



Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Таранов О.С., Якубицкий С.Н., Филатов П.В.

Быстрый иммунохимический метод выявления ортопоксвирусов (*Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*)

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

Введение. Значительное снижение популяционного иммунитета к поксвирусам вследствие отмены всеобщей вакцинации против оспы сделало основную часть населения восприимчивой к заражению патогенными ортопоксвирусами. Тяжелые последствия такого заражения обуславливают необходимость разработки чувствительных и оперативных методов индикации патогенов.

Цель исследования – разработка чувствительного, быстрого и простого в применении иммунохимического метода для выявления ортопоксвирусов во внелабораторных условиях.

Материал и методы. В работе использовали культуральный вирус осповакцины (ВОВ) с разной степенью очистки и кроличьи поликлональные антиоспенные антитела класса IgG. Анализ выполняли на основе ранее разработанного набора для дот-иммуноанализа на плоских белковых матрицах.

Результаты и обсуждение. Установлено, что одностадийный дот-иммуноанализ может быть выполнен с использованием поликлональных антител как в качестве иммобилизованного на подложке реагента захвата, так и связанного с частицами коллоидного золота реагента детекции. Показана обратная зависимость эффективности выявления ВОВ от степени очистки препаратов от субвирусных структур. В неочищенном препарате чувствительность ускоренного определения вируса оказалась примерно в 30 раз выше, чем в чистом вирусном материале. Увеличение чувствительности, вероятно, происходит за счёт формирования на субвирусных структурах крупных агрегатов сенсibilизированных частиц золота и одновременного связывания их с антителами захвата на подложке. Тест специфичен и не выявляет перекрёстных реакций с гетерогенными вирусами, вызывающими экзантематозные заболевания.

Заключение. Ускоренный вариант дот-иммуноанализа позволяет сократить определение до 40 мин и обеспечить чувствительность выявления ВОВ в неочищенных вирусных препаратах до диапазона 10^5 – 10^4 БОЕ/мл. Полная укомплектованность, простота выполнения анализа и возможность визуального учёта результатов позволяют применять тест во внелабораторных условиях.

Ключевые слова: ортопоксвирусы; быстрое выявление; плоские белковые матрицы; дот-иммуноанализ.

Для цитирования: 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): 291-297.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-291-297>

Информация об авторах:

Полтавченко А.Г., <https://orcid.org/0000-0003-2408-5611>

Ерш А.В., <https://orcid.org/0000-0002-9220-1250>

Таранов О.С., <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>

Филатов П.В. <https://orcid.org/0000-0001-7763-3808>

Для корреспонденции: Полтавченко Александр Георгиевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела разработки и производства средств диагностики вирусных заболеваний ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область; <https://orcid.org/0000-0003-2408-5611>. E-mail: poltav@vector.nsc.ru

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*)

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia

Introduction. The abolition of smallpox vaccination has led to the disappearance of population immunity to pox viruses. However, the threat of infection by pathogenic orthopoxviruses persists and determines the need to develop sensitive and operational methods for indicating pathogens.

Objectives and purposes. Development of a sensitive, fast and easy-to-use immunochemical test for the detection of orthopoxviruses in the «point of care» format.

Material and methods. We used preparations of cultural vaccinia virus (VV) with varying degrees of purification, polyclonal antibodies from hyperimmune rabbit serum, and equipment from a previously developed autonomous kit for dot-immunoassay on flat protein arrays.

Results and discussion. It has been established that rabbit polyclonal antibodies can be used in a single-stage dot-analysis, both as a capture agent immobilized on a substrate and as a detection reagent bound with colloidal gold particles. It is shown that the effectiveness of the detection of VV is inversely related to the degree of purification of viruses from sub-viral structures. The sensitivity of the rapid detection of viruses in a crude preparation was about 30 times higher than in pure viral material. The increase in sensitivity, presumably, occurs due to binding to the capture antibodies of sub-viral structures, which form large aggregates of sensitized gold particles. The test does not detect cross-reactions with heterogeneous viruses (measles, rubella and chickenpox) that cause exantematous diseases.

Conclusion. The one-stage variant of the dot-immunoassay reduces the analysis time to 40 minutes and improves the detection sensitivity of orthopoxviruses in crude viral preparations to the range of 10^5 - 10^4 PFU / ml. Full makeup, ease of analysis and the ability to visually accounting for results allow the test to be used outside of laboratories.

