

УДК 616.9

РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕСС-ТЕСТА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ОРТОПОКСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

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

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия
человека, рп Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Основная задача проекта – разработка несложного в применении и в то же время чувствительного иммунохимического теста для быстрого (до 35 мин.) выявления ортопоксвирусных инфекций в формате «point of care». Представлены результаты оценки одноэтапной и двухэтапной модификаций dot-иммуноанализа на основе плоских белковых матриц для обнаружения ортопоксвирусов в культуральных вирусных материалах различной степени очистки. Одноэтапная модификация методики позволяет снизить затрачиваемое на проведение анализа время до 35 мин. и увеличить чувствительность выявления ортопоксвирусов в слабо очищенных вирусных препаратах до диапазона 10^3 - 10^4 БОЕ/мл. Полная укомплектованность, простота выполнения анализа и возможность визуального учета результатов позволяют применять тест без использования специального дорогостоящего оборудования.

Ключевые слова: ортопоксвирусные инфекции, быстрая диагностика, dot-иммуноанализ.

Для цитирования: Ерш А.В.¹, Полтавченко А.Г.¹, Филатов П.В.¹, Ушкаленко Н.Д.¹
РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕСС-ТЕСТА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ОРТОПОКСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ. Медицина
труда и экология человека. 2020; 3:143-148

Для корреспонденции: Ерш Анна Васильевна, научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора, к.б.н., e-mail: ersh_av@vector.nsc.ru.

Финансирование. Исследование проводилось в рамках выполнения государственного задания.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2020-10319>

DEVELOPMENT OF AN EXPRESS TEST FOR DETECTING ORTHOPOXVIRAL INFECTIONS

Ersh A.V., Poltavchenko A.G., Filatov P.V., Ushkalenko N.D.

Federal Budgetary Research Institution - State Research Center of Virology and
Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Novosibirsk region, Russian Federation

The main purpose of the project was to create an easy-to-use and, at the same time, sensitive immunochemical test for the rapid (up to 35 min.) detection of orthopoxvirus infections in the "point of care" format.

The results of the comparison of one-stage (accelerated version) and two-stage modifications of dot-immunoassay based on plane protein array for the detection of orthopoxviruses in viral culture materials of varying degrees of purification are presented.

One-stage modification of the method allows reducing the time spent on the analysis to 35 minutes and increase the sensitivity of detection of orthopoxviruses in poorly purified viral preparations to a range of 10³-10⁴ PFU / ml. Full stocked kit, easy of analysis and the ability to visually record results allow the test to be applied without the use of special expensive equipment.

Key words: *orthopoxvirus infections, rapid diagnostic, dot-immunoassay*

For citation: *Ersh A.V.1, Poltavchenko A.G.1, Filatov P.V.1, Ushkalenko N.D.1 DEVELOPMENT OF AN EXPRESS TEST FOR DETECTING ORTHOPOXVIRAL INFECTIONS. Occupational health and human ecology. 2020; 3:143-148*

For correspondence: *Anna V. Ersh, Researcher, SSC for VB "Vector", Rospotrebnadzor, PhD in Biology., e-mail: ersh_av@vector.nsc.ru.*

