

На правах рукописи

Ушкаленко Никита Дмитриевич

**Разработка быстрого иммунохимического теста для выявления
ортопоксвирусов**

1.5.10. – вирусология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель:

Полтавченко Александр Георгиевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Официальные оппоненты:

- **Бабкин Игорь Викторович**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук.

- **Шаршов Кирилл Александрович**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной эпидемиологии и биоразнообразия вирусов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «19» сентября 2025 г. в 09-00 часов на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел. (383) 363-47-00.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук,
доцент

Т.Н. Ильичева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

По современной классификации род *Orthopoxvirus* подсемейства *Chordopoxvirinae* семейства *Poxviridae* включает 12 видов вирусов, из которых 7 могут вызывать заболевания у человека. Вирусы осповакцины, Ахмеда, Аляска, оспы коров и оспы верблюдов у человека вызывают локализованные инфекции, купирующиеся самостоятельно в течение 3-4 недель и редко переходящие в генерализованную форму. Инфицирование вирусами натуральной оспы (ВНО) или оспы обезьян (ВОО) приводит к системным заболеваниям, характеризующимся общей интоксикацией, лихорадкой, высыпаниями на коже и слизистых оболочках и нередко заканчивающимся летально. Эти вирусы высококонтагиозны, устойчивы к факторам внешней среды и могут передаваться различными путями. Если ВНО к 1980 г. ликвидирован в результате массовой вакцинации, то ВОО продолжает угрожать жизни людей в эндемичных регионах Африки. Последние случаи распространения оспы обезьян за пределами Африки с мая 2022 г. приобрели массовый характер и были зарегистрированы во многих государствах по всему миру. С начала 2022 г. и по январь 2024 г., в 118 странах зарегистрировано 97 281 лабораторно подтвержденных случаев этого заболевания, 184 из которых закончились летально, по данным CDC (Centers for Disease Control and Prevention. URL: <https://www.cdc.gov/poxvirus/mpox/response/2022/index.html>).

В системе мероприятий по борьбе с оспой обезьян большое значение имеет ранняя диагностика заболевания, так как от этого зависит эффективность профилактических, лечебных и карантинных мероприятий (Маренникова С.С., 1998; Stern D., 2016). Диагноз не может быть поставлен только по клиническим признакам, поскольку они схожи 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) может быть выполнено быстро, но обладает низкой чувствительностью. 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. ЭМ и ПЦР требуют дорогостоящего оборудования и обученного персонала, что мало подходит для эндемичных африканских регионов с ограниченной лабораторной инфраструктурой (Rimoin A.W. 2011; Stern D., 2016). Иммунохимические методы не могут дифференцировать виды ОПВ, вследствие выраженной перекрестной реактивности вирусных белков, 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 больных. В то же время, иммунохимические методы менее прихотливы к условиям анализа и могут выполняться быстрее ПЦР. Так, известны тесты, которые могут выполняться за короткое время во внелабораторных условиях (Townsend M.B., 2013), но они обладают сравнительно низкой чувствительностью. Известны также варианты ИФА, позволяющие выявлять ОПВ при вирусной нагрузке 10^4 - 10^3 БОЕ/мл (Czerny S.P., 1989; Stern D., 2016), однако высокая чувствительность в том и другом случаях достигается за счет многократных длительных инкубаций, увеличивающих время анализа до нескольких часов.

Таким образом, методы индикации ОПВ требуют усовершенствования, как в плане повышения чувствительности и оперативности получения результатов, так и в отношении простоты выполнения анализа, позволяющей использовать тест непосредственно в очаге заражения или в ограниченных условиях лаборатории с высоким уровнем биозащиты.

Цель исследования

Разработка чувствительного, быстрого и простого в применении иммунохимического теста для выявления ортопоксвирусов и оценка его эксплуатационных характеристик.

Задачи исследования

1. Создать чувствительный, быстрый и простой в исполнении иммунохимический тест, выявляющий ортопоксвирусы, пригодный для применения в очаге заражения и в условиях лаборатории с высоким уровнем биозащиты.
2. Разработанный тест должен обладать чувствительностью выявления ортопоксвирусов в образцах при концентрации не менее 10^5 БОЕ/мл и специфичностью на уровне рода.
3. Отработать оптимальные условия изготовления и применения экспериментального набора на основе этого теста.
4. Изготовить серии экспериментального набора и оценить их эксплуатационные характеристики при выявлении различных видов ортопоксвирусов, в том числе в клинических материалах.
5. Подготовить проекты научно-технической документации для регистрации набора.

Научная новизна и практическая ценность работы

Отработана оригинальная технология изготовления и применения автономного диагностического набора «РОХ-экспресс» для ускоренного выявления ортопоксвирусов методом одностадийного дот-иммуноанализа.

Проведены лабораторные испытания набора с использованием широкого круга ортопоксвирусов, в том числе высоко патогенных для человека вирусов натуральной оспы и оспы обезьян, и доступных биологических и клинических образцов от инфицированных лабораторных животных и человека.

Показано, что применение набора с визуальным учетом результатов анализа позволяет в течение 35 мин при температуре от 18 до 40°C выявлять ортопоксвирусы в неочищенных вирусных препаратах и клинических материалах в концентрации, превышающей 10^4 БОЕ/мл.

Разработанный набор может быть полезен при обнаружении вирусной угрозы в различных приложениях биологической защиты. Он прост в применении, не требует дополнительного оборудования, энергообеспечения и высокой квалификации оператора, что позволяет использовать его при выполнении анализов непосредственно в очаге заражения, у постели больного или в технически ограниченных условиях лаборатории с уровнем биобезопасности BSL 3 или BSL 4.

Подготовлены проекты научно-технической документации на производство и применение набора «РОХ-экспресс»: лабораторный регламент, ТУ, инструкция по применению.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Быстрое выявление ортопоксвирусов может быть достигнуто с использованием набора для одностадийного дот-иммуноанализа на белковых матрицах, изготовленного с применением в качестве реагентов захвата и детекции кроличьих поликлональных антител против вируса осповакцины.

2. Набор обеспечивает получение результатов анализа в течение 35 мин при температуре 20-40°C и позволяет выявлять все исследованные ортопоксвирусы в слабо очищенных вирусных препаратах в диапазоне 10^3 - 10^4 БОЕ/мл и в клинических и биологических материалах при их содержании, превышающем 10^4 БОЕ/мл.

3. Простота выполнения анализа, возможность визуального учета результатов с их несложной интерпретацией, а также полная комплектация и энергетическая независимость позволяют применять набор вне лаборатории и в условиях, технически ограниченных уровнями биобезопасности BSL3 и BSL4.

Степень достоверности и апробация результатов

Научные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе, основываются на фактических данных, представленных в материале диссертации. Достоверность результатов обеспечивается комплексным подходом к их достижению с привлечением современных вирусологических, морфологических, иммунохимических и информационных методов; многократной воспроизводимостью результатов с использованием широкого круга ОПВ (в том числе высоко патогенных для человека ВНО и ВОО); а также статистической обработкой полученных результатов.

Результаты работы отражены в 11 публикациях в отечественных и зарубежных изданиях, из которых: 1 монография, 4 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для защиты диссертаций, 6 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях.

Личный вклад автора

Основная часть экспериментальной работы и анализ результатов выполнены лично автором или при его участии.

Культивирование непатогенных и слабопатогенных для человека ортопоксвирусов, работа с инфицированными кроликами, подготовка и титрование образцов проводились сотрудниками отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Все работы с нативными вирусами натуральной оспы и оспы обезьян в условиях с уровнем биобезопасности BSL4, а также получение клинических образцов от инфицированных вирусом осповакцины мышей выполнялись сотрудниками отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Морфологические исследования проведены сотрудниками отдела микроскопических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Работа изложена на 120 страницах, включает 24 рисунка, 18 таблиц и 4 приложения. Библиографический указатель содержит 205 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

Обзор литературы включает 10 разделов, в которых представлены современные сведения о таксономии, морфологии, репликации, геноме и белках, устойчивости к факторам внешней среды ОПВ. Освещены вопросы патогенеза и клинических проявлений, лечения и профилактики, а также лабораторной диагностики заболеваний, вызываемых ОПВ, патогенными для человека.