Keywords: *orthopoxviruses; rapid detection; plane protein arrays; dot-immunoassay.*

For citation: 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 (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(6): 291-297. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-291-297>

For correspondence: Alexandr G. Poltavchenko, Dr. Sci. Biol., Lead Researcher of the department of State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-2408-5611>. E-mail: poltav@vector.nsc.ru

Information about authors:

Poltavchenko A.G., <https://orcid.org/0000-0003-2408-5611>

Ersh A.V., <https://orcid.org/0000-0002-9220-1250>

Taranov O.S., <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>

Filatov P.V., <https://orcid.org/0000-0001-7763-3808>

Acknowledgments. The study was conducted under state assignment GZ-9/19.

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

Received 20 November 2019

Accepted 28 November 2019

Введение

Значительное снижение популяционного иммунитета к поксвирусам вследствие отмены всеобщей вакцинации против оспы сделало основную часть населения восприимчивой к заражению патогенными ортопоксвирусами. Однако прекращение рутинной иммунизации против поксвирусов и сохранение вируса натуральной оспы в архивных хранилищах создали возможность для преднамеренного высвобождения и использования вируса натуральной оспы или модифицированного вируса натуральной оспы в качестве биологического оружия или агента биотеррора [1]. Кроме того, описаны многочисленные случаи заражения другими патогенными для человека ортопоксвирусами, такими как вирус оспы обезьян, в том числе и в неэндемичных регионах. Специалисты не исключают возможности возникновения в природе других не менее патогенных ортопоксвирусов [2]. Восприятие этой угрозы привело к тому, что значительное число исследовательских учреждений возродило изучение биологии поксвирусов, а также разработку новых средств их профилактики, диагностики и лечения.

Диагностика таких заболеваний должна быть оперативной, поскольку от неё зависит эффективность лечебных и карантинных мероприятий. Диагноз инфекции может быть установлен лабораторными методами, основанными на выявлении ДНК вируса или родоспецифических антигенов. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), в том числе её экспрессные варианты, позволяют выявлять сотни [3] и даже десятки [4] копий вирусной ДНК и дифференцировать виды ортопоксвирусов. Однако выполнение ПЦР-анализа требует строго контролируемых лабораторных условий, дорогостоящего оборудования и реагентов [5].

Иммунохимические тесты менее чувствительны, чем ПЦР, обычно они позволяют определять специфические антигены в диапазоне концентраций от 10 до 0,1 нг/мл. Однако такая чувствительность

более чем достаточна при анализе проб окружающей среды после биологической атаки или содержимого оспенных пуштул, где вирусы могут присутствовать в огромных количествах [6]. Кроме того, недостатком иммунодиагностики является неспособность иммунохимических тестов дифференцировать виды ортопоксвирусов вследствие выраженной перекрёстной реактивности их антигенных детерминант, однако в совокупности с характерными симптомами эти методы позволяют установить инфицированность патогенными видами поксвирусов, что позволяет принять неотложные меры по изоляции и лечению пациентов.

С другой стороны, методы иммунодиагностики менее прихотливы, чем ПЦР, к условиям выполнения анализа и позволяют более оперативно получать результаты. Известны иммунохимические тесты, позволяющие с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять патогены как в лабораторных, так и в полевых условиях в течение 20–40 мин [7]. Они полностью укомплектованы и выполняются путём несложных манипуляций с простой интерпретацией результатов, что важно при проведении анализа в соответствии с протоколами BSL 3 или 4 биоконтроля.

Ранее мы сообщали о разработке иммунохимических тестов на основе плоских белковых матриц. Такие тесты автономны, просты в применении, снабжены встроенными контролями, допускают визуальный учёт результатов и позволяют оперативно выполнять анализ во внелабораторных условиях [8, 9].

Цель настоящей работы – создание на базе указанных разработок чувствительного, простого в применении и оперативного иммунохимического теста для выявления ортопоксвирусов в формате «у постели больного».

Материал и методы

BOB1 – вирус осповакцины (ВОВ) штамм ЛИВП, наработанный на перевиваемой культуре клеток поч-

ки африканской зелёной мартышки (линия 4647) и ростовой питательной среды ДМЕМ, содержащей 2% телячьей эмбриональной сыворотки. После достижения максимального цитопатического эффекта инфицированные клетки разрушали троекратным замораживанием и оттаиванием и ультразвуковой обработкой. Избавлялись от клеточного дебриса низкоскоростным центрифугированием (5000 об/мин в течение 15 мин при 4 °С) и осаждали вирусный материал высокоскоростным центрифугированием (14 000 об/мин в течение 2 ч при 4 °С) с использованием «подушки» из 30% сахарозы. Инфекционный титр вируса определяли безагарозным методом бляшек на культуре клеток 4647. Биологическая активность препарата BOB1 составляла $3 \cdot 10^8$ БОЕ/мл.

