

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И
БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ
В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ
ЧЕЛОВЕКА

на правах рукописи

Шульгина Ирина Сергеевна
**«Иммуноферментное выявление вируса оспы обезьян с использованием
видоспецифичных моноклональных антител к белку А29»**

1.5.10 – Вирусология
Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Пьянков Олег Викторович

Кольцово – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ.....	9
ВВЕДЕНИЕ.....	10
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	21
1.1 Таксономия ВОО и эпидемиология оспы обезьян.....	21
<i>1.1.1 Таксономическое положение.....</i>	<i>21</i>
<i>1.1.2 Геномная организация.....</i>	<i>21</i>
<i>1.1.3 Историческая справка и эпидемиология.....</i>	<i>26</i>
1.2 Белок А29 как мишень иммунохимической диагностики.....	31
<i>1.2.1. Молекулярная характеристика белка А29.....</i>	<i>31</i>
<i>1.2.2. Структурно-функциональная организация.....</i>	<i>32</i>
<i>1.2.3 Функциональная активность.....</i>	<i>33</i>
1.3 Антигенная структура, перекрестная реактивность и иммунный ответ.....	35
<i>1.3.1 Антигенный состав вириона.....</i>	<i>35</i>
<i>1.3.2 Перекрестная реактивность.....</i>	<i>35</i>
<i>1.3.4 Эпитопный анализ.....</i>	<i>36</i>
<i>1.3.5 Долговременная динамика.....</i>	<i>36</i>

1.4 Моноклональные антитела и иммуноферментный анализ в диагностике ортопоксвирусов.....	37
1.4.1 Способы получения моноклональных антител.....	37
1.4.2. Современные модификации.....	38
1.4.4 Метод ИФА для диагностики ортопоксвирусных инфекций.....	39
1.4.5 Выявление антигена.....	40
1.4.6 Выбор мишени для выявления антигена методом «сэндвич» ИФА.....	41
1.4.7 Диагностическая ценность тестов на разных платформах.....	42
1.5 Терапия, профилактика и нерешенные проблемы.....	47
1.5.1 Терапия ортопоксвирусных инфекций.....	48
1.5.2 Специфическая профилактика.....	49
1.5.3 Нерешенные проблемы.....	50
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	53
2.1 Вирусные препараты.....	53
2.2 Культивирование и выделение вирусов.....	54
2.3 Обеззараживание.....	55
2.4 Лабораторные животные.....	56

2.5 Биологический и клинический материал.....	57
2.6 Референсная диагностика.....	61
2.7 Рекомбинантные белки для создания моноклональных антител.....	62
2.8 Гибридомы и моноклональные антитела.....	63
2.9 Получение поликлональных антител.....	65
2.10 Получение конъюгатов.....	65
2.10.1 Получение биотинилированного конъюгата.....	65
2.10.2 Получение конъюгата с пероксидазой хрена.....	66
2.10.3 Получение конъюгата с флуоресцеинизотиоцианатом.....	67
2.11 Контрольные образцы.....	67
2.12 Процедура ИФА.....	69
2.12 Соблюдение этических требований.....	73
ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ БЕЛКА А29 ВИРУСА ОСПЫ ОБЕЗЬЯН И ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ.....	76
3.1 Контроль качества нативных антигенов.....	76
3.2 Организация поэтапного скрининга гибридом для отбора продуцентов видоспецифичных моноклональных антител к вирусу оспы обезьян.....	78

3.3	Реактивность МКА А29L-7 с антигеном ВОО в прямом ИФА.....	83
-----	---	----

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ БЕЛКА А29 ВИРУСА ОСПЫ ОБЕЗЬЯН.....85

4.1.	Получение ПКА для разработки эффективного иммуносорбента.....	85
------	---	----

4.2	Оптимизация условий приготовления иммуносорбента.....	86
-----	---	----

4.3	Выбор оптимальной метки для МКА с целью детекции антигена ВОО.....	88
-----	--	----

4.4	Диагностическая ценность набора реагентов при использовании протокола бесприборной детекции.....	90
-----	--	----

4.4.1	<i>Оптимизация условий бесприборного протокола.....</i>	90
-------	---	----

4.4.2	<i>Диагностическая чувствительность и специфичность бесприборного протокола.....</i>	92
-------	--	----

4.5	Сравнительная характеристика протоколов ИФА диагностики ВОО по антигену А29	95
-----	---	----

4.6	Апробация протоколов на клинических образцах.....	96
-----	---	----

ГЛАВА 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНА ВИРУСА ОСПЫ ОБЕЗЬЯН И ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ НАТИВНЫХ И ОБЕЗЗАРАЖЕННЫХ ОБРАЗЦОВ.....101

5.1	Определение пригодности образцов различного происхождения для анализа после обеззараживания кипячением.....	101
-----	---	-----

5.2	Влияния метода обеззараживания на аналитическую чувствительность ИФА..	103
5.3	Апробация набора реагентов при исследовании клинических образцов.....	106
5.3.1	<i>Клинико-эпидемиологическая характеристика исследуемой выборки.....</i>	<i>107</i>
5.3.2	<i>Сравнение диагностических характеристик бесприборного и лабораторного протоколов ИФА.....</i>	<i>108</i>
 ГЛАВА 6. ПОДГОТОВКА МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ <i>IN VITRO</i> «ВЕКТОР ИФА ВОО-А29L АГ» К РЕГИСТРАЦИИ.....		
6.1	Соответствие нормативно-технической документации.....	111
6.1.1	<i>Технические условия ТУ 20.59.52-117-05664012-2025.....</i>	<i>111</i>
6.1.2	<i>Стандартные операционные процедуры.....</i>	<i>113</i>
6.1.3	<i>Инструкция по применению.....</i>	<i>114</i>
6.2	Технические испытания медицинского изделия.....	116
6.3	Клинико-лабораторные исследования (клинические испытания).....	117
6.3.1	<i>Диагностическая чувствительность.....</i>	<i>118</i>
6.3.2	<i>Диагностическая специфичность.....</i>	<i>119</i>
6.3.3	<i>Влияние интерферирующих веществ.....</i>	<i>125</i>
6.3.4	<i>Повторяемость и воспроизводимость.....</i>	<i>126</i>

6.3.5	Согласованность с референсным методом.....	127
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		129
ВЫВОДЫ.....		131
БЛАГОДАРНОСТИ.....		133
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....		134
ПРИЛОЖЕНИЯ.....		149
ПРИЛОЖЕНИЕ А Паспорт коллекционного штамма микроорганизмов		
	<i>E. coli</i> BL21(DE3)/PET28B-AGPOX.....	149
ПРИЛОЖЕНИЕ Б Паспорт коллекционного штамма микроорганизмов.....		
	<i>E. coli</i> Rosetta2/pET-32(a)-A29L.....	151
ПРИЛОЖЕНИЕ В Акт технических испытаний медицинского изделия <i>in vitro</i> ...		153
ПРИЛОЖЕНИЕ Г Нормативный документ		154
ПРИЛОЖЕНИЕ Д Первая страница утвержденной инструкции по применению		
набора реагентов «Вектор ИФА ВОО-A29L АГ»		155
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж Патент на изобретение.....		156
ПРИЛОЖЕНИЕ И Акт передачи образцов в Гвинейской Республике		157
ПРИЛОЖЕНИЕ К Плазмидная генетическая конструкция pET28b-MozAg,		

обеспечивающая экспрессию белка агрох клетками штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21(de3)/pET28b-APOX 158

ПРИЛОЖЕНИЕ Л Плазмидная генетическая конструкция pET-32(a)-A29L, обеспечивающая экспрессию белка Тгх-A29 клетками штамма-продуцента *Escherichia coli* Rosetta2/pET-32(a)-A29L 160

ПРИЛОЖЕНИЕ М Аминокислотная последовательность белка AgPOX 161

ПРИЛОЖЕНИЕ Н Аминокислотная последовательность белка Тгх-A29 162

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

БОЕ – бляшкообразующие единицы

ВНО – вирус натуральной оспы

ВОВ – вирус осповакцины

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВОК – вирус оспы коров

ВОО – вирус оспы обезьян

ВОО₁ – вирус оспы обезьян, штамм *hMpxV/Russia/St.Petersburg-01/2022*

ВОО₂ – вирус оспы обезьян, штамм *hMpxV/Russia/St.Petersburg-02/2022*

ВОВ (ЛИВП) – вирус осповакцины, штамм ЛИВП

ИФА – иммуноферментный анализ

КВЖ – культуральная вируссодержащая жидкость

КПоз – коэффициент позитивности

УББ – уровень биологической безопасности

МКА – моноклональные антитела

ОП – оптическая плотность

ОПВ – ортопоксвирусы

ПБА – патогенные биологические агенты

ПКА – поликлональные антитела

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

СП – санитарные правила и нормы

ТМБ – тетраметилбензидин

ТЦД₅₀ – 50% тканевая цитопатическая доза

ФСБ-Т – фосфатно-солевой буфер с твином

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В августе 2024 года Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) в лице генерального директора повторно объявила вспышку оспы обезьян чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение (ЧСМЗ) [133]. Данный статус сохранялся более года и только 5 сентября 2025 года объявили о его прекращении, при этом отметив устойчивое снижение числа новых случаев заболевания и летальности в пострадавших регионах [132].