Материалы и методы

Глава содержит описание использованных в работе материалов (вирусов, биологических и клинических образцов, антител, контрольных препаратов, реактивов и рабочих растворов); вирусологических (культивирование и титрование вирусов *in vitro*, инфицирование лабораторных животных и получение клинических образцов); морфологических (электронная микроскопия с негативным контрастированием), иммунохимических (дот анализ в разных модификациях) и информационных (компьютерная обработка изображения матриц и статистическая обработка результатов) методов.

При испытаниях набора использовали образцы вирусов: **ВНО** – вирус натуральной оспы, штамм Ind-3a; **ВОО** – вирус оспы обезьян, штамм V79-1-005; **ВОВ** – вирус осповакцины, штамм ЛИВП; **ВОКр** – вирус осповакцины, штамм Утрехт; **ВОВ ABCNJ** – рекомбинантный штамм ВОВ; **ВОВ_A34R_(D110N_K151E)** – вирус осповакцины с аминокислотными заменами D110N, K151E в мембранном гликопротеине A34; **ВОК** – вирус оспы коров, штамм GRI-90; **ВЭ** – вирус экстремелии, штамм K-1.

Вирусы нарабатывали на монослое клеточной культуры линии CV-1 и использовали в виде 4 типов препаратов с разных стадий культивирования и выделения вирусного материала: **тип 1** - исходная инфицированная культура клеток после 2 циклов замораживания-оттаивания; **тип 2** - препарат 1 после разрушения клеток ультразвуком 2 раза по 10 с при мощности 20 кГц; **тип 3** – препарат 2, очищенный от клеточного дебриса центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин при 4 °С; тип 4 – вирус, очищенный центрифугировали при 14000 об/мин в течение 2 ч при 4 °С с использованием «подушки» из 30%-й сахарозы. В качестве гетерогенных контролей использовали антигены вирусов кори, краснухи и ветряной оспы (1 мкг/мл) и неинфицированную культуру клеток CV-1, обработанную по протоколам подготовки образцов 1, 2 и 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За основу разработки принята платформа дот-иммуноанализа на плоских белковых матрицах созданная ранее коллегами из лаборатории иммунохимической диагностики ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Полтавченко А.Г., 2018). Наборы на основе этой платформы включают комплект белковых матриц; аналитические ванны, заполненные готовыми растворами и компоненты проявляющей системы. Такие наборы полностью укомплектованы, не требуют энергообеспечения, особой квалификации исполнителя, допускает визуальный учет результатов и могут служить базисом для решения поставленных задач.

В наборе использован дот-анализ с применением конъюгата на основе коллоидного золота, усилением оптического сигнала серебряным проявлением, и стабилизацией сигнала путем перевода серебра в устойчивый и интенсивно окрашенный сульфид серебра.

Принципиальные схемы рутинного и ускоренного анализа приведены на рисунке 1. Ускорение анализа достигается путем совмещения стадий инкубации с образцом и конъюгатом. Дот-иммуноанализ выполняли при температуре от 20 до 40°C.

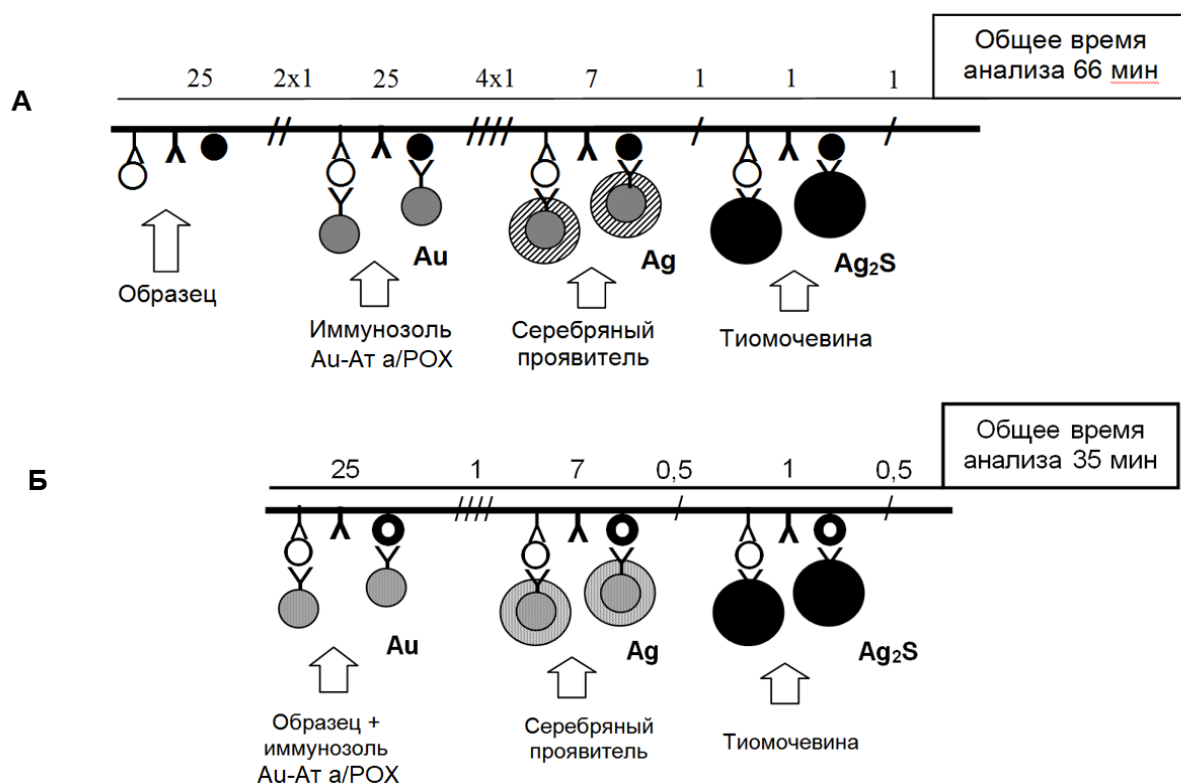


Рисунок 1. Принципиальные схемы дот-иммуноанализа антигенов ОВП с использованием золей золота, связанных с поликлональными антителами; серебряного проявления; а также стабилизации оптического сигнала щелочным раствором тиомочевины. А – рутинная двустадийная постановка, Б – ускоренная одностадийная постановка. В верхней строке цифрами указаны кратность и длительность (мин) операций.

В качестве реагента захвата и детекции использовали антитела из сыворотки кролика иммунизированного осповакциной (Ат а/РОХ), выделенные методом осаждения сульфатом аммония. В качестве реагента захвата для зоны отрицательного контроля использовали антитела из нормальной сыворотки кролика (Ат НКС).

Отработка технологии изготовления наборов для дот-иммуноанализа.

Получение конъюгата кроличьих антител против вируса осповакцины (Au-Ат а/РОХ) проводили по ранее описанной процедуре, с использованием частиц коллоидного золота размером 20 нм (Полтавченко А.Г., 2018).

Из доступных материалов наиболее пригодной для изготовления подложек белковых чипов признана синтетическая бумага на основе ПВХ «Pentaprint» марки PR-M180/09-07/9400, обладающая равномерной, тонкой фактурой поверхности; сравнительно высоким содержанием двуокиси титана и прошедшая финальную обработку коронным разрядом. Из этого материала методом вырубки изготовлены подложки в виде гребенки с 5 зубцами (каждый зубец предназначен для получения белковой матрицы), которые были использованы при изготовлении набора.