BOB2 получали так же, как BOB1, за исключением того, что осаждение вируса высокоскоростным центрифугированием выполняли без сахарозной «подушки». Биологическая активность препарата BOB2 составляла $6,9 \cdot 10^8$ БОЕ/мл.

Антиген вируса кори, штамм НовО/96 получали культивированием на монослое клеток Vero, очищали и концентрировали в градиенте плотности сахарозы. Вирусную активность инактивировали прогреванием в течение 1 ч при 56 °С.

Антиген вируса краснухи, представляющий собой композицию рекомбинантных белков E1, E2 и С, закупали у фирмы «Капель» (Москва, Россия).

Антиген вируса ветряной оспы (Varicella native antigen кат. № FPZ0039) закупали у фирмы Faron Inc. (Китай).

Am1 – противооспенные антитела класса IgG из сыворотки иммунизированного кролика выделяли осаждением сульфатом аммония [10].

Am2 – нормальные антитела класса IgG из сыворотки неиммунизированного кролика выделяли осаждением сульфатом аммония.

Иммунозоль (Au-Am1). Получение золей золота (15–20 нм) восстановлением тетрахлорзолотой кислоты цитратом натрия, коагуляционный тест для определения дозы нагрузки золя At1 и процедуру нагрузки проводили, как описано ранее [11]. Полученный иммунозоль стабилизировали добавлением бычьего сывороточного альбумина до 1%. Очистку иммунозоль проводили центрифугированием при 15 000 г в течение 30 мин при 4 °С.

Электронная микроскопия. Изучали морфологию и определяли физический титр вирусной суспензии на медных сеточках, покрытых плёнкой-подложкой из формвара и стабилизированных углеродом. Для контрастирования биокомпонентов препараты окрашивали 2% водным раствором уранилацетата по общепринятой методике. Образцы исследовали под электронным микроскопом JEM 1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Фотосъёмку проводили встроенной цифровой камерой «Jeol» и цифровой камерой бокового вывода «Veleta» (SIS, Германия). Анализ и обработку изображения осуществляли с помощью программного пакета iTEM (SIS, Германия).

Белковые матрицы. Подложки белковых матриц вырубали из синтетической бумаги на основе поливинилхлорида «Pentaprint» марки PR-M480/09-07/8101-2D8 (Klöckner Pentaplast, Германия) с применением типографского пресса, отмывали дистиллированной водой и высушивали. Иммунореагенты разводили на 0,005 М боратном буферном растворе (pH 6,0) и наносили на лицевую сторону [12] рабочей зоны каждой подложки аликвотами по 2 мкл по схеме: в верхней части (тестовая зона) наносили специфические антитела At1, в средней части (зона отрицательного контроля) – антитела нормальной сыворотки At2, а в нижней (зона положительного контроля) – вирусный препарат BOB2. Рабочие разведения иммунореагентов подбирали эмпирически. Матрицы высушивали в течение 20 ч при 50 °С, блокировали погружением на 2 ч в 0,2% раствор казеина на 0,01 М фосфатном буферном растворе (pH 7,4), тщательно просушивали и использовали в работе.

Аналитические ванны. Анализ выполняли в многоячеечных полипропиленовых аналитических ваннах, содержащих 5 блоков по 12 рядов ячеек, заполненных готовыми растворами. Для отмывок использовали ФСБ-Т (0,02 М натрий-фосфатный буферный раствор, содержащий 0,8% NaCl, 0,1% твин-20 и 0,1% азида натрия, pH 7,2) и дважды дистиллированную воду; для разведения образцов – ФСБ-Т, содержащий 0,02% казеина, pH 8,0; для разведения иммунозоль – ФСБ-Т, содержащий 0,02% ПЭГ-20 000, pH 7,4. Для проявления использовали ячейки, содержащие по таблетке (4 мг) сухого компонента физического проявителя (смесь метола и лимонной кислоты в соотношении 2 : 5). При получении проявителя в ячейки с таблетками сухой смеси добавляли по 200 мкл бидистиллированной воды для растворения таблеток и непосредственно перед проявлением вносили в ячейки по 200 мкл 0,4% раствора нитрата серебра. Для усиления и стабилизации окраски использовали ячейки, содержащие раствор 1% тиомочевины и 1% NaOH в дистиллированной воде.

Дот-иммуноанализ выполняли при температуре от 20 до 25 °С с объёмом рабочих растворов в ячейках аналитической ванны 0,3–0,4 мл.