Статистические данные с января 2024 года по март 2026 года свидетельствуют о сохранении эпидемической угрозы. За указанное время зарегистрировано более 53 тысяч подтвержденных случаев заболевания оспой обезьян, причиной которого явился вирус оспы обезьян (ВОО). Тридцать стран сообщили о 37 170 лабораторно подтвержденных случаях, включая 165 со смертельным исходом за 2025 год. Изменение характера распространения инфекции вызывает обеспокоенность. В 2025-2026 годах зафиксировано формирование устойчивых цепочек передачи новой высокопатогенной клады Ib на территории Европы, Северной Америки и Азии [24, 124].

Вирус оспы обезьян относится к роду *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae* и представляет собой вирус с ДНК-геномом и репликацией в цитоплазме клетки-хозяина [6, 83, 96]. В 2022 году ВОО продемонстрировал тревожную способность к устойчивой антропонозной передаче: согласно международному исследованию, она предположительно происходила через половой контакт у 95% инфицированных [122].

Элиминация натуральной оспы и последующее прекращение массовой вакцинации против её возбудителя, вируса натуральной оспы (ВНО) в 1980 году, привели к формированию значительной популяционной когорты восприимчивых лиц, что способствовало расширению циркуляции ВОО [93]. Обзор современных

угроз, связанных с ОПВ, включая аэриобиологические исследования, представлен в работе Онищенко Г.Г. и соавт. [93]. Дополнительным фактором риска является снижение эффективности поствакцинального иммунного ответа, что подтверждено в многочисленных исследованиях. Несмотря на снижение уровня вируснейтрализующих антител с увеличением срока после вакцинации против натуральной оспы, у ранее вакцинированных лиц может сохраняться иммунологическая память, обеспечивающая определённую степень перекрёстной защиты от вируса оспы обезьян. Сами антитела обнаруживаются у 100% вакцинированных, при этом перекрёстный иммунитет к вирусу оспы обезьян может сохраняться десятилетиями [51]. В более раннем исследовании установлено, что среди вакцинированных двадцать и более лет назад только 50% сохранили уровень нейтрализующих антител выше или на уровне защитного титра [65]. Анализ потенциальной эффективности вакцинации для сдерживания вспышек оспы обезьян в Демократической Республике Конго представлен Savinkina et al. [103]. Генетические изменения вируса, включая накопление мутаций в генах поверхностных белков под действием факторов иммунной системы хозяина, описаны в работах [46] и [127]; однако эти исследования не свидетельствуют о клинически значимом ускользании вируса от поствакцинального иммунитета, и существующие данные подтверждают сохраняющуюся защиту у вакцинированных лиц.

Особую актуальность приобретает изучение антигенной структуры ВОО, получение видоспецифичных моноклональных антител (МКА) и создание средств диагностики, позволяющих дифференцировать вирус от других ортопоксвирусов (ОПВ), включая вирус осповакцины (ВОВ) и вирус оспы коров (ВОК) [1, 4]. Одной из наиболее перспективных мишеней для создания диагностических средств является белок слияния зрелых внутриклеточных вирионов. Согласно классической номенклатуре, основанной на референсном штамме *Copenhagen* вируса осповакцины, этот белок обозначается как A27 (продукт гена A27L). У вируса оспы обезьян (референсный штамм *Zaire-96-I-16*) соответствующий гомолог получил обозначение A29 (ген A29L) [45, 80]. В универсальной номенклатуре консервативных генов ОПВ

(OPG) этому белку присвоено обозначение OPG154. Высокая гомология данного белка среди ОПВ, а также наличие видоспецифичных эпитопов делают A29 перспективной мишенью для разработки диагностических средств, позволяющих дифференцировать ВОО от других ОПВ [40, 80].

Отсутствие в России зарегистрированных тест-систем для выявления специфического антигена ВОО ограничивает возможности лабораторной диагностики и снижает оперативность противоэпидемических мероприятий [20]. Поэтому разработка отечественной тест-системы на основе метода ИФА с использованием МКА к A29 сможет повысить эффективность эпидемиологического надзора [14, 15].

Степень разработанности

Несмотря на эпидемиологическую угрозу и наличие высокочувствительного метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), который является «золотым стандартом» выявления ДНК ВОО, проблема разработки быстрых, надежных и видоспецифических диагностических средств, пригодных для применения в условиях ограниченных ресурсов, остается нерешенной [73, 98, 131].

В соответствии с требованиями СП 3.3686-21 и МР 3.1.0350-24 первичная подготовка клинического материала, подозрительного на содержание вируса оспы обезьян, включая его обеззараживание перед молекулярно-генетическим исследованием, требует соблюдения специальных мер биологической безопасности. Согласно методическим рекомендациям, указанные операции проводят в боксе микробиологической безопасности III класса. После обеззараживания материала допускается проведение дальнейших исследований в боксе микробиологической безопасности II класса [8]. Так как обработка образцов лизирующим раствором не рассматривается в действующих нормативах как метод обеззараживания, пробы не могут быть переданы за пределы «заразной» зоны для дальнейшей диагностики. Предлагаемый метод ИФА, напротив, направлен на выявление термостабильных

антигенных детерминант белка A29, допускает проведение исследования после предварительного термического обеззараживания образца (кипячение 30 мин при 98-100 °C). Важным преимуществом данного подхода является возможность проведения последующих этапов исследования обеззараженных образцов вне лабораторий УББЗ и УББ4, при условии подтверждения эффективности инаktivации и соблюдения действующих требований биологической безопасности [8, 102].

Иммуноферментная диагностика с целью выявления IgM и IgG к ОПВ основана преимущественно на антигенах ВОВ, не обеспечивая видоспецифичной диагностики оспы обезьян и не позволяя отличить постинфекционный иммунитет от поствакцинального [85]. Перечисленные ограничения, а также отсроченный характер антителообразования, делают актуальной разработку альтернативных подходов, например ИФА тест-систем для прямого выявления вирусного антигена в клиническом материале [98, 117].

Выявление вирусного антигена на основе разработок быстрых серологических тестов для ранней и массовой диагностики ВОО представляется перспективным направлением [137]. Уже сегодня зарубежные компании, такие как Sino Biological, Creative Diagnostics или Alpha Diagnostic Int., предлагают экспериментальные ИФА-наборы для детекции белка A29 ВОО [114]. Препятствиями для внедрения их в отечественную практику [20] являются: отсутствие регистрации данных в качестве медицинских изделий в Российской Федерации; недостаточный объем клинической апробации на репрезентативных выборках; логистические ограничения, связанные с поставками реагентов в условиях санкционного режима. На момент начала данного исследования зарегистрированные отечественные медицинские изделия для выявления антигена методом ИФА ВОО отсутствовали [20]. Существующие отечественные разработки либо были направлены на другие ОПВ без специфичности к ВОО [19], либо оставались на стадии лабораторного прототипа [3, 14].

В связи с потребностью системы здравоохранения в средствах диагностики, пригодных по месту оказания медицинской помощи, продолжают разрабатываться

экспресс-тесты формата ИХА. Международные компании (например, от SD Biosensor) используют принцип иммунохроматографии [113]. Их основным преимуществом является время выполнения анализа (15-30 минут) без лабораторного оборудования, что принципиально важно для мобильных бригад в очагах инфекции, аэропортов и пунктов пропуска, регионов с ограниченными ресурсами. В последнее время предложены флуоресцентные хроматографические детекторы для экспресс-диагностики у постели больного оспой обезьян [134]. Данный метод сочетает высокую чувствительность (предел обнаружения 0,5 пг/мл) с возможностью автоматизированной регистрации результатов и может быть адаптирован для использования в полевых условиях. Однако, согласно результатам независимых исследований, существующие иммунохроматографические тест-системы обладают рядом существенных ограничений: низкая по сравнению с ИФА и ПЦР аналитическая чувствительность, отсутствие объективной инструментальной регистрации результата (только визуальная оценка) и проблемы апробации таких наборов в эндемичных регионах [60].

