного анализа**

**Table 2. Approximate calculation of the titer of rabbitpox virus in a clinical samples from infected rabbit by rapid ELISA method**

Клинический образец Clinical sample	День после заражения Day after infection	Результаты ИФА (ОП <sub>450</sub> ) ELISA results (OD <sub>450</sub> ) <i>M ± Δx</i>	Титр вируса*, БОЕ/мл Titer*, PFU/ml
Сыворотка крови Serum	1	0,094 ± 0,023	Н.д. N.d.
	2	0,084 ± 0,028	Н.д. N.d.
	3	0,092 ± 0,019	Н.д. N.d.
	4	0,604 ± 0,072	3,7 × 10 <sup>3</sup>
	5	0,904 ± 0,103	1,0 × 10 <sup>4</sup>
	6	1,212 ± 0,115	2,7 × 10 <sup>4</sup>
Форменные элементы крови Formed elements of blood	1	0,088 ± 0,039	Н.д. N.d.
	2	0,086 ± 0,035	Н.д. N.d.
	3	0,089 ± 0,035	Н.д. N.d.
	4	0,094 ± 0,015	Н.д. N.d.
	5	0,648 ± 0,081	4,3 × 10 <sup>3</sup>
	6	1,302 ± 0,172	3,6 × 10 <sup>4</sup>
Почка Kidney		0,636 ± 0,076	4,2 × 10 <sup>3</sup>
Селезёнка Spleen		1,583 ± 0,151	9,0 × 10 <sup>4</sup>
Печень Liver		2,194 ± 0,190	6,4 × 10 <sup>5</sup>
Лёгкое Lung		4,483 ± 0,301	1,0 × 10 <sup>9</sup>
Участки кожи с высыпаниями Areas of skin with rashes		2,721 ± 0,188	3,5 × 10 <sup>6</sup>
Оптическая плотность критическая The cut-off optical density value			0,250

**Примечание.** \*Расчётные результаты. Н.д. – нет данных.

**Note.** \*Calculated results. N.d. – no data.

5,0 × 10<sup>2</sup>–5,0 × 10<sup>3</sup> БОЕ/мл. ИФА специфичен и не выявляет взаимодействий с препаратами неинфицированной клеточной культуры и с гетерогенными контролями возбудителей экзантематозных инфекций (корь, краснуха, ветряная оспа). По результатам, приведённым в табл. 1, построены калибровочные графики для ВОВ и ВОКр, использованные далее при оценке титров вирусов в клинических образцах. Графики приведены на рис. 1 и 2.

Для оценки выявления ОПВ в клинических образцах кролика в течение 7 суток с момента заражения до гибели животного из ушной вены отбирали кровь и разделяли каждую пробу на сыворотку и форменные элементы. Форменные элементы суспендировали в физиологическом растворе в соотношении 1 : 10. После гибели кролика отбирали образцы

из разных участков почек, печени, лёгких и селезёнки массой 0,1–0,2 г, а также кусочков кожи из зоны с видимыми высыпаниями (0,5 см<sup>2</sup>) и готовили из них 10% гомогенаты в ФСБ. Отбор и подготовку образцов проводили в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.2970–11<sup>4</sup>. Полученные образцы сыворотки и суспензий из форменных элементов (в объёме 100 мкл) или гомогенатов из тканей органов (в объёме 30 мкл) вносили в ячейки иммуносорбента и выполняли одностадийный ИФА. Результаты исследований приведены в табл. 2.

Из данных табл. 2 видно, что вирус обнаруживается в сыворотке крови инфицированного животного с 4-го дня после заражения, что совпадает с повышением температуры тела, и его содержание резко возрастает в последующие дни. В форменных элементах

Таблица 3. Характеристики и результаты иммуноферментного анализа клинических образцов мышей, инфицированных вирусом осповакцины

Table 3. Characteristics and results of ELISA of clinical specimens from mice infected with VACV