В рутинной (двухстадийной) постановке вирусные препараты вносили в ряд ячеек аналитической ванны, заполненных раствором для разведения образцов; погружали в них белковые матрицы и инкубировали 25 мин; дважды отмывали матрицы ФСБ-Т; инкубировали 25 мин с рабочим разведением иммунозоль, дважды отмывали ФСБ-Т и дважды дистиллированной водой, проявляли, отмывали водой, усиливали оптический сигнал в щелочном растворе тиомочевины, ополаскивали водой и визуально учитывали результаты. Положительным считали образец, формирующий ясно различимое тёмное пятно в тестовой зоне белковой матрицы при интенсивном окрашивании зоны положительного контроля и отсутствии окраски в зоне отрицательного контроля.

В ускоренной (одностадийной) постановке вирус-

ные препараты вносили в ряд ячеек ванны, заполненных иммунозолом; инкубировали матрицы 25 мин в полученной смеси и далее выполняли отмыжки и проявление так, как описано для рутинного метода. Схемы анализов представлены на рис. 1.

Результаты

Результаты оценки специфичности дот-иммуноанализа с использованием различных разведений иммунозоля приведены на рис. 2.

Результаты выявления BOB1 и BOB2 в двух- и одностадийном дот-иммуноанализе приведены на рис. 3 и в таблице.

Электронно-микроскопические снимки смесей вирусных препаратов с иммунозолом приведены на рис. 4.

Обсуждение

В настоящей работе использована платформа для дот-иммуноанализа маркёров инфекционных заболеваний, включающая плоские белковые матрицы и многоячеечные аналитические ванны, позволяющая выполнять анализ при комнатной температуре во внелабораторных условиях. Дот-анализ основан на применении иммунозоль – коллоидного золота, связанного с детекторными антителами. Концентрация (рабочее разведение) иммунозоля в системе влияет как на чувствительность, так и на специфичность анализа. Использование слишком разбавленных золь снижает чувствительность определения аналита, а высокие концентрации могут формировать неспецифические оптические сигналы в тестовой зоне.

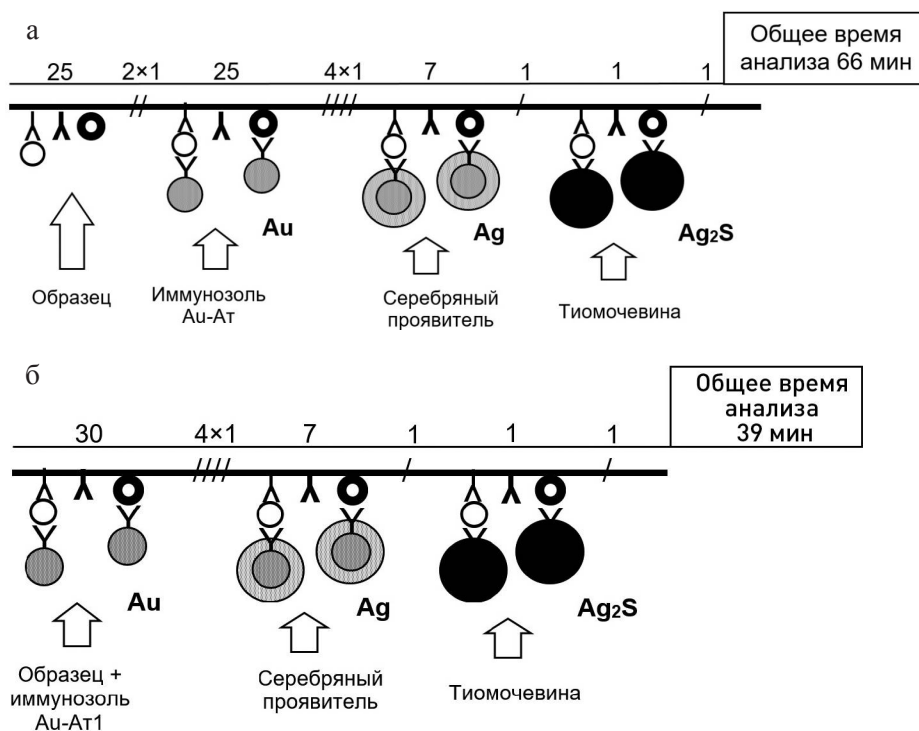


Рис. 1. Принципиальные схемы дот-иммуноанализа антигенов ортопоксвирусов с использованием золь золота, связанных с поликлональными антителами, серебряного проявления, а также стабилизации оптического сигнала щелочным раствором тиомочевина.

а – рутинная двухстадийная постановка; б – экспрессная одностадийная постановка.