Фундаментальные исследования [25, 57, 70, 72, 137] доказали роль поверхностного белка А29 как перспективной диагностической мишени по причине высокой иммуногенности и видоспецифичного потенциала белкового профиля для ВОО. Его главные преимущества как мишени подтверждены, он гомолог белка А27 ВОВ и ВНО (вируса натуральной оспы), но с наличием уникальных эпитопов для ВОО [57]. Его отличает диагностическое преимущество, высокая экспрессия в инфицированных клетках [25]. Исследования продемонстрировали возможность получения рекомбинантного А29 [48] и специфических МКА к нему [57]. До нашего исследования сохранялся значительный пробел – отсутствие доведенных до уровня серийного производства, прошедших клинические испытания, нормативно оформленных тест-систем ИФА на основе МКА к А29 ВОО, которые адаптированы для рутинной лабораторной практики и готовы к немедленному внедрению в систему диагностики [20].

Несмотря на значительный прогресс в понимании патогенеза оспы обезьян и идентификации перспективных диагностических мишеней (включая белок А29), создание готового к клиническому применению, высокоспецифичного отечественного ИФА-набора для выявления антигена ВОО на основе панели МКА к белку А29 и соответствующей ему НТД представляет собой актуальную исследовательскую задачу [1, 14, 15]. Решение данной задачи направлено на укрепление системы эпидемиологического благополучия не только на территории Российской Федерации, но и на совершенствование экстерриториального мониторинга.

Цель:

Исследование антигенных свойств белка А29 ВОО и видоспецифичных к нему МКА, разработка с их использованием диагностической тест-системы для выявления возбудителя методом ИФА.

Задачи:

1. Изучить особенности антигенных свойств белка А29 ВОО в сравнении с его гомологами у других представителей рода ОПВ.
2. Разработать метод трёхэтапного скрининга гибридом для отбора клонов, продуцирующих моноклональные антитела, видоспецифичные к вирусу оспы обезьян.
3. Получить и охарактеризовать гибридомный клон-продуцент моноклональных антител, специфичных к белку А29 вируса оспы обезьян.
4. Изучить стабильность белка А29 и его взаимодействия с МКА под воздействием различных методов обеззараживания, применяемых для обеспечения биологической безопасности.
5. Оптимизировать протоколы ИФА для детекции белка А29 ВОО в биологических образцах на основе разработанных МКА.

6. Определить диагностическую ценность разработанной тест-системы ИФА путем апробации на выборке клинических образцов от пациентов с подтвержденным лабораторно заболеванием оспой обезьян.
7. Провести независимую апробацию разработанного набора реагентов в регионе, эндемичном по оспе обезьян.
8. Разработать нормативно-техническую документацию (НТД) и подготовить к регистрации медицинское изделие на основе произведенных по НТД серий тест-системы для внедрения в практику здравоохранения.

Научная новизна и практическая ценность работы

Впервые показано, что полученные видоспецифичные МКА А29L-7 сохраняют способность связываться с целевым антигеном А29 ВОО после его термического обеззараживания (кипячение, 98-100°C, 30 мин) и распознаются МКА за счёт устойчивости линейных (первичных по аминокислотной последовательности) антигенных детерминант.

Доказана возможность использования термически обеззараженных клинических образцов для специфичного выявления в них антигена ВОО методом ИФА, без статистически значимого снижения диагностической чувствительности по сравнению с выявлением антигена ВОО в нативных образцах.

Впервые на основе созданной тест-системы разработан и апробирован протокол бесприборной диагностики методом ИФА для выявления антигена ВОО. Он демонстрирует диагностическую эффективность применения набора реагентов, сопоставимую с использованием варианта протокола для обычной лабораторной диагностики.

Практическая значимость работы подтверждена успешным использованием первого отечественного диагностикума «Набор реагентов для иммуноферментной диагностики оспы обезьян по специфическому антигену белка А29 вируса оспы обезьян «Вектор ИФА ВОО-А29L АГ» в условиях диагностической лаборатории

совместного Российско-Гвинейского научно-исследовательского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней, п. Киндия, Республика Гвинея, для подтверждения случаев оспы обезьян при исследовании клинических образцов от пациентов с установленным методом ПЦР диагнозом.

Методология и методы исследования

В работе использованы различные современные научные методы: вирусологические (культивирование, титрование вирусов *in vitro*, инаktivация вирусов, иммунизация лабораторных животных, получение биологических и клинических образцов), молекулярно-биологические (конструирование рекомбинантных белков, аффинная хроматография), физико-химические (термическое и химическое обеззараживание, метод осаждения антител), иммунохимические (получение МКА и поликлональных антител (ПКА)), проведение ИФА различных форматов), молекулярно-генетические (ПЦР-РВ, количественная ПЦР), информационные (статистическая обработка результатов). Также при создании нормативно-технической документации (разработка технических условий, стандартных операционных процедур, инструкции по применению, проведение технических и клинических испытаний) использованы национальные стандарты: ГОСТы, ТУ, МУ, МР и СОПы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Линейные видоспецифичные эпитопы белка А29 могут являться мишенью для средств диагностики оспы обезьян.

2. Моноклональные антитела А29L-7 (продукт клона 3Е12), обладают высокой специфичностью и чувствительностью к эпитопу А29 ВОО. При этом МКА не вступают в перекрестные реакции с нативными и обеззараженными антигенами ВОК и ВОВ.

3. Разработана схема трехэтапного контроля процесса создания гибридом методом ИФА, позволяющая последовательно отбирать МКА, специфичные к уникальным эпитопам А29 ВОО. Схема контроля включает в себя последовательный отбор по чувствительности, специфичности к антигену ВОО и отсутствию перекрестной реактивности с антигенами других исследованных ОПВ.

4. Термическое обеззараживание методом кипячения (30 мин, 98-100 °С) является предпочтительным методом обеззараживания клинических образцов для исследования методом ИФА.

5. Продемонстрирована высокая диагностическая эффективность разработанного «Вектор ИФА ВОО-А29L АГ» набора реагентов в условиях диагностической лаборатории совместного Российско-Гвинейского научно-исследовательского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней, г. Киндия, Республика Гвинея. Его диагностическая ценность определена использованием двух основных компонентов, иммуносорбента с иммобилизованными ПКА к ОПВ и пероксидазного конъюгата МКА А29L-7.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность приведенных научных положений и выводов настоящей диссертационной работы подтверждена полученными в ходе экспериментальных исследований практическими результатами. Достоверность результатов обеспечивается комплексным подходом к их достижению с применением современных вирусологических, молекулярно-биологических, физико-химических, иммунохимических, молекулярно-генетических и статистических методов; многократной воспроизводимостью результатов с использованием репрезентативной выборки исследованных клинических образцов, а также их статистической обработкой.

По результатам диссертации опубликовано 5 печатных работ, в том числе 2 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК

Министерства образования и науки РФ для защиты диссертаций, 2 тезиса докладов на всероссийских и международных конференциях, получен 1 патент на изобретение. Результаты диссертационной работы представлены на следующих научных мероприятиях:

1. X Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов (OpenBio) (Новосибирск, 26-29 сентября 2023 г.) – доклад «Ретроспективное выявление случаев заболевания, вызванного вирусом оспы обезьян, методом иммунодиагностики в Гвинейской Республике».

2. XV Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского (Москва, 27-29 марта 2023 г.) – доклад «Определение иммунной прослойки к ортопоксвирусам у жителей Гвинейской Республики».

Личный вклад автора

Основной объем экспериментальных работ, анализ и обработка результатов, формулирование научных положений и выводов выполнены лично автором.

Также автором лично были разработаны протоколы применения тест-системы для селекции продуцентов МКА, контроля качества серий набора реагентов и проведение испытаний в ходе процедуры регистрации медицинского изделия. Автор самостоятельно проводил подбор образцов на основе биологического материала от пациентов, доноров и добровольцев для создания контрольных препаратов.