Funding: *Financing was carried out as part of state assignment realization.*

Conflict of Interest: *The authors declare they have no conflict of interest*

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2020-10319>

Введение

Прошло 40 лет с того момента, когда в 1980 году на 33-й сессии ВОЗ было официально объявлено о ликвидации натуральной оспы и прекращении массовой иммунизации. По этой причине фиксируется значительный прирост доли населения, чувствительного к ортопоксвирусам. Одновременно наличие в природе резервуаров близкородственных вирусов и массовые случаи вызванных ими заболеваний у людей [1] свидетельствуют о потенциальной угрозе возникновения и распространения этих инфекций, что обуславливает высокую актуальность проблемы специфической профилактики и своевременной диагностики ортопоксвирусных инфекций. Вместе с этим не исключена возможность для преднамеренного высвобождения и использования вируса натуральной оспы или модифицированного вируса натуральной оспы в качестве биологического оружия. При этом немаловажную роль в распространении заболевания могут сыграть отсутствие эпидемической настороженности по натуральной оспе, длительность инкубационного периода и продромальной стадии до 20 сут. [2]. Заболевание может распространяться месяцами, скрываясь под диагнозами «ветряная оспа», «корь», «скарлатина», «клещевой боррелиоз» и др. Быстрая дифференциальная диагностика подобных заболеваний имеет большое значение, поскольку от нее зависит скорость принятия решений по предотвращению распространения болезни и в конечном итоге эффективность профилактических, лечебных и карантинных мероприятий. Диагноз может быть подтвержден лабораторными методами, основанными на выявлении ДНК вируса или родоспецифических антигенов. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), в том числе ее экспрессные варианты, чрезвычайно чувствительны [3], однако выполнение ПЦР-анализа требует строго контролируемых лабораторных условий, дорогостоящего оборудования и реагентов [4].

Иммунохимические тесты менее чувствительны, чем ПЦР. Обычно они позволяют регистрировать специфические антигены в концентрациях свыше 0,1 нг/мл. Однако даже такой чувствительности достаточно для исследования проб окружающей среды после применения биологического оружия или содержимого оспенных пустул, где вирусы могут присутствовать в огромных количествах [5].

Ранее мы сообщали о разработке платформы иммунохимического теста на основе плоских белковых матриц. Такие тесты полностью укомплектованы, не требуют энергообеспечения, снабжены встроенными контролями, просты в применении, выполняются оперативно и позволяют проводить визуальный учет результатов [6, 7].

Целью настоящего проекта является создание на базе указанной платформы несложного в применении и в то же время чувствительного иммунохимического теста для выявления ортопоксвирусных инфекций в формате «point of care».

Материалы и методы

Вирусы:

ВОВ (ЛИВП) – с штамм 14 ЛИВП.

ВОВ (ABCNJ) – рекомбинантный штамм ABCNJ.

ВОВ_A34R_[D110N_K151E] – вирус осповакцины с аминокислотными заменами D110N, K151E в мембранном гликопротеине A34.

ВЭ – вирус экстремелии штамм K-1.

ВОК – вирус оспы коров штамм GRI-90.

ВОКр – вирус оспы кроликов штамм Утрехт.

К- – лизат клеток CV-1 после 3 циклов замораживания и оттаивания.

Антитела:

Ат 1 – IgG из гипериммунной по ВОВ сыворотки кролика, выделены осаждением сульфатом аммония в 1988 г., хранение при -18 °С;

Ат 2 – нормальная сыворотка кролика 2019 г.

Дот-иммуноанализ

Дот-иммуноанализ выполняли при температуре от 20 до 25 °С.

В двухэтапной модификации матрицы инкубировали 25 мин в образцах (сериях разведений вирусов на РБРС); дважды отмывали ФСБ-Т; инкубировали 25 мин с золем золота, связанным с кроличьими поликлональными антителами против вируса осповакцины; дважды отмывали ФСБ-Т и дважды дистиллированной водой, проявляли серебряным проявителем, отмывали водой, усиливали оптический сигнал обработкой матрицы щелочным раствором тиомочевины, ополаскивали водой и визуально учитывали результаты.

В одноэтапной модификации образец раститровывали в ячейках ванны с иммунозолом, 25 мин инкубировали матрицы в полученной смеси и далее выполняли отмывки и проявление так, как описано выше.