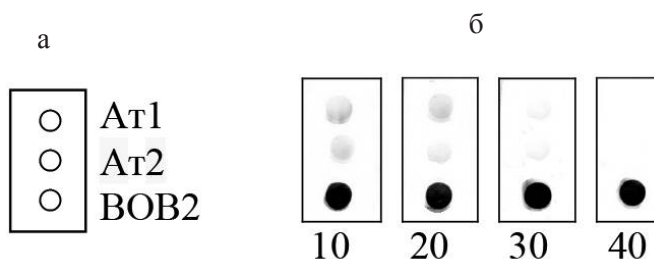


Рис. 2. Влияние разведения иммунозоля на специфичность анализа.

а – схема размещения иммунореагентов захвата на подложке белковой матрицы; б – вид матриц, не имевших контакта с вирусным материалом, после выполнения анализа с различными разведениями иммунозоля. Цифры под матрицами указывают факторы разведений золь. Расшифровка аббревиатур дана в тексте.

и в зоне отрицательного контроля. Результаты эксперимента по выбору оптимального разведения золя приведены на рис. 2. Матрицы, не контактировавшие с вирусом, обрабатывали разными разведениями иммунозоля и проявляли. Отчётливо видно прямое связывание иммунозоля с антителами как из специфической, так и из нормальной кроличьей сыворотки в разведениях золя менее 1 : 40. Таким образом, дальнейшие эксперименты выполняли с рабочим разведением иммунозоля 1 : 50.

Рутинная постановка дот-анализа предусматривает выполнение ряда последовательных операций (см. рис. 1, а). Сначала матрицу инкубируют с исследуемым образцом и вирусные антигены (если они есть в пробе) связываются со специфическими антителами захвата на подложке. На второй стадии подложку обрабатывают иммунозолом, при этом сенсibilизированные частицы коллоидного золота связываются с выделенными из пробы антигенами. Далее следуют процедуры проявления (осевшие на подложке частицы золота катализируют восстановление серебра из раствора, содержащего соль серебра и слабый восстановитель) и стабилизации окраски (осевшее на подложку серебро переводится в интенсивно окрашенный и химически стабильный сульфид серебра). Все операции чередуются с отмывками от несвязавшихся компонентов. Общее время выполнения двухстадийного анализа составляет 60–70 мин.

Сократить время анализа можно за счёт совмещения стадий инкубации белковых матриц в образце и иммунозоле и уменьшения числа отмывок (см. рис. 1, б). Обычно одностадийные варианты иммунохимического анализа выполняют с использованием пары моноклональных антител против разных антигенных детерминант анализата. Один вид антител служит реагентом захвата на подложке, а второй – реагентом детекции, связанным с иммунозолом. При использовании в таком варианте постановки анализа поликлональных антител связывание вирусных структур с антителами на иммунозоле и подложке матрицы происходит параллельно. Однако поскольку

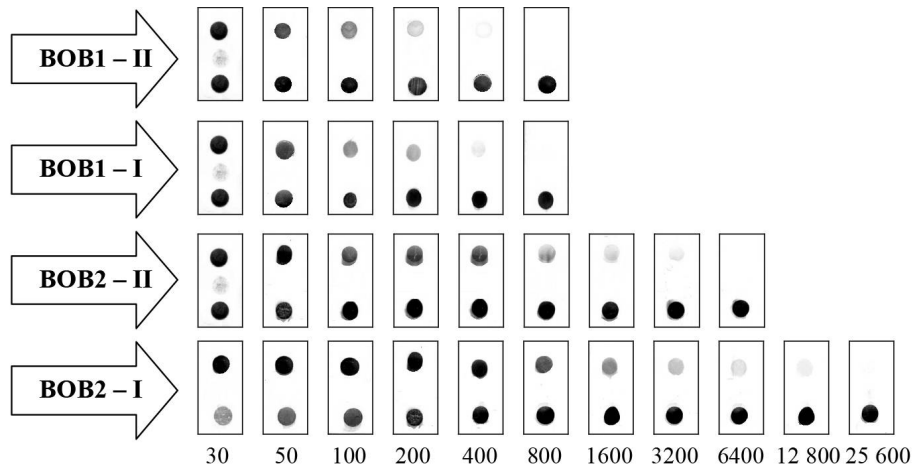


Рис. 3. Вид белковых матриц после выявления препаратов вируса осповакцины в разных вариантах условий постановки дот-иммуноанализа.

Обозначения вирусных препаратов приведены в разделе «Материал и методы». II и I – соответственно двух- и одностадийный варианты дот-анализа. Кратность разведения вирусных материалов приведена под изображениями матриц. Расшифровка аббревиатур дана в тексте.