В работах, опубликованных в соавторстве, личный вклад автора заключается в непосредственном проведении диагностических исследований, анализе данных и подготовке публикаций. Основная часть работы выполнена в рамках ГЗ-34/21.

Сотрудниками отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор Роспотребнадзора» выполнены работы с нативными образцами биологических проб,

содержащими вирус оспы обезьян, в условиях лаборатории УББ4, также иммунизация кроликов для получения ПКА.

Создание продуцентов рекомбинантных белков AgPOX и Trx-A29 в системах экспрессии *E. coli*, очистка целевых белков методом аффинной хроматографии, иммунизация мышей линии BALB/c, получение гибридом проводились сотрудниками других отделов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация включает введение, шесть глав, посвященных результатам собственных исследований, заключение, выводы, список литературы и приложения. Общий объем работы составляет 162 страницы. Материалы диссертации представлены 15 рисунками и 33 таблицами. Список цитируемой литературы насчитывает 137 источника, из которых 21 – отечественные, 116 – зарубежные.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Таксономия ВОО и эпидемиология оспы обезьян

1.1.1 Таксономическое положение

Семейство *Poxviridae* объединяет крупные вирусы с ДНК-геномом, инфицирующие позвоночных и беспозвоночных. Согласно современной классификации Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV), семейство подразделяется на два подсемейства – *Chordopoxvirinae* и *Entomopoxvirinae* [59]. Представители подсемейства *Chordopoxvirinae* поражают позвоночных животных и включают род *Orthopoxvirus*, к которому относится и вирус оспы обезьян (ВОО). Род *Orthopoxvirus* объединяет не менее 10 видов, включая вирус натуральной оспы (*Variola virus*), вирус осповакцины (*Vaccinia virus*), вирус оспы коров (*Cowpox virus*), вирус оспы обезьян (*Monkeypox virus*), а также вирус оспы верблюдов (*Camelpox virus*), вирус эктромелии мышей (*Ectromelia virus*), вирус оспы енотов (*Raccoonpox virus*), вирус оспы скунсов (*Skunkpox virus*), вирус оспы песчанок (*Taterapox virus*) и вирус оспы полёвок (*Volepox virus*), вирус Ахмета (*Akhmeta virus*) и вирус оспы Аляски (*Alaskapox Virus*) [59].

1.1.2 Геномная организация

Геномная организация представителей рода характеризуется высокой степенью консервативности центральных участков и вариабельностью терминальных областей, что имеет важное значение для их эволюции и адаптации. Как показано на рисунке 1, ВОО содержит линейный двухцепочечный ДНК-геном размером около 197 тыс. пар нуклеотидов (п.н.), кодирующий гены как минимум 47 структурных белков и ферментов нуклеопротеидного кода [74]. Высококонсервативная центральная область генома (более 90% гомологии с другими представителями ОПВ) обеспечивает сохранность жизненно важных функций вируса. Вариабельные терминальные области (ITR, на рисунке 1 обозначены фиолетовым цветом), расположенные по бокам от центрального консервативного участка и

фланкированные ITR, несут гены, определяющие специфичность и вирулентность к хозяину [112, 74]. ITR находятся на самых концах генома; у некоторых ОПВ они не содержат генов, а у других (включая ВОО) содержат небольшое количество генов (например, ANK/PRANC домены). Центральная консервативная область (зелёный цвет на рисунке 1) простирается от позиции 33 225 до 134 701 п.н. и включает гены, общие для всех ОПВ.

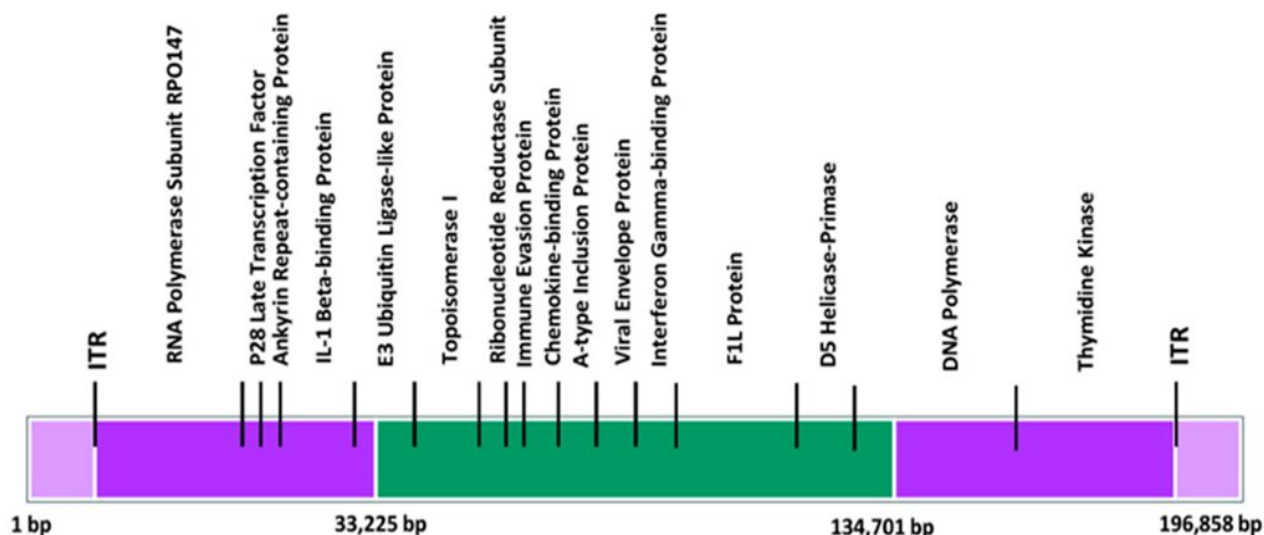


Рисунок 1 – Геномная организация ВОО

Примечание – Адаптировано из [74]

На схеме геном изображён с фиолетовыми областями на обоих концах, представляющими инвертированные концевые повторы (IRT), вариабельные терминальные области, которые фланкированы ITR. Центральная консервативная область, показанная зелёным цветом, простирается от позиции 33 225 до 134 701 п.н. Вдоль генома отмечены различные гены, включая обозначенные буквами А-Р, что указывает на их относительное положение. Данная схема иллюстрирует структурную организацию и разделение на консервативные и вариабельные геномные регионы у ВОО, предоставляя информацию о его генетическом составе и потенциальных функциональных доменах [74].