При оптимизации процесса изготовления белковых матриц отработывали схему размещения реагентов захвата на подложке, проводили оценку качества используемых иммунореагентов и материалов, условия иммобилизации реагентов захвата на подложке и состав раствора для блокирования свободной поверхности матрицы.

Исследовали перекрестную реактивность компонентов, иммобилизованных на матрице и связанных с коллоидным золотом. Результаты представлены на рисунке 2.

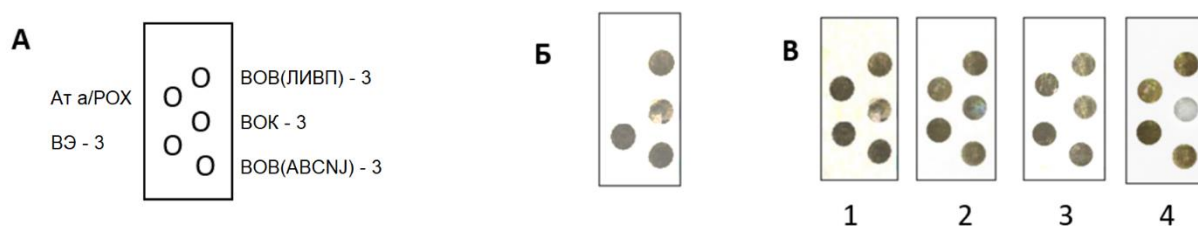


Рисунок 2. Оценка взаимной реактивности иммунокомпонентов. А - схема нанесения иммунокомпонентов на белковую матрицу; Б - реактивность компонентов при прямом взаимодействии с иммунозолом Ау-Ат а/РОХ. В – реактивность компонентов в сэндвич варианте постановки анализа при обработке матриц препаратами: 1 - ВОВ(ЛИБП)-3, 2 - ВОВ(АВСНЖ)-3, 3 – ВОВ-3, 4 – ВЭ-3, а затем иммунозолом Ау-Ат а/РОХ.

Видно, что поликлональные антитела из гипериммунной кроличьей сыворотки активны в отношении всех использованных вирусных препаратов и могут быть использованы как реагенты захвата, так и реагенты детекции.



Рисунок 3. Схема размещения реагентов захвата на матрице.

Изучение условий иммобилизации реагентов захвата (схема распределения представленно на рисунке 3) проводили с использованием образца вируса осповакцины штамм ЛИБП типа 3 (ВОВ(ЛИБП)-3) в качестве анализата. Исследовали состав и pH буферных растворов, а также условия инкубации сорбционной смеси на оптимально подготовленных подложках из ПВХ. Сравнивали режимы инкубации подложек с сорбционной смесью на воздухе при комнатной температуре и инкубации в холодильнике при 4°C, а также режимы сушки матриц. Все буферные растворы использовали в 0,01 М концентрации. Эффективность иммобилизации оценивали по уровню оптического сигнала и чистоте фона матрицы после выполнения дот-иммуноанализа. Результаты сравнения приведены на рисунке 4.

Видно, что более эффективная сорбция происходит в слабо кислых условиях (pH 6,0) при сорбции реагентов захвата на матрице при 4°C в течение 2 ч. Сушка матриц при 40°C в течение 1 ч недостаточна для фиксирования реагентов захвата – при блокировке матрицы эти реагенты диффундируют и связываются соседних участках подложки. При сушке в течение более 2 ч реагенты захвата надежно иммобилизуются на синтетической бумаге. Нанесение реагентов захвата на подложку может производиться автоматически специальным устройством «Диспенсер» или вручную.

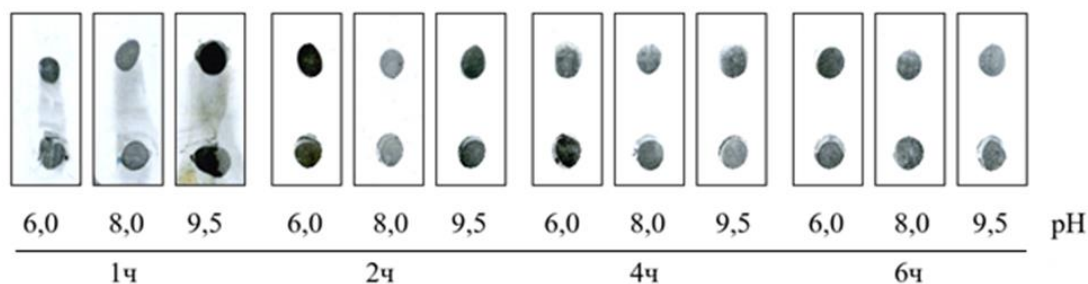


Рисунок 4. Подбор режимов сорбции реагентов захвата на подложках. Цифрами под матрицами указаны показатели pH сорбционных растворов. Под блоками матриц обозначено время досушивания матриц при 40°C.

Для оценки блокирующего эффекта использовали следующие составы, приготовленные на основе 0,01 М фосфатного буферного раствора, pH 7,2 (ФБР): 1% БСА; 0,2% казеин; 0,2% казеин + 0,1% лактальбумин (ЛА); 0,2% казеин + 0,1% овальбумин (ОА); 0,5% обезжиренное молоко. Матрицы с реагентами захвата, иммобилизованными на лицевой (А) и обратной (R) стороне бумаги, погружали в блокирующие составы на 2 ч при температуре 20°C, просушивали в этих же условиях и оценивали при выполнении анализа. Результаты оценки показаны на рисунке 5.

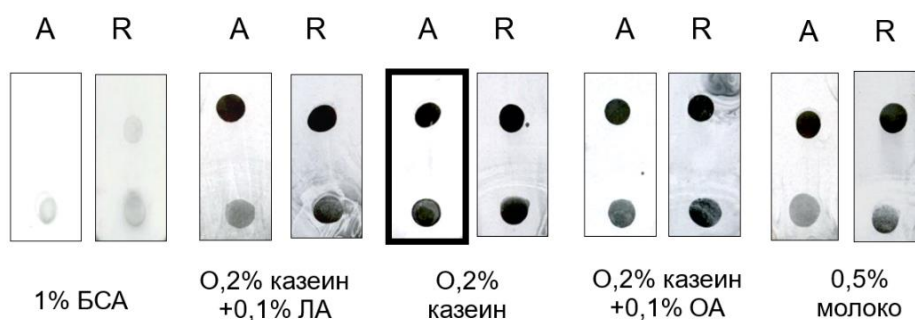


Рисунок 5. Подбор реагентов для блокирования поверхности матрицы.

Видно, что БСА полностью блокирует сигнал на реагентах захвата (возможно десорбирует их с подложки), казеин в сочетании с ЛА и молоко тоже значительно снижает оптический сигнал. Обработка матрицы чистым казеином и казеином в сочетании с ОА оставляет полезный оптический сигнал ярким и контрастным.

При оптимизации процесса подготовки аналитических ванн оценивали составы базовых буферных растворов, состав и рабочие разведения конъюгата, а также эффективность системы проявления.

Установлено, что для выполнения анализа пригодны рабочие растворы на основе 0,01 М фосфатного-солевого буферного раствора с 0,1% Твин 20. Заполнение аналитических ванн производится автоматически специальным устройством «Розлив» или вручную.

Для укомплектования автономного диагностического набора предложено использовать двухкомпонентный проявитель – таблетированную смесь метола и лимонной кислоты (сухой компонент) в соотношении 2:5 (мас./мас.), а также 0,4 %-й раствор азотнокислого серебра (жидкий компонент). Экспериментально установлено, что метол в виде сухой смеси с лимонной кислотой в темной упаковке может храниться более 2 лет при комнатной температуре без потери активности. Таблетки помещаются в ячейки соответствующего ряда ванны и растворяются в ходе анализа путем внесения 200 мл

очищенной воды, а жидкий компонент вносится в полученный раствор непосредственно перед проявлением. Таблетки сухой смеси могут быть изготовлены путем формования увлажненной этанолом смеси метола и лимонной кислоты в ячейках силиконовой матрицы с последующей сушкой, при этом погрешности в массе таблеток в диапазоне 3,5–4,0 мг не оказывают заметного влияния на результаты проявления. Повышение контрастности и стабильности оптических сигналов может быть достигнуто путем обработки проявленной белковой матрицы щелочным раствором тиомочевины.