Характеристики образцов Sample characteristics			Результаты ИФА (ОП <sub>450</sub> ), ELISA results (OD <sub>450</sub> ), $M \pm \Delta x$	Титр вируса*, БОЕ/мл Titer*, PFU/ml
инфицирующая доза Infectious dose	орган organ	титр вируса, БОЕ/мл virus titer, PFU/ml		
10 <sup>8</sup> БОЕ/животное PFU/animal	Носовая перегородка со слизистой Nasal septum with mucosa	1,8 × 10 <sup>7</sup>	2,486 ± 0,178	1,7 × 10 <sup>4</sup>
	Лёгкие Lungs	1,8 × 10 <sup>6</sup>	1,925 ± 0,142	1,0 × 10 <sup>4</sup>
	Головной мозг Brain	9,1 × 10 <sup>4</sup>	0,788 ± 0,091	3,3 × 10 <sup>3</sup>
10 <sup>6</sup> БОЕ/животное PFU/animal	Носовая перегородка со слизистой Nasal septum with mucosa	4,0 × 10 <sup>3</sup>	0,338 ± 0,029	2,1 × 10 <sup>3</sup>
	Печень Liver	10	0,089 ± 0,038	Н.д. N.d.
	Селезёнка Spleen	80	0,095 ± 0,031	Н.д. N.d.
	Селезёнка Spleen	0	0,085 ± 0,034	Н.д. N.d.
0	Головной мозг Brain	0	0,085 ± 0,055	Н.д. N.d.
	Лёгкие Lungs	0	0,091 ± 0,04	Н.д. N.d.
Оптическая плотность критическая The cut-off optical density value			0,250	

Примечание. \*Расчётные результаты. Н.д. – нет данных.

Note. \*Calculated results. N.d. – no data.

крови антигены вируса выявляются на сутки позднее. Вирус выявляется во всех исследованных органах погибшего животного. По ориентировочной оценке титра вируса, определённого по калибровочному графику (рис. 2), распределение концентрации ВОКр в органах кролика по убыванию выглядит так: лёгкие, кожа, печень, селезёнка, почка, что согласуется с ранее опубликованными данными титрования вирусов [21] и дот-иммуноанализа [17].

В другой серии экспериментов исследовали органы мышей линии BALB/c (13–16 г), интраназально инфицированных ВОВ (ЛИВП)-4 в дозах 10<sup>6</sup> и 10<sup>8</sup> БОЕ/животное. Для контроля использовали органы здоровых мышей. На 7-е сутки после инфицирования выполняли процедуру эвтаназии с помощью цервикальной дислокации и проводили забор проб органов, из которых готовили 10% гомогенаты на питательной среде DMEM. Титры вирусов методом бляшек на культуре клеток CV-1 определяли после нескольких актов замораживания – оттаивания гомогенатов. Характеристики представленных образцов, результаты их ускоренного ИФА, а также сравнительные данные титров вируса в образцах, полученные путём титрования и оценки по калибровочной кривой (см. рис. 1), приведены в табл. 3.

Данные табл. 3 показывают, что вирусы надёжно определяются в органах мыши, заражённой дозой ВОВ 10<sup>8</sup> БОЕ/животное. При дозе инфицирова-

ния 10<sup>6</sup> БОЕ/животное вирус на пределе чувствительности выявляется только в образце слизистой носа. Таким образом, надёжная детекция методом ИФА ОПВ в гомогенатах органов возможна при вирусной нагрузке, превышающей 5 × 10<sup>3</sup> БОЕ/мл.

Результаты определения содержания вирусов в образцах, полученные методами титрования и расчётом по результатам ИФА, в ряде случаев значительно различаются. Причинами этого могут служить методические различия при приготовлении гомогенатов тканей, а также погрешности аппроксимации данных при построении калибровочных графиков. Кроме того, занижение данных ИФА предположительно может быть связано со стерическими помехами, создаваемыми клеточным дебрисом, при выделении вирусных антигенов на иммуносорбенте. Ранее мы отмечали такие эффекты при обработке криолизатов инфицированных клеток ультразвуком. После такой обработки титры, выявляемые в дот-анализе, снижались, но возвращались к прежним значениям после осаждения дебриса центрифугированием [22]. В любом случае полученные результаты свидетельствуют о том, что оценка титра вирусов по расчётным данным требует критического отношения, особенно в области выходящего за диапазон экспериментальных значений экстраполяционного участка аппроксимирующей кривой.