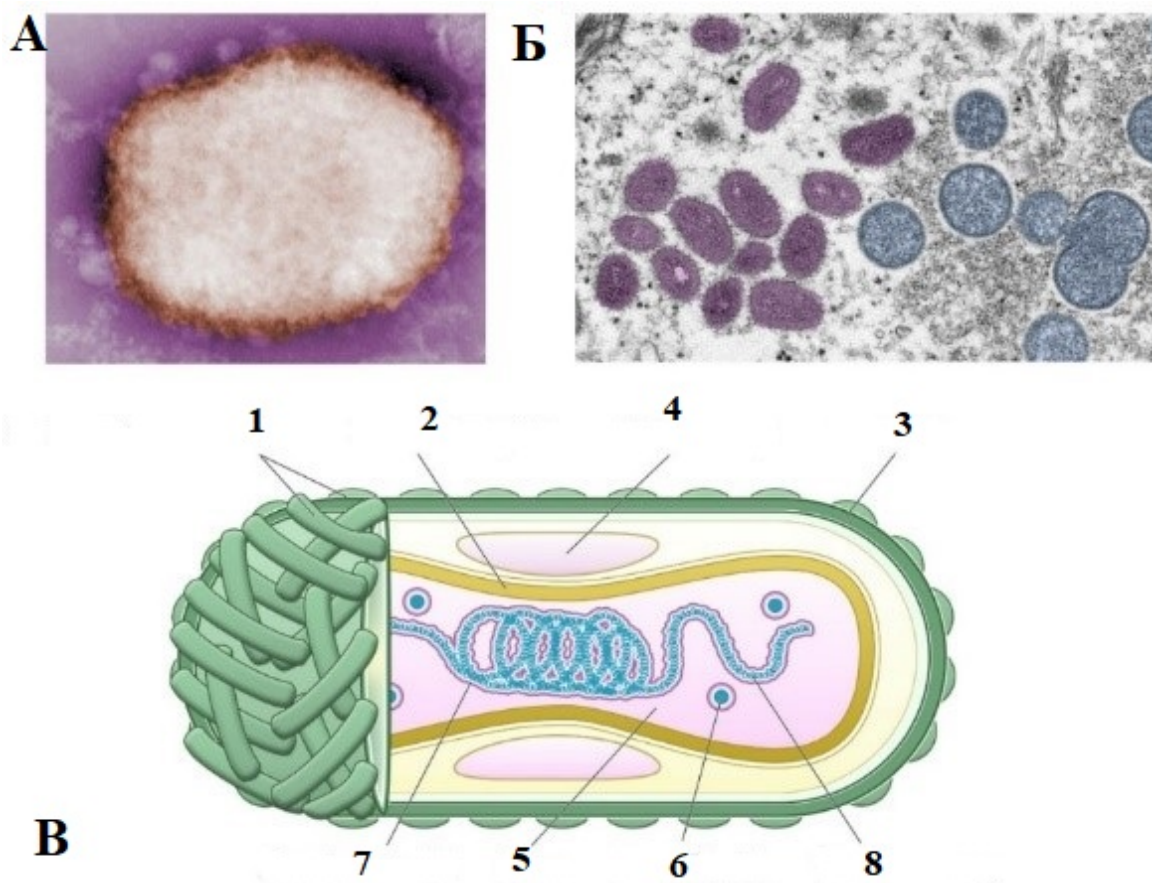


Рисунок 2 – Схема строения вириона ВОО (по данным электронной микроскопии):

А – внешний вид при негативном контрастировании;

Б – ультратонкий срез вириона в цитоплазме клетки-хозяина;

В – схематическое изображение структурной организации:

- 1 – поверхностные тубулярные элементы;
- 2 – палисадный слой;
- 3 – наружная оболочка (липопротеидная мембрана);
- 4 – латеральное тело;
- 5 – наружная мембрана нуклеоида;
- 6 – фибриллярные структуры нуклеоида;
- 7 – нуклеоид (ДНК-содержащая сердцевина);
- 8 – геномная двуспиральная ДНК.

Примечание – Адаптировано из [83]

Сходство геномов ОПВ обуславливает высокую степень гомологии кодируемых ими белков, обеспечивая перекрёстную защиту при иммунизации и существенно затрудняет дифференциальную серодиагностику. Согласно данным сравнительного анализа, уровень гомологии между ВНО и ВОО составляет 96,3% в консервативном ядре, а в масштабе всего генома – 84,5% [112]. Высокая степень идентичности объясняет феномен перекрестной реактивности антител, которые индуцированы антигенами разных видов ОПВ. Выявленное обстоятельство принципиально ограничивает разработку диагностических наборов на основе ПКА [85]. С целью преодоления этого барьера при создании высокочувствительных тест-систем (например, формата твердофазного ИФА) требуется переход к использованию МКА, которые способны дифференцировать уникальные антигенные детерминанты ВОО с учетом общей высокой гомологии рода ОПВ.

Вопреки некоторым упрощённым представлениям, эволюционные связи между разными видами ОПВ не однозначны. Как было показано в фундаментальных работах, реконструируемые филогенетические отношения могут зависеть от выбранных для анализа генов [2]. ВОО не является прямым предком вируса ВНО и занимает в эволюционном древе особое положение, демонстрируя наиболее близкое родство с некоторыми штаммами ВОК, которые по своей генетической структуре близки к ВОВ. В то же время другие штаммы ВОК могут быть значительно отдалёнными от ВОО [111, 28, 49].

Уровень нуклеотидной идентичности между центральными консервативными областями геномов ВОО и ВНО составляет 96,3% [111]. Сравнительный геномный анализ ВОО, ВОК и ВНО в целом показывает высокую консервативность – 97,8% на нуклеотидном уровне и 97,9% на уровне белков [49].

Проведенный молекулярный анализ позволил не только уточнить родственные связи, но и впервые установить временную шкалу эволюции ОПВ. Согласно этим данным, скорость накопления мутаций у данного рода была оценена в диапазоне $(1,7-4,8) \times 10^{-6}$ замен на сайт в год [2]. Предок рода *Orthopoxvirus* возник приблизительно

131 ± 45 тыс. лет назад. Расхождение ОПВ Старого и Нового Света произошло около 40 тыс. лет назад, а независимая эволюция ВНО началась примерно 1 700 лет назад (272 г. н.э.) [28]. Что касается непосредственно ВОО, западноафриканский штамм (клад II), вызвавший глобальную вспышку 2022 года, возник относительно недавно – около 600 лет назад [28].

Формирование современного генетического разнообразия ВОО происходило под действием не синонимичных (аминокислот-заменяющих) мутаций в ключевых генах. Происхождение предшественника ВОО было обусловлено накоплением таких мутаций в генах, связанных с адаптацией к хозяину, - в частности, в генах, ингибирующих синтез белка хозяина (OPG173), и в генах, отвечающих за уклонение от иммунного ответа (OPG027) [29]. Последующее разделение ВОО на клады I и II в значительной степени зависело от мутаций в гене, кодирующем Bcl-2-подобный белок. Разделение клады II на субклады IIa и IIb было обусловлено дальнейшими не-синонимичными заменами в генах растворимого рецептора интерферона альфа/бета и гемагглютинаина [29]. Стоит отметить, что в субкладе IIb после 2018 года наблюдалось ускорение эволюции до $1,8 \times 10^{-5}$ замен/сайт/год, что, вероятно, связано с адаптацией к человеку [28, 29].

Выделяют две основные клады внутри ВОО, расхождение между которыми составляет около 0,5% геномной последовательности. Исторически летальность клады I (центральноафриканской) оценивалась в 4-11%, тогда как для клады II (западноафриканской) этот показатель не превышает 4%, и инфекция характеризуется менее тяжёлым течением [48, 65]. В 2023 году на территории ДРК идентифицирована новая мутантная клада Ib, особенностью которой являются делеционные мутации в генах-мишенях и способность к эффективной передаче половым путём, что в 2023-2024 годах стало характерным для данной клады [24, 124].

При анализе микроэволюционных изменений современных штаммов ВОО, выделенных в период вспышки 2022 года, в геноме зафиксировали преобладание мутаций типа C→T и G→A, рассматриваемые как результат процесса наследуемого

дезаминирования нуклеиновых кислот под воздействием клеточных белков семейства APOBEC3 [46]. Более детальный анализ молекулярной эволюции ВОО описан в работе Forní и соавт. [46]. Обнаружение данных мутаций свидетельствует об адаптивной эволюции вируса под давлением врожденного иммунитета человека. Наличие данных мутаций привело к возникновению генетического разнообразия вируса и формированию новой клады Pb (линия B.1) [43], мутационная нагрузка которой в геноме штаммов значительно превышает таковую у классических штаммов клады I (бассейн Конго) [46]. Указанные мутации локализованы преимущественно в переменных регионах генома, не затрагивая консервативные детерминанты ключевых белков, в том числе белка A29 [43, 57]. На фоне мутационной изменчивости генома вируса высокая консервативность эпитопов A29 делает данный белок мишенью для внутривидовой диагностики, которая способна выявлять актуальные геноварианты ВОО. При этом подавляющее большинство нуклеотидных замен (по разным оценкам, от 84 до 94%) представлено транзициями C→T и G→A, возникающими в результате редактирования генома вируса ферментами семейства APOBEC3, преимущественно в контексте мотива 5'-TC-3' [44, 46]. Этот факт подтверждает активность белков семейства APOBEC3 человека, свидетельствуя об адаптации ВОО к репликации в организме человека и устойчивой передаче [44]. Дополнительные гены, отвечающие за адаптацию вируса к человеку и повышению его трансмиссивности выступают гены OPG027 и OPG015 (в старой номенклатуре – D1L) Мутации, выявленные в этих генах, ассоциированы с процессом ускользания от иммунного ответа и повышением способности к передаче от человека к человеку [33].