Материальные затраты на изготовление 100 наборов (2000 анализов) в ценах 2024 г. составляют 63450 руб, а на один набор – 635 руб (32 руб на один анализ).

Оптимизация условий применения наборов для ускоренного варианта дот-анализа

Для оценки влияния фактора разведения образца на чувствительность выявления матрицы инкубировали с сериями двукратных разведений вирусных препаратов смешанных с конъюгатом в соотношениях 1:20, 1:5 и 1:1. Показано, что уменьшение степени разведения культурального образца позволяет увеличить чувствительность выявления, специфичность определения при этом не страдает. Однако при работе с суспензиями клинических образцов использование малого соотношения золя и образца приводит к высокой вязкости реакционной смеси, требующей более длительной инкубации матрицы, и потенциальной способности к образованию артефактов проявления. Таким образом, при выполнении ускоренного анализа с разнообразными образцами оптимальными следует считать разведения образца 1:20 и иммунозоля 1:100.

Оценка оптимального времени инкубации матрицы в смеси образца и конъюгата показала, что интенсивность оптического сигнала при температуре 20°C достигает максимума в течение 25 мин. Дальнейший прирост сигнала при более длительной инкубации, в том числе при более высокой температуре, незначителен и не влияет на чувствительность анализа. Для эффективной отмывки достаточно на каждом этапе отмывки 7-10 раз интенсивно переместить матрицы вверх-вниз в ячейке, заполненной моющим раствором, что по времени занимает около 20 с. Время проявления матриц и стабилизации сигнала составляет 7 и 1 мин, соответственно. Таким образом, ускоренный анализ может выполняться в течение 35 мин при температуре 20°C.

Оценка чувствительности и специфичности выявления ортопоксвирусов в рутинной и ускоренной постановке дот-иммуноанализа

Для оценки чувствительности выявления ортопоксвирусов параллельно в трех повторах выполняли двух- и одностадийный анализ с использованием всех доступных образцов ортопоксвирусов. Учет результатов проводили визуально. Результаты представлены в таблице 1.

Данные таблице 1 показывают, что ускоренный вариант анализа демонстрирует более высокую чувствительность, чем рутинный вариант, при этом оба варианта эффективнее выявляют ортопоксвирусы в менее очищенных препаратах. Лимит обнаружения в ускоренном варианте анализа для разных неочищенных образцов ОПВ укладывается в диапазон от 6×10^2 для ВОВ до 1×10^4 БОЕ/мл для натуральной оспы и вируса оспы коров. С учетом возможных погрешностей в титровании вируса и постановке анализа чувствительность ускоренного варианта выявления ОПВ можно обозначить диапазоном

10^3 - 10^4 БОЕ/мл. Оба варианта дот-анализа специфичны и не обнаруживают взаимодействий с препаратами незараженной клеточной культуры и с гетерогенными контролями.

Таблица 1 - Чувствительность выявления препаратов ОПВ в разных вариантах условий постановки дот-иммуноанализа.

Вирус	Тип образца	Исходный титр, БОЕ/мл	Рутинный анализ		Ускоренный анализ	
			Развед.	Титр, БОЕ/мл	Развед.	Титр, БОЕ/мл
ВНО штамм Ind-3a	1	$8,0 \times 10^6$	Н.о.	Н.о.	1/800	1×10^4
ВОО штамм V79-1-005	1	$4,0 \times 10^6$	Н.о.	Н.о.	1/1600	$2,5 \times 10^3$
ВОВ штамм ABCNJ	3	$6,9 \times 10^8$	1/1600	$4,3 \times 10^5$	1/6400	$1,1 \times 10^5$
	4	$4,0 \times 10^8$	1/800	$5,0 \times 10^5$	1/1600	$2,5 \times 10^5$
ВОВ штамм A34R_ [D110N_K151E]	1	$1,1 \times 10^6$	1/800	$1,4 \times 10^3$	1/800	$1,4 \times 10^3$
ВОВ штамм ЛИВП	1	$1,1 \times 10^7$	1/3200	$3,6 \times 10^3$	1/6400	$1,8 \times 10^3$
	2	$3,6 \times 10^7$	1/1600	$2,2 \times 10^4$	1/3200	$1,1 \times 10^4$
	3	$8,5 \times 10^6$	1/3200	$2,6 \times 10^3$	1/12800	$6,6 \times 10^2$
	4	$3,0 \times 10^8$	1/400	$7,5 \times 10^5$	1/400	$7,5 \times 10^5$
ВЭ штамм К-1	1	$2,3 \times 10^6$	1/200	$1,1 \times 10^4$	1/800	$2,8 \times 10^3$
	2	$1,9 \times 10^7$	1/100	$1,9 \times 10^5$	1/400	$4,8 \times 10^4$
	3	$8,5 \times 10^6$	1/100	$8,4 \times 10^4$	1/400	$2,1 \times 10^4$
ВОК штамм GRI-90	1	$9,8 \times 10^6$	1/200	$4,8 \times 10^4$	1/800	$1,2 \times 10^4$
	2	$3,0 \times 10^7$	1/200	$1,5 \times 10^5$	1/400	$7,6 \times 10^4$
	3	$1,3 \times 10^7$	1/200	$6,4 \times 10^4$	1/1600	$8,0 \times 10^3$
ВОКр штамм Утрехт	1	$1,0 \times 10^6$	1/1600	$6,2 \times 10^2$	1/1600	$6,2 \times 10^2$
Контроль клеточной культуры	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
Гетерогенный контроль	Вет. оспа	0	0	0	0	0
	Корь	0	0	0	0	0
	Краснуха	0	0	0	0	0

Н.о. – не определяли

Данные, приведенные в таблице 1, свидетельствует о том, что в очищенном материале вирусные антигены в том и другом варианте постановки анализа выявляются с примерно одинаковой чувствительностью, тогда как в менее очищенном препарате чувствительность одностадийного метода заметно возрастает. Механизм этого эффекта становится понятен при электронномикроскопическом исследовании смесей вирусных препаратов с иммунозолом Au-АТ а/РОХ. Снимки наиболее типичных видов таких смесей, приведены на рисунке 6.

На рисунке 6 видно, что частицы иммунозоля образуют крупные конгломераты на вирусных частицах и субвирусных структурах, причем в менее очищенном материале таких скоплений частиц золя на невирсионных образованиях визуально определяется значительно больше, чем в чистом препарате. Вероятно, усиление оптического сигнала в анализе происходит именно за счет связывания на подложке крупных агрегатов частиц коллоидного золота, образующихся на субвирусных структурах.

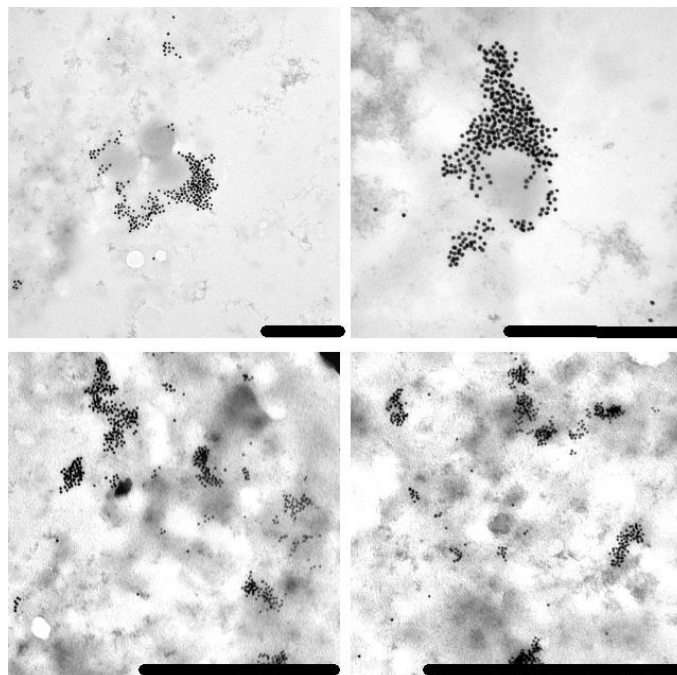


Рисунок 6. Наиболее типичные виды под электронным микроскопом смесей: верхний ряд – очищенного ВОВ (ЛИВП)-4 и нижний ряд – неочищенного ВОВ (ЛИВП)-3 вирусов осповакцины с иммунозолем Au-AT а/РОХ. Черные вставки под рисунками соответствуют размеру 0,5 мкм.