Сухую корочку массой 0,2 г с места вакцинации человека растирали в фарфоровой ступке, суспендировали в 1 мл ФСБ и выполняли ИФА. Полученный результат ИФА (ОП =  $3,587 \pm 0,11$  оптических единиц) соответствовал титру ВОВ на калибровочном графике (рис. 1), равному  $5 \times 10^5$  БОЕ/мл. Данные согласуются с ранее полученными результатами параллельного титрования гомогената образца и суспензии ВОВ [19].

Таким образом, ускоренный вариант ИФА позволяет в течение 45 мин обнаруживать ОПВ в неочищенных вирусных образцах в диапазоне  $5,0 \times 10^2$ – $5,0 \times 10^3$  БОЕ/мл, а в клинических пробах – при вирусной нагрузке, превышающей  $5 \times 10^3$  БОЕ/мл. Такая чувствительность превышает чувствительность известных систем для внелабораторной (point of care) детекции ОПВ [9, 13] и лишь немного уступает лимиту обнаружения в ИФА с использованием тщательно подобранных пар моноклональных антител [15], но существенно превосходит его по оперативности и простоте выполнения. Кроме того, достоинством описанного выше ИФА является то, что он изготовлен с использованием поликлональных антител, что значительно упрощает производство диагностической системы и снижает её стоимость [16].

Хотя в настоящем исследовании по техническим причинам не были протестированы высокопатогенные для человека ВНО и ВОО, известно, что ОПВ обладают широкой перекрёстной антигенной реактивностью [1–3, 23], и результаты должны быть сходными и для них. ИФА позволяет идентифицировать ОПВ только на уровне рода. Однако в сочетании с анамнестическими данными и характерными симптомами этот метод позволяет предварительно установить заражение патогенными видами поксвирусов, чего достаточно для срочного принятия мер по изоляции и лечению заражённых. Подтверждение инфекции ВОО лучше всего проводить ПЦР, так как это единственный относительно быстрый метод, позволяющий дифференцировать виды ОПВ [11].

### Заключение

Описанный в статье одностадийный вариант ИФА обладает чувствительностью, достаточной для выявления ОПВ в пробах клинических материалов. Анализ включает минимальное число операций и может быть выполнен в течение 45 мин, что позволяет использовать его для идентификации ОПВ на уровне рода в условиях повышенного уровня биобезопасности.

### ЛИТЕРАТУРА

- Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses pathogenic for humans. In: *Orthopoxviruses Pathogenic for Humans*. Springer Science & Business Media; 2005. <https://doi.org/10.1007/b107126> <https://elibrary.ru/ueqvtt>
- Richter J. Poxviruses. In: *Tropical Dermatology*. Elsevier; 2017: 152–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-29634-2.00013-4>
- Buller R.M.L. 170 – Poxviruses. In: Cohen J., Powderly W.G., Opal S.M., eds. *Infectious Diseases*. Elsevier; 2017: 1452–7.e1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00170-2>