Результаты и обсуждение

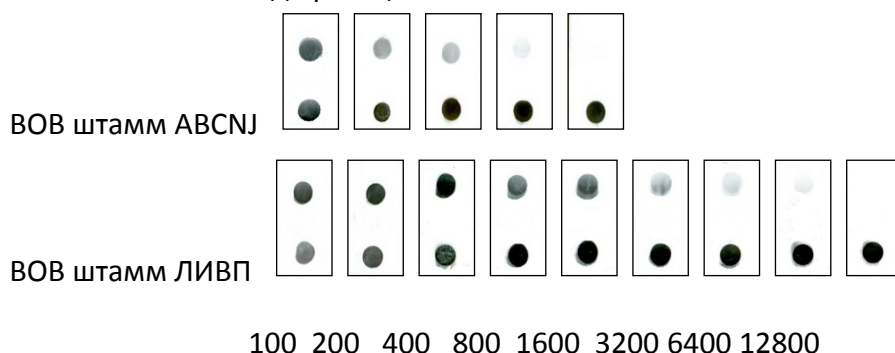
Для оценки чувствительности выявления ортопоксвирусов параллельно выполняли двух- и одностадийный анализ на вирусных материалах с использованием Ат 1 и как антитела захвата, и как антитела детекции, а также нормальной сыворотки кролика (Ат 2) для отрицательного контроля. Вирус осповакцины (ВОВ) в концентрации 10^6 БОЕ/мл был использован как положительный контроль (К+). Все эксперименты выполняли в одинаковых условиях с рабочим разведением иммунозоля 1/100. Результаты приведены на рисунке и в таблице.

Таблица

Сравнительная эффективность выявления ВОВ в очищенных и неочищенных препаратах в рутинной и ускоренной модификациях постановки дот-иммуноанализа

| Вирус | Титр, БОЕ/мл | Двухэтапная модификация | | Одноэтапная модификация | |
|----------------------------------|------------------|-------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| | | Развед. | Титр, БОЕ/мл | Развед. | Титр, БОЕ/мл |
| ВОВ штамм ABCNJ | $4,0 \cdot 10^8$ | 1/800 | $5,0 \cdot 10^5$ | 1/1600 | $2,5 \cdot 10^5$ |
| ВОВ штамм ЛИВП | $8,5 \cdot 10^6$ | 1/3200 | $2,6 \cdot 10^3$ | 1/12800 | $6,6 \cdot 10^2$ |
| ВОВ штамм_A34R_ [D110N_K151E] | $1,1 \cdot 10^6$ | 1/800 | $1,4 \cdot 10^3$ | 1/800 | $1,4 \cdot 10^3$ |
| ВЭ штамм К-1 | $2,3 \cdot 10^6$ | 1/200 | $1,1 \cdot 10^4$ | 1/800 | $2,8 \cdot 10^3$ |
| ВОК штамм штамм GRI-90 | $9,8 \cdot 10^6$ | 1/200 | $4,8 \cdot 10^4$ | 1/400 | $2,4 \cdot 10^4$ |
| ВОКр штамм Утрехт | $1,0 \cdot 10^6$ | 1600 | $6,2 \cdot 10^2$ | 1/1600 | $6,2 \cdot 10^2$ |

I этапная модификация постановки анализа



II этапная модификация постановки анализа

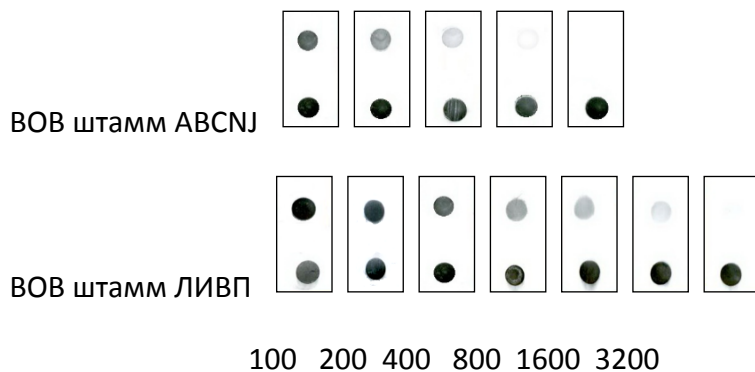


Рис. Вид белковых матриц после выявления препаратов ортопоксвирусов в разных вариантах условий постановки дот-иммуноанализа. Обозначения вирусных препаратов приведены в разделе Материалы. Цифрами под матрицами обозначены разведения вирусной суспензии

Видно, что одноэтапная модификация во всех случаях обеспечивает чувствительность, в два раза превышающую чувствительность двухэтапного анализа. Такой прирост чувствительности может быть объяснен образованием крупных агрегатов частиц иммунозоля на поверхности вирусов и субвирусных структур, значительно усиливающих оптический сигнал при проявлении результатов анализа. Оба варианта постановки анализа специфичны и не обнаруживают взаимодействий с препаратами незараженной клеточной культуры. С учетом возможных погрешностей в титровании вируса и постановке дот-анализа чувствительность экспрессного варианта выявления ортопоксвирусов можно обозначить диапазоном $10 \cdot 10^3$ - 10^4 БОЕ/мл.