Учитывая субъективный характер визуального учета результатов, для объективной оценки достоверности полученных данных изображения матриц оцифровывали с использованием планшетного сканера и обрабатывали с применением ранее разработанной компьютерной программы. По полученным цифровым значениям интенсивности окраски тестовых точек в трех повторах эксперимента с помощью программы «Excel» рассчитывали средний результат и доверительный интервал для вероятности 95% и сравнивали результаты визуального и инструментального учета. Примеры такого сравнения приведены в таблице 2 и на рисунке 7.

Таблица 2 - Результаты инструментального учета результатов выявления ОПВ в препарате ВОВ (ЛИВП)-3 в рутинном и ускоренном вариантах дот-иммуноанализа.

Вирусный препарат	Результаты инструментального учета в условных единицах ($n=3, p=0,95$)					
	Рутинный (II) анализ			Ускоренный (I) анализ		
	Разведение	Тест, $M \pm \varepsilon$	$K+, M \pm \varepsilon$	Разведение	Тест, $M \pm \varepsilon$	$K+, M \pm \varepsilon$
ВОВ (ЛИВП)-3	1/100	1208±23	1253±33	1/100	1411±22	939±32
	1/200	1118±16	1211±24	1/200	1287±16	1051±24
	1/400	947±13	1141±20	1/400	1028±28	1356±28
	1/800	467±10	1156±12	1/800	818±27	1241±36
	1/1600	278±04	1261±18	1/1600	436±24	1244±27
	1/3200	189±08	1248±21	1/3200	356±12	1240±22
	1/6400	136±16	1159±17	1/6400	276±08	1236±20
	1/12800	278±06	1148±17	1/12800	208±14	1238±24
	1/25600	308±08	1106±14	1/25600	130±06	1242±22
ОС _{крит}	135					

- $M \pm \varepsilon$ – среднее и доверительный интервал для данных трёх анализов ($n=3, p=0,95$)
- ОС_{крит} - интенсивность отсекаемого значения оптического сигнала,
- жирным шрифтом выделены положительные результаты теста.

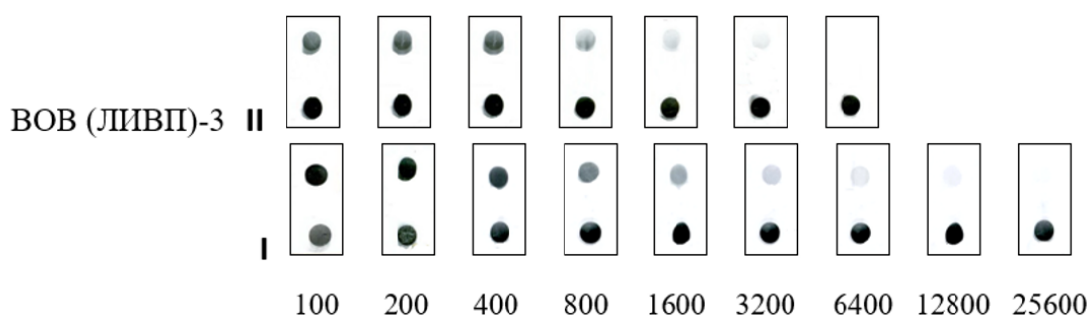


Рисунок 7. Результаты визуального учета выявления ОПВ в препарате ВОВ (ЛИВП)-3 в рутинном (II) и ускоренном (I) вариантах дот-иммуноанализа. Цифрами под матрицами указаны факторы разведения вирусного препарата.

При сравнении рисунка 7 и таблицы 2 видно, что результаты, полученные при визуальном и инструментальном учете, полностью совпадают.

Оценка выявления ортопоксвирусов в клинических и биологических материалах

Источником биологических материалов служил 6-месячный кролик породы «Шиншилла» массой 2,0 – 2,5 кг, полученный из питомника лабораторных животных ФБУН ГНЦВБ «Вектор» и инфицированный интраназально вирусом оспы кроликов (ВОКр) (штамм Утрехт) в дозе 10^4 БОЕ. Наблюдение за инфицированным кроликом осуществляли в течение 7 суток с момента заражения до гибели животного. В течение всего инфекционного периода ежедневно из ушной вены отбирали по 3 мл крови. После образования сгустка каждую пробу разделяли на сыворотку и форменные элементы, из которых готовили 10% суспензию. Полученные образцы исследовали в ускоренном дот-анализе. Результаты анализа приведены на рисунке 8.

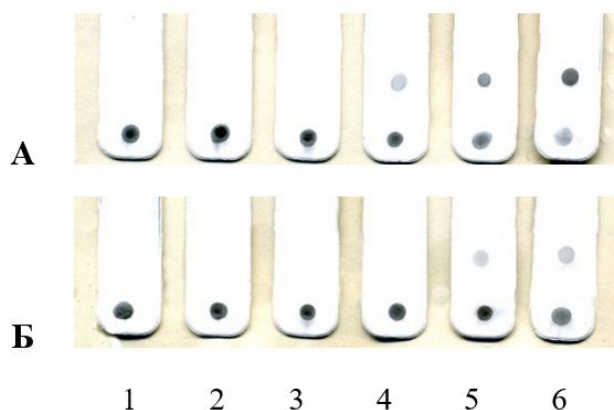


Рисунок 8. Вид белковых матриц после выполнения ускоренного дот-анализа образцов выворотки крови (А) и форменных элементов крови (Б) инфицированного кролика. Цифрами под матрицами обозначены дни с момента заражения.

Видно, что в сыворотке крови вирус обнаруживается с 4 дня после заражения, что совпадает с повышением температуры тела. Содержание вируса в сыворотке резко возрастает в последующие дни до гибели кролика. В суспензии форменных элементов вирус выявляется на сутки позднее.

После гибели кролика отбирали по 6 образцов массой 0,1-0,2 г из разных участков почек, печени, легких и селезенки, а также кусочков ($0,5 \text{ см}^2$) кожи из зоны с видимыми высыпаниями. Отбор и подготовку (получение 10%-х гомогенатов на физиологическом растворе) образцов проводили в соответствии с

Методическими указаниями «Лабораторная диагностика натуральной оспы». Полученные гомогенаты вносили в конъюгат в соотношении 1:10 и выполняли анализ. Результаты приведены на рисунке 9.

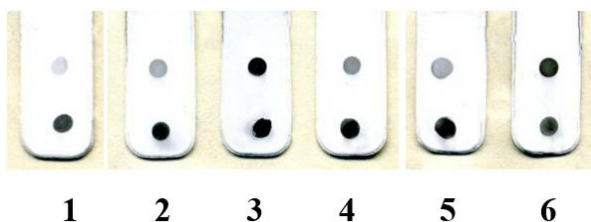


Рисунок 9. Вид белковых матриц после ускоренного анализа гомогенатов клинических образцов (А): 1 - почка, 2 – селезенка, 3 – легкое, 4 – печень, 5 и 6 - участки кожи с папулезными высыпаниями.