- Sklenovská N. Monkeypox virus. In: Malik Y.S., Singh R.K., Dharma K., eds. *Animal-Origin Viral Zoonoses*. Singapore: Springer; 2020: 39–68. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-2651-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-15-2651-0_2)
- Супотницкий М.В. Натуральная оспа, оспа обезьян. В кн.: Супотницкий М.В. *Биологическая война. Введение в эпидемиологию искусственных эпидемических процессов и биологических поражений*. М.: Кафедра, Русская панорама; 2013: 83–86.
- Whitley R.J. Smallpox: a potential agent of bioterrorism. *Antiviral Res.* 2003; 57(1-2): 7–12. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(02\)00195-X](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(02)00195-X)
- Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kivalu N.K., Kinkela T.L., et al. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2010; 107(37): 16262–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005769107>
- Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12): e1003756. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003756>
- Townsend M.B., MacNeil A., Reynolds M.G., Hughes C.M., Olson V.A., Damon I.K., et al. Evaluation of the Tetracore Orthopox Bio-Threat® antigen detection assay using laboratory grown orthopoxviruses and rash illness clinical specimens. *J. Virol. Methods.* 2013; 187(1): 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.08.023>
- Gavrilova E.V., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Development of real-time PCR assay for specific detection of cowpox virus. *J. Clin. Virol.* 2010; 49(1): 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.06.003> <https://elibrary.ru/mxekaf>
- Shchelkunov S.N., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V. Species-specific identification of variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses by multiplex real-time PCR assay. *J. Virol. Methods.* 2011; 175(2): 163–9. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.05.002>
- Максютов Р.А. Комплексный подход к видоспецифичной детекции вируса оспы коров. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2016; (4): 60–3. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-60-63> <https://elibrary.ru/xgsxtz>
- Stern D., Olson V.A., Smith S.K., Pietraszczyk M., Miller L., Miethel P., et al. Rapid and sensitive point-of-care detection of Orthopoxviruses by ABICAP immunofiltration. *Virol. J.* 2016; 13(1): 207. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0665-5>
- Rimoin A.W., Graham B.S. Whither monkeypox vaccination. *Vaccine.* 2011; 29(Suppl. 4): D60–4. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.004>
- Stern D., Pauly D., Zydek M., Miller L., Piesker J., Laue M., et al. Development of a genus-specific antigen capture ELISA for orthopoxviruses – target selection and optimized screening. *PLoS One.* 2016; 11(3): e0150110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150110>
- Czerny C.P., Meyer H., Mahnel H. Establishment of an ELISA for the detection of orthopox viruses based on neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 1989; 36(7): 537–46. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1989.tb00641.x>
- Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Филатов П.В., Ушкаленко Н.Д., Якубицкий С.Н., Сергеев А.А. и др. Ускоренный способ выявления ортопоксвирусов. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2021; (3): 106–13. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-3-106-113> <https://elibrary.ru/ywbpsy>
- Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12): 1084–91. <https://doi.org/10.1177/22.12.1084>
- Ushkalenko N., Ersh A., Sergeev A., Filatov P., Poltavchenko A. Evaluation of rapid dot-immunoassay for detection orthopoxviruses using laboratory-grown viruses and animal's clinical specimens. *Viruses.* 2022; 14(11): 2580. <https://doi.org/10.3390/v14112580>
- Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Таранов О.С., Якубицкий С.Н., Филатов П.В. Быстрый иммунохимический метод выявления ортопоксвирусов (Orthopoxvirus, Chordopoxvirinae, Poxviridae). *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(6): 291–7. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-291-297> <https://elibrary.ru/tjsbcf>
- Сергеев А.А., Булычев Л.Е., Пьянков О.В., Сергеев А.А., Боднев С.А., Кабанов А.С. и др. Чувствительность различных видов животных к вирусу оспы обезьян. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2012; (1): 88–91. [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-1\(111\)-88-91](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-1(111)-88-91) <https://elibrary.ru/orihiz>

22. Poltavchenko A., Ersh A., Filatov P., Yakubitskiy S. Rapid protocol of dot-immunoassay for orthopoxviruses detection. *J. Virol. Methods*. 2020; 279: 113859. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113859> <https://elibrary.ru/wxwshr>
23. Gilchuk I., Gilchuk P., Sapparapu G., Lampley R., Singh V., Kose N., et al. Cross-neutralizing and protective human antibody specificities to poxvirus infections. *Cell*. 2016; 167(3): 684–94.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.049>