Выводы

Одноэтапная модификация дот-иммуноанализа позволяет выявлять исходные и генетически измененные ортопоксвирусы в слабо очищенных вирусных препаратах в диапазоне 10^3 - 10^4 БОЕ/мл. Прирост чувствительности в экспрессном варианте анализа, предположительно, происходит за счет взаимодействия с антителами захвата вневирионных структур, формирующих на себе крупные агрегаты частиц золота. Длительность исследования 35 мин.

Список литературы:

1. Shchelkunov S.N. // PLoS Path. 2013. V. 9. № 12. e1003756.
2. Meltzer M.I., Damon I., LeDuc J.W., et al. Modeling Potential Responses to Smallpox as a Bioterrorist Weapon. *Emerging Infectious Diseases*. 2001; 7(6): 959–9.
3. Максютов Р.А. Комплексный подход к видоспецифичной детекции вируса оспы коров. Проблемы особо опасных инфекций, 2016, вып. 4, с. 60-63.
<http://dx.doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-60-63>
4. D. Pulford, H. Meyer, G. Brightwell, I. Damon, R. Kline, D. Ulaeto Amplification refractory mutation system PCR assays for the detection of variola and *Orthopoxvirus*. *J. Virol. Meth.*, 2004; v. 117: 81–90.
5. A. Probst, A. Besse, E. Favry, G. Imbert, V. Tanchou, F.A. Castelli, B. Maillere Human CD4 T cell epitopes selective for Vaccinia versus Variola virus. *Mol. Immunol.*, 2013; v. 53: 453–459.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2012.10.011>
6. А.В. Ерш, А.Г. Полтавченко, С.А. Пьянков А.П. Агафонов, Н.А. Кривенчук, Д.В. Буторин. Метод комплексной оценки гуморального иммунитета к детским вакциноуправляемым вирусным инфекциям. *Вопр. вирусол.* 2015; 60(1): 45-49.
7. A.G. Poltavchenko, O.V. Nechitaylo, P.V. Filatov, A.V. Ersh, V.N. Gureyev Multiplex method for initial complex testing of antibodies to blood transmitted diseases agents. *J. Virol. Meth.*, 2016; vol. 236: 231–236.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.08.003>

References:

1. Shchelkunov S.N. // PLoS Path. 2013. V. 9. № 12. e1003756.
2. Meltzer M.I., Damon I., LeDuc J.W., et al. Modeling Potential Responses to Smallpox as a Bioterrorist Weapon. *Emerging Infectious Diseases*. 2001; 7(6): 959–9.
3. Maksyutov R.A. Complex Approach to Species-Specific Detection of Cowpox Virus. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;(4):60-63. (In Russ.).
<http://dx.doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-60-63>
4. D. Pulford, H. Meyer, G. Brightwell, I. Damon, R. Kline, D. Ulaeto Amplification refractory mutation system PCR assays for the detection of variola and Orthopoxvirus// *J. Virol. Meth.*, 2004. v. 117, p. 81–90.
5. A. Probst, A. Besse, E. Favry, G. Imbert, V. Tanchou, F.A. Castelli, B. Maillere Human CD4 T cell epitopes selective for Vaccinia versus Variola virus // *Mol. Immunol.*, 2013, v. 53, p. 453–459.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2012.10.011>
6. Ersh A.V., Poltavchenko A.G., Pyankov S.A., Agaphonov 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): 41–45. (In Russ.).
7. A.G. Poltavchenko, O.V. Nechitaylo, P.V. Filatov, A.V. Ersh, V.N. Gureyev Multiplex method for initial complex testing of antibodies to blood transmitted diseases agents// *J. Virol. Meth.*, 2016, vol. 236, p. 231–236.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.08.003>

Поступила/Received: 18.05.2020

Принята в печать/Accepted: 05.08.2020