Видно, что вирус обнаруживается во всех исследованных органах погибшего кролика.

Кроме образцов от зараженного кролика исследовали 10% суспензии органов мышей линии BALB/c с массой тела 13-16 г, интраназально инфицированных ВОВ(ЛИВП)-4 в дозах 10^6 - 10^8 БОЕ/30 мкл/животное. Забор проб органов осуществляли на 3, 7, 10 сутки заболевания, после цервикальной дислокации. Для исследования готовили 10% гомогенаты на среде ДМЕМ. Титры вирусов в полученных тканевых гомогенатах после нескольких актов замораживания-оттаивания определяли методом бляшек на культуре клеток CV-1. Характеристики предоставленных образцов приведены в таблице 3, а результаты их ускоренного дот-анализа на рисунке 10.

Таблица 3 - Характеристики исследованных биологических образцов от мышей

№ образца	Инфицирующая доза	Орган	Титр, БОЕ/мл
1	Высокая	Носовая перегородка со слизистой	$1,8 \cdot 10^7$
2		Легкие	$1,8 \cdot 10^6$
3		Головной мозг	$9,1 \cdot 10^4$
4	Низкая	Носовая перегородка со слизистой	$4,0 \cdot 10^3$
5		Печень	10
6		Селезенка	80
7	0	Селезенка	0
8		Головной мозг	0
9		Головной мозг	0
10		Легкие	0

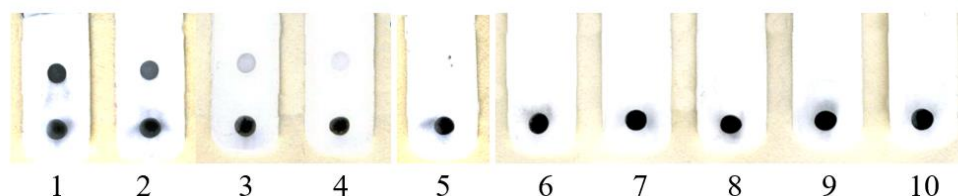


Рисунок 10. Вид белковых матриц после ускоренного анализа гомогенатов клинических образцов инфицированных мышей. Характеристики образцов приведены в табл. 3.

На рисунке 10 видно, что вирусы надежно определяются в органах мыши, зараженной высокой дозой ВОВ(ЛИВП)-4. При низкой дозе инфицирования в слизистой носа вирус выявляется на пределе чувствительности. Таким образом надежное определение ОПВ в клинических образцах инфицированных животных возможно при вирусной нагрузке, превышающей 10^4 БОЕ/мл.

Из клинических материалов человека мы располагали корочкой с пустулы на месте введения осповакцины (массой 0,2 г), отпавшей на 29 сутки после вакцинации. Корочку высушивали, растирали в фарфоровой ступке, суспендировали в 1 мл физиологического раствора и выполняли ускоренный до-анализ. Результат анализа приведен на рисунке 11.



Рисунок 11 - Вид белковой матрицы после анализа суспензии корочки с пустулы на месте вакцинации, отпавшей на 29 сутки после введения осповакцины.

Для оценки ориентировочного содержания ВОВ в суспензии из корочки выполняли параллельное титрование этой суспензии и препарата ВОВ(ЛИВП)-3 с известным биологическим титром ($8,5 \times 10^6$ БОЕ/мл). Из этих образцов готовили серии двукратных разведений на РБРК и выполняли с ними ускоренный дот-анализ. Результаты оценки приведены на рисунке 12.

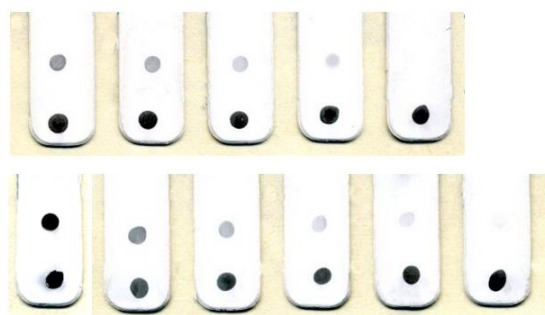


Рисунок 12. Сравнительный анализ серий разведений суспензии из корочки (верхний ряд) и препарата ВОВ(ЛИВП)-3 (нижний ряд). Цифрами под матрицами указаны факторы разведений.

100 200 400 800 1600 3200

При сравнении видно, что интенсивность окраски пятен в тестовой зоне при анализе суспензии из корочки на одно разведение отстает от вирусного образца, таким образом, содержание вируса в суспензии из корочки ориентировочно вдвое меньше, чем в исходном препарате ВОВ(ЛИВП)-3 и составляет около 5×10^6 БОЕ/мл.

Таким образом, экспрессный дот-иммуноанализ позволяет в течение 35 мин при комнатной температуре выявлять ОВП в неочищенных вирусных образцах и клинических пробах в диапазоне 10^3 – 10^4 БОЕ/мл. Такая чувствительность сходна с лимитом обнаружения для ИФА с использованием тщательно подобранных пар моноклональных антител и превышает чувствительность известных систем для внелабораторной («point of care») детекции ОПВ (Stern D., 2011). Использование в тесте одного вида поликлональных антител и в качестве реагента захвата и в качестве реагента детекции значительно упрощает и снижает стоимость производства диагностической системы (Czerny C.P., 1989).

Изготовление серий наборов и оценка их эксплуатационных характеристик

По отработанной на предыдущих этапах методологии изготовлены 3 серии по 10 наборов (600 анализов) для ускоренного выявления поксвирусов (наборам присвоено условное наименование «РОХ-экспресс»). Наборы использованы для оценки воспроизводимости и заложены на хранение для исследования стабильности по ГОСТ Р ИСО 23640-2015 «Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro». Все исследования проводили с использованием контрольного образца (КО) - ВОВ (ЛИВП)-3 $1,0 \times 10^5$ БОЕ/мл. Результаты анализа разведений контрольного образца в трех повторях регистрировали с применением

программы инструментального учета в условных единицах. Рассчитывали средний результат (M), доверительный интервал (ε) для вероятности и коэффициент вариации (V) для вероятности $p=0,95$. Результаты оценки, полученные на наборах одной (обычный шрифт) и разных (жирным шрифт) серий набора приведены в таблице 4. Расчетные данные выделены в таблице серой заливкой, литерой Σ обозначены показатели между сериями.

Таблица 4 - Результаты оценки воспроизводимости анализа при серийном изготовлении наборов «РОХ-экспресс»

Серия	Образец	Оптические сигналы, полученные при анализе контрольного образца осповакцины (условные единицы)					
		Разведения образца					K+
		1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	
1	1	800	450	350	150	50	1200
	2	810	455	347	146	52	1210
	3	830	435	364	165	55	1215
	$M \pm \varepsilon$	813 $\pm$ 15	447 $\pm$ 10	354 $\pm$ 9	154 $\pm$ 10	52 $\pm$ 3	1208 $\pm$ 8
	$V, \%^*$	2%	2%	3%	7%	5%	1%
2	1	810	455	355	138	48	1230
	2	825	460	348	145	52	1218
	3	816	440	359	155	54	1228
	$M \pm \varepsilon$	817 $\pm$ 8	452 $\pm$ 10	354 $\pm$ 6	146 $\pm$ 9	51 $\pm$ 3	1225 $\pm$ 6
	$V, \%$	1%	2%	2%	6%	6%	1%
3	1	830	437	355	161	48	1189
	2	828	456	364	147	53	1245
	3	812	444	334	158	50	1222
	$M \pm \varepsilon$	823 $\pm$ 10	446 $\pm$ 10	351 $\pm$ 15	155 $\pm$ 7	50 $\pm$ 3	1219 $\pm$ 28
	$V, \%$	1%	2%	4%	5%	5%	2%
Σ	$M \pm \varepsilon$	818$\pm$11	448$\pm$9	353$\pm$9	152$\pm$9	51$\pm$3	1217$\pm$17
	$V, \%$	1%	2%	3%	6%	5%	1%

Показателем удовлетворительной воспроизводимости как внутри одной серии, так и между сериями наборов по ГОСТ Р ИСО 23640-2015 считается коэффициент вариации в пределах 8%. Из данных таблицы 5 видно, что этот показатель укладывается в обозначенную норму. Таким образом, показатели воспроизводимости наборов, как внутри, так и между сериями можно считать приемлемыми.