иммунная реакция в растворе протекает быстрее, чем у поверхности плотной подложки, существует вероятность блокирования антигенных детерминант на поверхности вируса частицами иммунозоля, препятствующего связыванию комплексов «вирус–иммунозоль» на поверхности подложки и ограничивающего чувствительность.

Для проверки изложенных выше предположений параллельно выполняли двух- и одностадийный анализ очищенного на сахарозной подушке (BOB1) и неочищенного (BOB2) вирусного материала с использованием Ат1 и в качестве антител захвата, и в качестве антител детекции. Все эксперименты выполняли в одинаковых условиях с рабочим разведением иммунозоля 1 : 50.

Представленные на рис. 3 и в таблице данные свидетельствуют о том, что эффективность выявления вирусов имеет обратную зависимость от степени очистки анализируемых препаратов от субвирусных структур. Чувствительность определения вирусных антигенов в неочищенном препарате BOB2 в рутинной постановке дот-иммуноанализа в 8 раз, а в экспрессной постановке в 32 раза выше, чем в чистом вирусном материале. В очищенном материале вирусные антигены в том и другом варианте постановки анализа выявляются с примерно одинаковой чувствительностью, тогда как в неочищенном препарате чув-

Чувствительность выявления препаратов вируса осповакцины в разных вариантах условий постановки дот-иммуноанализа

Вирусный препарат	Очистка препарата	Биоактивность исходного препарата, БОЕ/мл	Чувствительность выявления, БОЕ/мл	
			две стадии	одна стадия
VOB штамм ЛИВП (BOB1)	Осаждение клеточного дебриса. Сахарозная подушка	$3 \cdot 10^8$	1/400	1/400
			$7,5 \cdot 10^5$	$7,5 \cdot 10^5$
VOB штамм ЛИВП (BOB2)	Осаждение клеточного дебриса	$7 \cdot 10^8$	1/3200	1/12 800
			$2,2 \cdot 10^5$	$5,5 \cdot 10^4$

Примечание. Расшифровка аббревиатур дана в тексте.