1.1.3 Историческая справка и эпидемиология

ВОО был впервые выделен в 1958 г. при вспышке заболевания у лабораторных обезьян. Первый подтвержденный случай заболевания человека зарегистрирован в 1970 г. на территории ДРК [32, 48]. Хронология заболевания оспой обезьян и ключевых событий, связанных с его изучением, систематизирована в таблице National Institutes of Health [89]. В последующие десятилетия ВОО считался инфекционным заболеванием зоонозного характера с ограниченной передачей от человека к человеку

[29]. Однако ситуация изменилась в поствакцинальный период после глобальной ликвидации натуральной оспы в 1980 году. Прекращение массовой вакцинации привело к постепенному снижению коллективного иммунитета населения к ОПВ. Соответственно, это создало благоприятные условия для расширения ареала заболевания [93]. Клинические особенности и ведение больных оспой обезьян в Великобритании в период вспышки 2022 года подробно описаны Adler et al. [23].

Отслеживание заболевания в контексте международного распространения представлено Kraemer et al. [67]. Глобальная вспышка, возникшая в 2022 году, продемонстрировала тенденцию устойчивой передачи оспы обезьян в популяциях вне традиционных эндемичных регионов [122]. Систематический обзор стратегий реагирования на вспышку ВОО, включая анализ эффективности мер общественного здравоохранения, представлен Dai et al. [42]. В 2024-2025 гг. эпидемиологическая ситуация стала сложнее в связи с появлением вирулентного филогенетического кластера Ib в ДРК, а также регистрацией новых случаев в таких регионах как Южная Америка и Юго-Восточная Азия [79, 94]. Эпидемиологической особенностью данной вспышки были показатели заболеваемости среди детского населения. По данным Детского фонда ООН (ЮНИСЕФ) на 31 августа 2024 года в ДРК зарегистрировано более 21 000 подозрительных случаев оспы обезьян, из них свыше 5 000 подтвержденных и 700 летальных случаев [123]. Стоит отметить, что 60% подозрительных случаев и 80% смертей приходится на группу детей младше 15 лет [123], при этом летальность в данной возрастной группе достигает 50%. Такие высокие показатели детской смертности не были отмечены при ранних вспышках ВОО за пределами Африки [48]. По данным систематического обзора Nachega et al. [90], из 12 задокументированных случаев оспы обезьян во время беременности половина закончилась гибелью плода, что подтверждает высокую уязвимость беременных.

Отягощающую роль в течении инфекции играет распространенность коинфекции ВИЧ. Согласно данным международных исследований, около 40%

инфицированных ВОО являются также ВИЧ-позитивными [122]. У лиц с продвинутой стадией ВИЧ ($CD4^{+}$ -лимфоцитов <200 кл/мкл) возрастает риск тяжелого и длительного заболевания оспой обезьян [94]. Серия случаев оспы обезьян у пациентов с продвинутой ВИЧ-инфекцией описана Mitjà et al. [80], где показано, что летальность в этой группе может достигать 27%. Передача вируса оспы обезьян кледы Pb на модели нечеловеческих приматов (НЧП) охарактеризована Hutson et al. [58], что позволило уточнить путь распространения инфекции.

Таким образом, изменения генома с одной стороны повышают адаптацию вируса к человеку и его контагиозность, а с другой – не снижают, а иногда усиливают антигенное родство с другими ОПВ [46]. Работа Di Giulio и Eckburg [41] обобщает ранние данные о возникновении оспы обезьян как зоонозной инфекции. Данный факт создает парадоксальную ситуацию: ВОО становится более опасным для человека, при этом сохраняя высокую степень гомологии с вакцинными штаммами ОПВ, но делая невозможной серологическую дифференциальную диагностику с использованием ПКА или цельновирионных антигенов [66, 85]. Стоит отметить, что высокая патогенность вируса требует строгих соблюдения правил биобезопасности [18], а иммунодиагностика проводится чаще с использованием образцов, подвергнутых инаktivации. Поэтому структурные белки-мишени как в нативных, так и обеззараженных образцах, должны сохранять способность связывать МКА [102].

Структурные белки. Протеом ОПВ включает более 80 белков. В процессе репликации формируются несколько морфологически различных форм вирионов, последовательно сменяющих друг друга: внутриклеточный зрелый вирион (IMV – intracellular mature virion), внутриклеточный оболочечный вирион (IEV – intracellular enveloped virion) и внеклеточный оболочечный вирион (EEV – extracellular enveloped virion) [81]. Около 20 белков локализованы на поверхности IMV. Из них 10–12 (что составляет около 15% от общего протеома) являются иммунодоминантными

антигенами и обеспечивают выраженный гуморальный иммунный ответ при инфицировании [81, 129].

Структурные белки классифицируют по их локализации в вирионе и функциональной роли. Поверхностные белки IMV подразделяются на две группы: адгезивные белки (A26, A27, D8, H3), обеспечивающие первичное связывание вируса с клеточными рецепторами [80, 81, 82] и компоненты фузионного комплекса (A16, A21, A28, F9, G3, G9, H2, J5, L1, L5, O3), обеспечивающие слияние вирусной оболочки с мембраной клетки хозяина [81, 82, 63, 64, 105]. Белки прикрепления обеспечивают первичное взаимодействие вириона ОПВ с поверхностью клетки-мишени. К белкам этой группы относятся: A27, D8, H3 и A26 [38, 56, 130]. Они обладают специфичностью к определенным клеточным рецепторам: A27 (A29 BOO) и H3 связываются с гепарансульфатным протеогликаном [38, 130], D8 – с хондроитинсульфатом, A26 взаимодействует с ламинином [91]. Исследования показывают, что блокада белка A27 (A29) значительно снижает связывание вирионов с клетками *Vero*, в то время как комбинация антител к A27, D8, H3 эффективно ингибирует адгезию [56]. Иммунодоминантность белков A27, D8, H3, L1, A33 и B5 означает, что они являются основными мишенями для гуморального иммунного ответа, что одновременно создаёт непреодолимый барьер для видоспецифичной серодиагностики, однако её разработка всё же возможна при использовании высокоспецифичных МКА [84]. Детальная характеристика белка A27 (гомолог A29 BOO), играющего ключевую роль в адгезии вириона и регуляции слияния мембран, представлена в разделе 1.3.

Множественное рецепторное взаимодействие обеспечивает широкий тропизм ОПВ, позволяя вирусам эффективно прикрепляться к различным типам клеток. После прикрепления вириона фузионный комплекс, состоящий из упомянутых ранее белков, обеспечивает слияние вирусной мембраны с клеточной мембраной хозяина [80]. Такая комбинация обеспечивает слияние вирусной мембраны с клеточной мембраной хозяина после прикрепления вириона. Механизм слияния у семейства

ОПВ уникален и значительно отличается от механизмов, используемых другими оболочечными вирусами [81]. Он реализуется через кооперативное взаимодействие 11 трансмембранных белков EFC [58]. У всех ОПВ их гены консервативны, а гомологи пяти из них (A16, G9, J5, F9 и L1) обнаружены у крупных цитоплазматических ДНК-содержащих вирусов типа *Nucleocytoviricota*, свидетельствуя о древнем происхождении данного механизма слияния [64]. Современные представления о проникновении ОПВ в клетку-хозяина, включая альтернативные пути эндоцитоза и слияния мембран, обобщены в обзоре Schmidt et al. [105].

Основные структурные белки ВОО разделены на две основные группы в зависимости от типа вириона: внутриклеточные зрелые вирионы (IMV) и внеклеточные оболочечные вирионы (EEV). Основные белки, часто используемые в диагностических и иммунологических исследованиях, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Основные иммунодоминантные белки

Белок	Ген	Тип вириона	Диагностическое значение
A29	<i>A29L</i>	MV	Высокая иммуногенность; основной антиген для ИФА; мишень для видоспецифичных МКА
B5	<i>B5R</i>	EEV	Индикатор гуморального иммунитета при EEV-опосредованной инфекции; компонент мультиплексных анализов
A33	<i>A33R</i>	EEV	Используется в системах дифференциальной диагностики.
A27	<i>A27L</i>	MV	Гомолог A29 ВОО; IgG к ВООA27 различает постинфекционный и поствакцинальный иммунитет (чувствительность 88%, специфичность 97%)
L1	<i>L1R</i>	MV	Мишень для нейтрализующих антител; коррелирует с защитным иммунитетом
H3	<i>H3L</i>	MV	Иммунодоминантный антиген; уровень антител коррелирует с вируснейтрализующей активностью

Примечание – Составлено по источникам: [25, 57, 40, 78]

Среди иммунодоминантных антигенов ВОО, белок A29 обладает рядом преимуществ, определяющих его выбор в качестве мишени для детекции [25, 72]. В отличие от B5 и A33, локализованных на EEV и присутствующих в меньшем количестве в клинических образцах, A29 является компонентом MV, составляя

основную массу вирусных частиц в инфицированном материале [75, 83]. По сравнению с L1 и H3, которые характеризуются более высокой степенью консервативности среди ОПВ, А29 содержит видоспецифические антигенные детерминанты, что важно для дифференциальной диагностики [57]. В отличие от А27, требующего применения пар антител к различным эпитопам для достижения специфичности, А29 демонстрирует выраженную иммуногенность при естественной инфекции, что подтвердило иммунопротективное профилирование серологического ответа реконвалесцентов [72]. Перечисленные свойства делают А29 наиболее перспективной мишенью для создания видоспецифичных МКА и последующей разработки на их основе диагностических наборов реагентов [14, 72]. Именно структурно-антигенные характеристики данного белка формируют вирусологическую базу для разработки иммуноферментных тест-систем нового поколения, которые способны обеспечить выявление ВОО в различном клиническом материале [25, 57].