С целью предварительной оценки срока годности наборов реагентов «РОХ-экспресс» было проведено ускоренное определение стабильности. Для ускоренного исследования стабильности были заложены на хранение при температуре 25, 30 и 37 °С аналитические ванны и белковые матрицы из трех серий набора. Каждые 7 дней с их применением проводили анализ КО и с использованием программы инструментального учета регистрировали оптический сигнал в условных единицах. Расчет срока годности при ускоренном исследовании стабильности выполняли на основе уравнения Аррениуса (методика расчета по ГОСТ Р ИСО 23640-2015). На основе полученного уравнения регрессии, ожидаемое время стабильности наборов «РОХ-экспресс» при температуре хранения 4-8 °С составляет 470 дней.

Для исследования долговременной стабильности наборов при температуре (6 $\pm$ 2) °С каждые 3 месяца проводили анализ контрольного образца ВОВ (ЛИВП) с использованием аналитических ванн и белковых матриц из трех серий наборов, хранящихся в холодильнике. Результаты анализа разведений контрольного образца в трех повторах регистрировали с

применением программы инструментального учета в условных единицах. Кроме расчетных статистических показателей, описанных в предыдущих экспериментах, определяли изменения оптических сигналов (Δ ОС) в процентах по отношению к исходному (срок хранения 0 мес.) за период хранения. Критерием, при котором реагенты становятся непригодными, выбрана интенсивность оптического сигнала менее 70% от исходного. Установлено, что хранение при 4°C в течение 12 месяцев вызывает максимальное снижение оптических сигналов по отношению к исходным не более 18%, что не сказывается заметно на диагностических характеристиках набора. Таким образом, по истечении 12 месяцев хранения в рекомендованных условиях показатели чувствительности и специфичности набора сохранялись на уровне 100%.

Аналогичным образом проведены эксперименты по испытанию стабильности наборов с имитацией условий транспортирования (наборы хранили 10 суток при температуре 25°C, а затем при температуре 2 - 8°C до окончания срока хранения) и при применении (первичную упаковку белковых матриц из наборов вскрывали при закладке на хранение). Результаты экспериментов показали, что при испытаниях долговременной стабильности набора с имитацией условий транспортирования и при вскрытых первичных упаковках белковых матриц снижение оптических сигналов по отношению к исходным более значительное, чем при хранении в целой первичной упаковке, однако этот показатель не превышает установленный предел 30% и не сказывается на характеристиках чувствительности и специфичности.

Таким образом, оценка стабильности в реальных условиях хранения, в том числе с имитацией условий транспортирования и вскрытием первичной упаковки, не выявила критического ухудшения качества наборов в течение 12 мес. хранения при 4 ± 2 °C, что соответствует характеристикам набора заявленным в проекте ТУ.

Разработка рабочей панели образцов предприятия «РП АГ(+/-)РОХ»

Для финальных проверок чувствительности и специфичности, а также для текущего контроля технологии изготовления и качества наборов в выпускаемых сериях создана панель образцов, позволяющая оценивать основные характеристики наборов.

При создании панели соблюдались следующие принципы:

1. Панель должна включать образцы:
 - содержащие разные виды непатогенных или слаботогенных ОПВ в определяемых концентрациях, дающие представление о способности набора выявлять различные родоспецифичные ОПВ - диагностической чувствительности набора;
 - содержащие ВОВ (ЛИВП) в высокой, средней и низкой концентрации, дающие представление о пределе обнаружения ОПВ – аналитической чувствительности набора;
 - содержащие гетерогенные антигены возбудителей, вызывающих экзантематозные заболевания (корь, краснуху и ветряную оспу), а также субстрат для выращивания ОПВ (клеточную культуру CV-1, и питательную среду DMEM/F-12 (1:1)), дающие представление о специфичности набора.
2. Панель должна быть достаточно компактной для оперативной оценки эффективности технологических приемов и качества образцов набора.

В соответствии с изложенными выше принципами созданная панель образцов «РП АГ(+/-)РОХ», которая содержит три блока по пять образцов.

Первый блок включает образцы № 1-5, содержащие положительные образцы вирусов: осповакцины штаммов ЛИВП и ABCNJ, оспы коров штамма GRI-90, экстремелии

штамма К-1, оспы кроликов штамма Утрехт в концентрации 5×10^5 БОЕ/мл. При анализе с помощью набора эти образцы должны демонстрировать положительные результаты в тестовых контрольных точках белковых матриц (что указывает на способность тест-системы определять все перечисленные вирусы).

Второй блок включает образцы № 6-9, содержащие образцы ВОВ(ЛИВП) в концентрациях 5×10^5 , 1×10^5 , 5×10^4 , 1×10^4 и 5×10^3 БОЕ/мл. При анализе с помощью набора эти образцы должны демонстрировать положительные результаты в тестовой точке со снижением интенсивности окраски при уменьшении концентрации вируса в образце (что указывает на обеспечение аналитической чувствительности не менее 10^4 БОЕ/мл), при этом тестовая точка образца № 10 может не иметь окраски (конечная точка титрования);

Третий блок включает образцы №№ 11-13, содержащие гетерогенные антигены вирусов (кори, краснухи и ветряной оспы) в концентрации 1 мкг/мл; образец 14, содержащий клеточную культуру CV-1; а образец № 15 питательную среду DMEM/F-12. При анализе с помощью набора эти образцы должны демонстрировать отсутствие окраски в тестовых контрольных точках белковых матриц (что указывает на обеспечение диагностической специфичности анализа 100%). Основные характеристики панели приведены в таблице 5.

Таблица 5 — Основные характеристики рабочей панели «РП АГ(+/-)РОХ»

№ образца панели	Основной компонент образца	Концентрация компонента	$M \pm \varepsilon$, отн. ед. ($n=3$)	V, %
1	Вирус осповакцины, штамм ЛИВП	5×10^5 БОЕ/мл	1340±22	2
2	Вирус осповакцины, рекомбинантный штамм ABCNJ	5×10^5 БОЕ/мл	879±14	1
3	Вирус оспы коров, штамм	5×10^5 БОЕ/мл	957±24	2
4	Вирус экстремелии, штамм	5×10^5 БОЕ/мл	645±28	2
5	Вирус осповакцины, штамм Утрехт (ВОКр)	5×10^5 БОЕ/мл	1043±44	6
6	Вирус осповакцины, штамм ЛИВП	5×10^5 БОЕ/мл	1322±22	1
7		1×10^5 БОЕ/мл	1018±14	1
8		5×10^4 БОЕ/мл	748±22	1
9		1×10^4 БОЕ/мл	396±32	5
10		5×10^3 БОЕ/мл	236±30	4
11	Антиген вируса кори	1 мкг/мл	154±10	1
12	Антиген вируса краснухи	1 мкг/мл	153±9	1
13	Антиген вируса ветряной оспы	1 мкг/мл	151±7	1
14	Культура клеток CV-1	Исходная	153±7	1
15	Питательная среда DMEM/F-12 (1:1) с 2 % эмбриональной сыворотки коров, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 МЕ/мл пенициллина.	Исходная	153±6	1
К+ ($n=15$)			1340±35	1
К- ($n=15$)			150±22	1
ОПкр			200	

Примечания: $M \pm \varepsilon$ – среднее арифметическое и доверительный интервал, отн. ед. ($n=3$, $p=0,95$); V – коэффициент вариации, % ($n=3$, $p=0,95$)

Разработка научно-технической документации для регистрации набора.