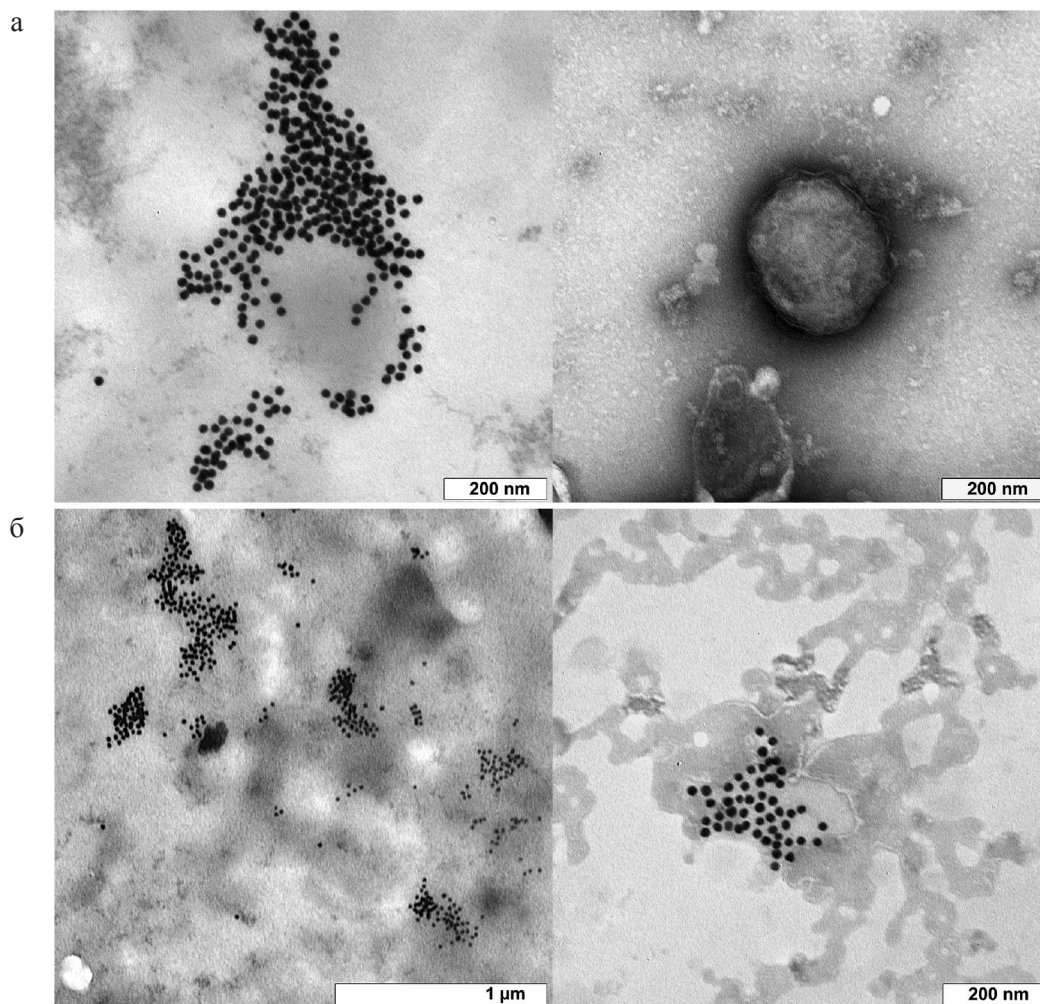


Рис. 4. Вид очищенного (а) и неочищенного (б) вирусов осповакцины с иммунозолем Au-At1 под электронным микроскопом.

Объяснение дано в тексте.

ствительность одностадийного метода заметно возрастает. Механизм этого эффекта становится понятен при электронно-микроскопическом исследовании смесей вирусных препаратов BOB1 и BOB2 с иммунозолем Au-At1.

На снимках наиболее типичных видов таких смесей, приведённых на рис. 4, видно, что частицы иммунозоля образуют крупные конгломераты на вирусных частицах и субвирусных структурах, причём в неочищенном материале таких скоплений частиц золя на субвирусных образованиях визуально определяется значительно больше, чем в чистом препарате. Вероятно, усиление оптического сигнала и, соответственно, повышение эффективности выявления в анализе происходит именно за счёт связывания на подложке крупных агрегатов частиц коллоидного золота, образующихся на субвирусных структурах. Об этом свидетельствует тот факт, что в очищенном препарате BOB1 чувствительность одно- и двухстадийного методов анализа практически одинакова. Как видно на рис. 3, а, часть вирусных частиц связывает имму-

нозоль только отдельными участками своей поверхности, а часть вирусов вообще не реагирует с золем. Предположительно, такой эффект может быть объяснён частичным или полным покрытием вирусов неактивными мембранами культуральных клеток. Вероятно, ограничение реакционных зон на поверхности вирусов и их массивная изоляция частицами золя препятствуют эффективному связыванию комплексов «вирус-иммунозол» с антителами на подложке и увеличению чувствительности.

Следует обратить внимание на вид зон положительного контроля после выполнения одностадийного анализа образцов с малыми разведениями вирусных материалов (см. рис. 2). Для неочищенных препаратов в диапазоне разведений от 1 : 50 до 1 : 200 видна обратная зависимость интенсивности окраски точек положительного контроля от концентрации вируса. Это может свидетельствовать о предпочтительном связывании золя вирусными структурами в жидкой фазе, приводящем к дефициту иммунозоля, реагирующего с антигеном в контрольной точке на поверхности матрицы.

Косвенно на истощение концентрации золя указывает и отсутствие сигнала в зоне отрицательного контроля при анализе образца в разведении 1 : 30. С уменьшением концентрации вируса интенсивность окраски контроля повышается, в разведении 1 : 200 она достигает насыщения и не изменяется при дальнейшем разведении вирусного препарата, что указывает на избыточное содержание золя в смеси. В очищенных материалах такой эффект незаметен, что свидетельствует о меньшем содержании в них антигенно активных структур.

Обычно поксвирусные инфекции дифференцируют с другими экзантематозными заболеваниями, такими как ветряная оспа, краснуха и корь [4]. Для оценки специфичности экспресс-теста в отношении гетерогенных инфекций выполняли анализ с использованием антигенов кори, краснухи и ветряной оспы в концентрации 50 мкг/мл. Ни в одном анализе с гетерогенными инфекциями не отмечено положительного срабатывания, что подтверждает специфичность отработанного теста.

Заключение

Чувствительность выявления ВОВ зависит от степени очистки препаратов от субвирусных структур. Эффективность определения вирусных антигенов в неочищенном препарате ВОВ2 в рутинной постановке дот-иммуноанализа в 8 раз, а в ускоренной постановке в 32 раза выше, чем в чистом вирусном материале.

Поликлональные антитела против ВОВ могут быть использованы в дот-иммуноанализе для выявления ортопоксвирусов, как в качестве реагента захвата, иммобилизованного на подложке; так и в качестве антител детекции, связанных с частицами коллоидного золота.