## REFERENCES

1. Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses pathogenic for humans. In: *Orthopoxviruses Pathogenic for Humans*. Springer Science & Business Media; 2005. <https://doi.org/10.1007/b107126> <https://elibrary.ru/ueqvtt>
2. Richter J. Poxviruses. In: *Tropical Dermatology*. Elsevier; 2017: 152–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-29634-2.00013-4>
3. Buller R.M.L. 170 – Poxviruses. In: Cohen J., Powderly W.G., Opal S.M., eds. *Infectious Diseases*. Elsevier; 2017: 1452–7.e1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00170-2>
4. Sklenovská N. Monkeypox virus. In: Malik Y.S., Singh R.K., Dharma K., eds. *Animal-Origin Viral Zoonoses*. Singapore: Springer; 2020: 39–68. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-2651-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-15-2651-0_2)
5. Supotnitskiy M.V. Natural smallpox, monkeypox. In: Supotnitskiy M.V. *Biological Warfare. Introduction to the Epidemiology of Artificial Epidemic Processes and Biological Diseases [Biologicheskaya voyna. Vvedenie v epidemiologiyu iskusstvennykh epidemicheskikh protsessov i biologicheskikh porazheniy]*. Moscow: Kafedra, Russkaya panorama; 2013: 834–86. (in Russian)
6. Whitley R.J. Smallpox: a potential agent of bioterrorism. *Antiviral Res.* 2003; 57(1-2): 7–12. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(02\)00195-X](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(02)00195-X)
7. Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kivalu N.K., Kinkela T.L., et al. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010; 107(37): 16262–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005769107>
8. Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12): e1003756. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003756>
9. Townsend M.B., MacNeil A., Reynolds M.G., Hughes C.M., Olson V.A., Damon I.K., et al. Evaluation of the Tetracore Orthopox BioThreat® antigen detection assay using laboratory grown orthopoxviruses and rash illness clinical specimens. *J. Virol. Methods*. 2013; 187(1): 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.08.023>
10. Gavrilova E.V., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Development of real-time PCR assay for specific detection of cowpox virus. *J. Clin. Virol.* 2010; 49(1): 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.06.003> <https://elibrary.ru/mxekaf>
11. Shchelkunov S.N., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V. Species-specific identification of variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses by multiplex real-time PCR assay. *J. Virol. Methods*. 2011; 175(2): 163–9. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.05.002>
12. Maksyutov R.A. Complex approach to species-specific detection of cowpox virus. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2016; (4): 60–3. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-60-63> <https://elibrary.ru/xgsxtz> (in Russian)
13. Stern D., Olson V.A., Smith S.K., Pietraszczyk M., Miller L., Miethel P., et al. Rapid and sensitive point-of-care detection of Orthopoxviruses by ABICAP immunofiltration. *Virol. J.* 2016; 13(1): 207. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0665-5>
14. Rimoin A.W., Graham B.S. Whither monkeypox vaccination. *Vaccine*. 2011; 29(Suppl. 4): D60–4. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.004>
15. Stern D., Pauly D., Zydek M., Miller L., Piesker J., Laue M., et al. Development of a genus-specific antigen capture ELISA for orthopoxviruses – target selection and optimized screening. *PLoS One*. 2016; 11(3): e0150110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150110>
16. Czerny C.P., Meyer H., Mahnel H. Establishment of an ELISA for the detection of orthopox viruses based on neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 1989; 36(7): 537–46. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1989.tb00641.x>
17. Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Filatov P.V., Ushkalenko N.D., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., et al. Rapid detection of orthopoxviruses. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2021; (3): 106–13. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-3-106-113> <https://elibrary.ru/ywbpsy> (in Russian)
18. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12): 1084–91. <https://doi.org/10.1177/22.12.1084>
19. Ushkalenko N., Ersh A., Sergeev A., Filatov P., Poltavchenko A. Evaluation of rapid dot-immunoassay for detection orthopoxviruses using laboratory-grown viruses and animal’s clinical specimens. *Viruses*. 2022; 14(11): 2580. <https://doi.org/10.3390/v14112580>
20. Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Taranov O.S., Yakubitskiy S.N., Filatov P.V. Rapid immunochemical method for the detection of orthopoxviruses (Orthopoxvirus, Chordopoxvirinae, Poxviridae). *Voprosy virusologii*. 2019; 64(6): 291–7. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-291-297> <https://elibrary.ru/tjsbcf> (in Russian)
21. Sergeev A.A., Bulychev L.E., P’yankov O.V., Sergeev A.A., Bodnev S.A., Kabanov A.S., et al. Sensitivity of different animal species to monkeypox virus. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2012; (1): 88–91. [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-1\(111\)-88-91](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-1(111)-88-91) <https://elibrary.ru/orihiz> (in Russian)
22. Poltavchenko A., Ersh A., Filatov P., Yakubitskiy S. Rapid protocol of dot-immunoassay for orthopoxviruses detection. *J. Virol. Methods*. 2020; 279: 113859. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113859> <https://elibrary.ru/wxwshr>
23. Gilchuk I., Gilchuk P., Sapparapu G., Lampley R., Singh V., Kose N., et al. Cross-neutralizing and protective human antibody specificities to poxvirus infections. *Cell*. 2016; 167(3): 684–94.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.049>