По результатам исследований подготовлены проекты:

- Лабораторного регламента на производство набора реагентов для ускоренного выявления ортопоксвирусов методом дот-иммуноанализа в формате «у постели больного» «РОХ-экспресс»;
- Инструкции по применению набора реагентов для ускоренного иммунохимического выявления ортопоксвирусов «РОХ-экспресс»;
- Технических условий. Набор реагентов для ускоренного выявления ортопоксвирусов методом дот-иммуноанализа в формате «у постели больного» «РОХ-экспресс»;

Выводы

1. Для быстрого выявления ортопоксвирусов во внелабораторных условиях может быть использован автономный набор, включающий комплект белковых матриц, аналитические ванны, заполненные готовыми растворами и компоненты проявляющей системы. Набор рассчитан на 20 анализов и позволяет выполнять анализ в течение 35 мин при 20-40°C.

2. В качестве реагентов захвата в тесте могут быть использованы: поликлональные антитела, выделенные сульфатом аммония из сыворотки кролика, иммунизированного осповакциной; для контроля работоспособности теста - контрольный культуральный образец вируса осповакцины штамма ЛИВП с концентрацией 10^5 БОЕ/мл, инактивированный прогреванием; а для контроля фоновых эффектов - антитела из нормальной сыворотки крови кролика.

3. Эффективная сорбция реагентов захвата на подложке происходит в слабокислых условиях (рН 6,0) при инкубации в течение 2 ч при 4°C. Сушка матриц должна производиться при 40°C в течение не менее 2 ч. Лучшее блокирование свободной поверхности подложек достигается использованием раствора 0,2% казеина. Для выполнения одностадийного теста пригодны рабочие растворы на основе фосфатного-солевого буферного раствора.

4. В ускоренном анализе эффективно использование конъюгата на основе коллоидного золота (20 нм), связанного с поликлональными антителами (Au-Ат а/РОХ), а для эффективного проявления результатов иммуноанализа может использоваться двухкомпонентный проявитель, включающий таблетку сухой смеси (метол и лимонная кислота в соотношении 2:3), и жидкий компонент (0,4%-й раствор нитрата серебра). Повышение контрастности и стабильности оптических сигналов может быть достигнуто путем обработки проявленной белковой матрицы щелочным раствором тиомочевины.

5. Учет результатов анализа может осуществляться визуально или инструментально с помощью компьютерной программы. Результаты, полученные при визуальном и инструментальном учете, полностью совпадают.

6. Одностадийный ускоренный вариант дот-иммуноанализа, превышает по чувствительности двустадийный рутинный анализ и позволяет выявление всех исследованных ортопоксвирусов в слабо очищенных вирусных препаратах в диапазоне 10^3 - 10^4 БОЕ/мл, а также в клинических материалах при их содержании не более 10^4 БОЕ/мл. Дот-анализ специфичен и не обнаруживает взаимодействий с препаратами незараженной клеточной культуры и с гетерогенными контролями возбудителей эритематозных инфекций.

7. Воспроизводимость наборов при их серийном производстве внутри серии и между сериями соответствует нормативам ГОСТ Р ЕН 13640-2010 «Исследование

стабильности реагентов для диагностики *in vitro*». Расчеты на основе ускоренной оценки стабильности показали, что ожидаемый срок годности набора при условии снижения оптических сигналов не более 30 % составляет 470 дней. Оценка стабильности в реальных условиях хранения, в том числе с имитацией условий транспортирования (10 суток при 25°C) и со вскрытием первичной упаковки, не выявила ухудшения качества наборов в течение 12 мес. хранения при 4°C.

8. Для финальных проверок чувствительности и специфичности, а также для текущего контроля технологии изготовления и качества наборов создана рабочая панель образцов предприятия «РП АГ(+/-) РОХ», позволяющая оценивать основные характеристики наборов.

9. Подготовлены проекты научно-технической документации для регистрации набора.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. **Ушкаленко Н.Д.**, Ерш А.В., Филатов П.В., Полтавченко А.Г. Разработка быстрого диагностического теста для выявления ортопоксвирусных инфекций // Сборник тезисов VI Международной конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (OpenBio - 2019). 2019. С. 194-195.
2. Ерш А.В., Полтавченко А.Г., Филатов П.В., **Ушкаленко Н.Д.** Разработка экспресс-теста для выявления ортопоксвирусных инфекций // *Медицина труда и экология человека*, 2020, №3: 143-148
3. Филатов П.В., Полтавченко А.Г., Ерш А.В., **Ушкаленко Н.Д.**, Кунгурцев К.С. и др. Разработка компьютерной программы для количественного учета результатов первичного скрининга и серомониторинга ортопоксвирусных инфекций // В сб. тр. Всероссийской международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика и безопасность - 2020» (Москва, 2020). Москва. 2020. С. 225-227.
4. Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Филатов П.В., **Ушкаленко Н.Д.** Лабораторные испытания быстрого теста для выявления ортопоксвирусов // В сб. тр. VII Всероссийской международной научно-практической конференции «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (Сочи, 2020). Сочи. 2020. С. 156-158
5. Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Филатов П.В., **Ушкаленко Н.Д.**, Якубицкий С.Н., Сергеев Ал.А., Щербаков Д.Н. Ускоренный способ выявления ортопоксвирусов // *Проблемы ООИ*, 2021, 3: 86-93 DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-106-113
6. **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: 2580. DOI: 10.3390/v14112580
7. Мультиплексный дот-иммуноанализ в диагностике инфекционных заболеваний: Монография / А. Г. Полтавченко, А. В. Ерш, П. В. Филатов, **Ушкаленко Н.Д.**; Отв. редактор А.Г. Полтавченко. – Чебоксары: ООО «Издательский дом «Среда», 2022. – 224 с. – ISBN 978-5-907561-57-1. – DOI: 10.31483/a-10421. – EDN LCCORP.
8. Филатов П.В., Ерш А.В., **Ушкаленко Н.Д.**, Полтавченко А.Г. Отработка способа бесконтактного дозирования иммунореагентов при создании мультиплексных тестов // В сб. тр. XV Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И.Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы», (Москва, 27–29 марта 2023). – Москва. 2023. С. 227
9. **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: 10.36233/0507-4088-178
10. **Ушкаленко Н.Д.**, Ерш А.В., Филатов П.В., Полтавченко А.Г. Быстрые иммунохимические методы для выявления ортопоксвирусов // X Международная конференция молодых учёных: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов (26-29 сентября 2023 г., Кольцово)
11. **Ушкаленко Н.Д.**, Ерш А.В., Филатов П.В., Полтавченко А.Г. Разработка быстрых иммунохимических методов для выявления ортопоксвирусов // В сб. тр. III Всероссийского Конгресса "Академия лабораторной медицины: новейшие достижения", (Москва, 28–30 мая 2024). Москва. 2024. С. 27. ISBN 978–5–906484–76–5

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И ОКРАЩЕНИЙ

БОЕ – бляшкообразующие единицы

ВНО – вирус натуральной оспы

ВОВ – вирус осповакцины

ВОК – вирус оспы коров

ВОКр – вирус осповакцины, штамм Утрехт

ВОИС – вакцина оспенная инаktivированная сухая

ВОО – вирус оспы обезьян

ВЭ – вирус эктромелии

ИФА – иммуноферментный анализ

КО – контрольный образец

МКАт – моноклональные антитела

ОПВ – ортопоксвирусы

ОС – оптический сигнал

ПВХ – поливинилхлорид

ПП – полипропилен

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭГ – полиэтиленгликоль

РБР-О - раствор для разведения образца

РБР-К – раствор для разведения конъюгата

ФСБ-Т – фосфатно-солевой буферный раствор с твином

Ат а/РОХ – антитела из сыворотки кролика иммунизированного вирусом осповакцины

Ат НКС – антитела из нормальной сыворотки кролика