Ускоренный вариант дот-иммуноанализа позволяет сократить время анализа до 40 мин и увеличить чувствительность выявления ортопоксвирусов в неочищенных вирусных препаратах до диапазона 10^5 – 10^4 БОЕ/мл. Увеличение чувствительности анализа, предположительно, происходит за счёт формирования на субвирусных структурах крупных агрегатов сенсibilизированных частиц золота и одновременного связывания этих структур с антителами захвата на подложке.

Финансирование. Исследование проводилось в рамках выполнения государственного задания ГЗ-9/19.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 3, 5-7, 9, 11, 12 см. REFERENCES)

2. Бондарев В.П., Терентьев А.И., Мельников С.А., Бондарева Т.А. Внедрение таблетированной оспенной вакцины «ГЭОВАК» в серийное производство для обеспечения биологической безопасности населения Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2010; (2): 66-8.

4. Максютлов Р.А. Комплексный подход к видоспецифичной детекции вируса оспы коров. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; (4): 60-3.
DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-60-63>

8. Ерш А.В., Полтавченко А.Г., Пьянков С.А., Агафонов А.П., Кривенчук Н.А., Буторин Д.В. Метод комплексной оценки гуморального иммунитета к детским вакциноуправляемым вирусным инфекциям. *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(1): 45-9.

10. Скоупс Р. *Методы очистки белков*. Пер с англ. М.: Мир; 1985: 66-72.

REFERENCES

- Rimoin A.W., Graham B.S. Whither monkeypox vaccination. *Vaccine*. 2011; 29(Suppl. 4): D60-4.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.004>
- Bondarev V.P., Terent'ev A.I., Mel'nikov S.A., Bondareva T.A. Introduction of the pelleted smallpox vaccine «ТЕОВАК» into serial production to provide biosafety of the population of the Russian Federation. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2010; (2): 66-8. (in Russian)
- Fitzgibbon J.E., Sagripanti J. Simultaneous identification of orthopoxviruses and alphaviruses by oligonucleotide macroarray with special emphasis on detection of variola and Venezuelan equine encephalitis viruses. *J. Virol. Methods*. 2006; 131(2): 160-7.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.08.007>
- Maksyutov R.A. Complex approach to species-specific detection of cowpox virus. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2016; (4): 60-3.
DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-60-63> (in Russian)
- Pulford D., Meyer H., Brightwell G., Damon I., Kline R., Ulaeto D. Amplification refractory mutation system PCR assays for the detection of variola and Orthopoxvirus. *J. Virol. Methods*. 2004; 117(1): 81-90.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.01.001>
- Probst A., Besse A., Favry E., Imbert G., Tanchou V., Castell F.A., et al. Human CD4 T cell epitopes selective for Vaccinia versus Variola virus. *Mol. Immunol.* 2013; 53(4): 453-9.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.10.011>
- Chen L., Wang H., Guo T., Xiao C., Liu L., Zhang X., et al. A rapid point-of-care test for dengue virus-1 based on a lateral flow assay with a near-infrared fluorescent dye. *J. Immunol. Methods*. 2018; 456: 23-7.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.02.005>
- Ersh A.V., Poltavchenko A.G., P'yankov S.A., Agafonov A.P., Krivenchuk N.A., Butorin D.V. The multiplex method of estimation of humoral immunity to vaccine regulated childhood infections. *Voprosy virusologii*. 2015; 60(1): 45-9. (in Russian)
- Poltavchenko A.G., Nechitaylo O.V., Filatov P.V., Ersh A.V., Gureyev V.N. Multiplex method for initial complex testing of antibodies to blood transmitted diseases agents. *J. Virol. Methods*. 2016; 236: 231-6.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.08.003>
- Scopes R.K. *Protein Purification. Principles and Practice*. New York: Springer-Verlag; 1982.
- Poltavchenko A.G., Zaytzev B.N., Ersh A.V., Korneev D.V., Taranov O.S., Filatov P.V., et al. The selection and optimization of the detection system for self-contained multiplexed dot-immunoassay. *J. Immunoassay Immunochem*. 2016; 37(5): 540-54.
DOI: <https://doi.org/10.1080/15321819.2016.1174134>
- Poltavchenko A.G., Zaitsev B.N., Ersh A.V., Taranov O.S., Korneev D.V., Nikonov A.M. Selection of Substrate Material for Protein Matrices. *Prot. Met. Phys. Chem+*. 2016; 52(2): 301-7.
DOI: <https://doi.org/10.1134/S2070205116020234>

Поступила 20.11.19

Принята в печать 28.11.19