1.2 БЕЛОК А29 КАК МИШЕНЬ ИММУНОХИМИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

1.2.1. Молекулярная характеристика белка А29

Белок А29 ВОО (согласно референсному штамму Zaire-96-I-16) представляет собой один из поверхностных белков внутриклеточного зрелого вириона (IMV), являясь структурным и функциональным гомологом белка А27 вируса осповакцины (ВОВ, штамм *Copenhagen*) и белка А30 вируса натуральной оспы (ВНО, штамм *Bangladesh-1975*) [75, 78]. Использование рекомбинантного белка А29L ВОО в качестве мишени для специфической серологической диагностики детально рассмотрено Liang и соавт. [75]. Молекулярная масса белка составляет 14-15 кДа. Белок содержит 110 аминокислотных остатков, формируя гомотримерную структуру на поверхности вириона [25, 36]. Анализ аминокислотных последовательностей демонстрирует высокую степень гомологии А29 с соответствующими белками других ОПВ: с А27 ВОВ – более 95%, с А30 ВНО – 97,8% [49]. Детальный анализ генов и мутаций новых штаммов ВОО вспышки 2022 года представлен в работе Wang

et al. [129]. Однако, несмотря на высокую гомологию, существуют видоспецифические антигенные детерминанты, позволяющие получать МКА, с помощью которых можно дифференцировать ВОО от ВОВ [57]. Выявление уникальных детерминант позволяет преодолеть проблему перекрестной реактивности и разработать высокоспецифичные тесты, исключающие ложноположительные реакции при исследовании образцов от иммунизированных пациентов [25, 57].

1.2.2. Структурно-функциональная организация

Белки семейства А27/А29/А30 (ОРG154) относятся к наиболее консервативным структурным белкам ОПВ. Сопоставление с кодирующей ДНК их аминокислотных последовательностей демонстрирует, что ген А29L (у ВОО), кодирующий белок А29, локализован в центральной консервативной части генома, где сосредоточены гены, которые кодируют структурные белки вирусной частицы и ферменты репликации [81]. Эта локализация подтверждает фундаментальное значение А29 для морфогенеза и репродукции вируса [100].

Белки прикрепления обеспечивают первичное взаимодействие вириона ОПВ с поверхностью клетки-мишени. [81]. Они обладают специфичностью к определенным клеточным рецепторам: А27 (А29 ВОО) и НЗ связываются с гепарансульфатным протеогликаном, D8 – с хондроитинсульфатом, А26 взаимодействует с ламинином [128]. Исследования показывают, что блокада белка А27 (А29) снижает связывание вирионов с клетками *Vero* на 85-90%, в то время как комбинация антител к А27, D8, НЗ ингибирует адгезию на 95-98% [80, 128].

Характеристика доменной организации белков ОПВ получена на основе структурно-функционального анализа гомологичного белка А27 ВОВ, в состав которого входят 110 аминокислотных остатков [36]. Механизм якорения белка А27 ВОО в вирусной мембране посредством кооперативного взаимодействия с белком А17 описан Wang et al. [128]. Белок А29 ВОО является ортологом белка А27 ВОВ, что позволяет рассматривать данный механизм как предполагаемую модель

мембранной ассоциации A29. Данный белок включает в себя N-концевой сигнальный участок, центральный домен связывания гепарина и гепарансульфата, суперспиральный домен и С-концевой участок, участвующий в олигомеризации белка [36, 38]. Анализ аминокислотной последовательности выявил кластер положительно заряженных остатков в составе гепарин-связывающего домена, обеспечивающего электростатическое взаимодействие с сульфатированными полисахаридами клеточной мембраны [38]. Важно, чтобы конформационная целостность данных доменов, а в первую очередь целевых диагностических эпитопов, сохранялась в нативном состоянии и после применения протоколов обеззараживания клинического материала для безопасной лабораторной диагностики [18, 102].

1.2.3 Функциональная активность

Результаты экспериментов с использованием белка A29 ВОО доказали функциональную активность данного домена, которая была подтверждена методом спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) [110]. Продemonстрировано, что рекомбинантный белок A29 избирательно связывается с сульфатированными гликозаминогликанами (ГАГ), включая гепарансульфат, гепарин, хондроитинсульфат и дерматансульфат [110]. Сульфатные группы указанных молекул (их синтетические аналоги) конкурентно ингибируют связывание A29 с клеточными рецепторами, подтверждая специфичность механизма адгезии [53].

На рисунке 3 представлены результаты исследования связывающей и функциональной активности моноклональных антител к белку A29 ВОО. На рисунке 3А показана зависимость связывания антител 2-9В, 3-8G и 2-5Н с вирусными антигенами от их концентрации, установленная методом ИФА. Для клона 3-8G значение IC₅₀ не превышало 0,1 мкг/мл.

На рисунке 3Б представлены результаты оценки комплемент-зависимой цитотоксичности: при концентрации антител 10 мкг/мл в присутствии комплемента наблюдался лизис более 80 % инфицированных клеток [71].

Полученные данные свидетельствуют о способности белка A29 выступать мишенью для антител, обладающих связывающей и функциональной активностью, что дополнительно обосновывает интерес к данному белку как потенциальному диагностическому антигену.

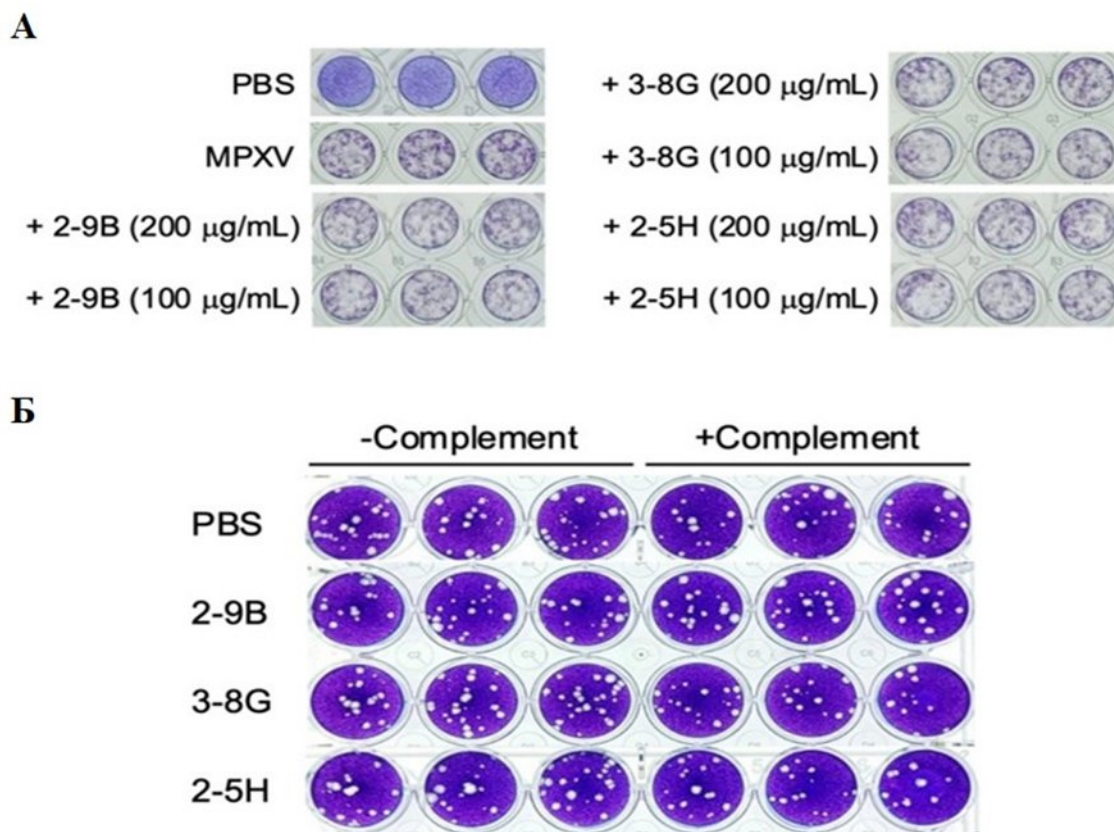


Рисунок 3 – Характеристика МКА к белку A29 BOO:

А – дозозависимое связывание антител (2-9В, 3-8G, 2-5Н) с антигенами BOO (ИФА);

Б – Комплемент-зависимая цитотоксичность

Примечание – Адаптировано из [71]

Ещё одной функциональной характеристикой A29 BOO является его способность к олигомеризации (тримеризации). В составе зрелого вириона белок формирует гомотримеры, которые стабилизированы межмолекулярными дисульфидными связями. Гомотримерная организация необходима для обеспечения

слияния вирусной и клеточной мембран. Согласно современной гипотезе, А29 взаимодействует с мембранным белком А17 и образует регуляторный комплекс, тем самым предотвращая преждевременную активацию слияния внутри инфицированной клетки [36].

Высокая иммуногенность, консервативность и наличие уникальных эпитопов А29 определяют его перспективность для дифференциальной диагностики оспы обезьян [25, 57]. Штаммы ВОО, выделенные в РФ (*hMpxV/Russia/St.Petersburg-01/2022* и *hMpxV/Russia/St.Petersburg-02/2022*), относятся к филогенетической группе IIb [11, 43].

1.3 АНТИГЕННАЯ СТРУКТУРА, ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ И ИММУННЫЙ ОТВЕТ

1.3.1 Антигенный состав вириона

Антигенная структура ВОО представляет собой сложную мозаику эпитопов, расположенных на поверхности внутриклеточных зрелых вирионов и внеклеточных оболочечных вирионов [127]. Ранние работы Vázquez и Esteban [126] идентифицировали белок А27L ВОВ как ключевой фактор проникновения вируса в клетку-хозяина. При скрининге панели из 99 МКА против различных представителей рода *Orthopoxvirus*, проведённом Mucker et al., было показано, что 32 из них (32,3%) обладают перекрёстной реактивностью в отношении исследованных вирусов [85]. Данные перекрёстно-реагирующие антитела были направлены преимущественно против консервативных структурных белков, общих для всех представителей ОПВ. По характеру реактивности выделены три группы МКА: 54 антитела (54,5%) реагировали с ограниченным набором ОПВ (два и более вида); 13 антител (13,1%) представляют собой видоспецифичные; 8 антител (8,1%) направлены исключительно против эпитопов ВОО, а 5 антител – против *Taterapox virus* и ВОО [85]. Структурные исследования Resch et al. [95] показали, что белок А27 формирует тримерный комплекс с белком А17, необходимый для правильного морфогенеза вириона.

1.3.2 Перекрестная реактивность

Ранее в работах Hughes et al. [57] и Arndt et al. [27] на основе анализа конкурентного связывания с использованием сывороток крови реконвалесцентов оспы обезьян было показано, что МКА Н12С1, распознающее видоспецифичный эпитоп белка А29 ВОО, эффективно ингибировалось образцами сывороток (уровень ингибирования достигал 76-89%) [57]. В то же время антитело G6C6, специфичное к ВОВ, практически не ингибировалось (менее 5%) [27]. Эти данные, независимо подтверждённые Mucker et al. [85], свидетельствуют о том, что при естественной инфекции иммунный ответ направлен преимущественно на видоспецифичные, а не на консервативные эпитопы ВОО [27, 57]. Это означает, что отбор пула МКА, нацеленных на уникальные участки А29, принципиально возможен и обоснован [27]. Именно такой подход позволяет создать ИФА в формате «сэндвич», способный дифференцировать пациентов, инфицированных ВОО, от лиц, ранее вакцинированных против натуральной оспы, избегая тем самым перекрёстного реагирования с другими ОПВ [27, 57].

1.3.4 Эпитопный анализ

Видоспецифичные эпитопы А29 локализованы преимущественно в N-концевой области, которая включает гепарин-связывающий домен [38, 57], что позволяет использовать этот белок для дифференциальной диагностики [27]. На поверхности внутриклеточных зрелых вирионов ВОО идентифицировано не менее восьми таких уникальных участков [25]. При этом иммунодоминантность зависит от способа презентации антигена: естественная инфекция запускает ответ преимущественно на видоспецифичные детерминанты, тогда как вакцинация индуцирует более разнообразный гуморальный ответ, который направлен в том числе и на консервативные эпитопы [27]. Данное различие дополнительно обосновывает выбор видоспецифичных эпитопов А29 в качестве мишеней для диагностики, позволяющей отличить инфицированных оспой обезьян пациентов от вакцинированных [27, 57].

1.3.5 Долговременная динамика

При исследовании иммунного ответа при ОПВ-инфекциях было показано, что титры нейтрализующих антител у реконвалесцентов закономерно снижаются с течением времени: с 1:328 (среднее значение) через 12 месяцев до 1:180 через 18 месяцев после инфицирования [51]. В той же работе выявлены клада-специфические различия нейтрализации: титры сывороток реконвалесцентов, инфицированных ВОО клады IIb, были в 2,5-3 раза ниже в отношении вирусов клады Ib [43]. В недавнем исследовании Yang et al. охарактеризовано длительное вирусное выделение, сопровождающее антительный ответ у мужчин с острой инфекцией оспы обезьян [135]. Эти данные свидетельствуют об антигенном дрейфе и ограниченной перекрёстной защите между филогенетическими клдами ВОО [43, 135].

Для *in vitro* диагностики это означает, что МКА, подобранные к белку А29, должны обладать универсальной чувствительностью, обеспечивая выявление циркулирующей актуальной клады IIb. Данное требование подтверждено в ходе настоящей работы на штаммах, выделенных в Российской Федерации [6], и на образцах из эндемичного региона (главы 4, 5) [14, 15]. Выявление антигенов новой высокопатогенной группы Ib потребует дополнительной валидации при появлении соответствующих образцов [43, 79]. Практическое внедрение подобного скрининга является надежным путем к созданию высокоспецифичного ИФА, аттестованного для детекции генетических линий ВОО [15, 135].

1.4 МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА И ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ В ДИАГНОСТИКЕ ОРТОПОКСВИРУСОВ

1.4.1 Способы получения моноклональных антител

Создание гибридом, которые продуцируют МКА заданной специфичности, описано Köhler G. and Milstein C. в 1975 году и заложило основополагающий фундамент для современной биотехнологии [66]. Современные аспекты гибридомной технологии как универсальной платформы для получения МКА, включая методы селекции и криоконсервации гибридом, представлены в обзоре Pande et al. [97]. Суть

классической гибридной технологии – осуществление слияния короткоживущих В-лимфоцитов селезенки предварительно иммунизированного животного (чаще мышей линии *BALB/c*) с миеломными клетками [97]. Это приводит к образованию гибридных клеток, способных к неограниченной стабильной пролиферации и синтезу антител нужной специфичности [66, 97].

1.4.2. Современные модификации

Классическая гибридная технология основана на слиянии В-лимфоцитов селезенки иммунизированных животных с клетками миеломы, в результате которого образуются гибридные клетки, способные к длительной пролиферации и продукции моноклональных антител заданной специфичности [66]. Для выделения целевых гибридом необходимы последующие этапы селекции и скрининга [97]. В исследованиях на мышинной модели иммунизации рекомбинантным белком A29 предварительное обогащение антитело-секретирующих клеток (АСК) методом проточной цитометрии (FACS) позволяет повысить эффективность гибридной технологии, повышая выход жизнеспособных гибридом до 100 % в посевных лунках, при этом доля антиген-специфических клонов достигает 60% [120]. Указанные протоколы обогащения антитело-секретирующих клеток и гибридизации [120] будут использованы при разработке методики постадийного отбора для получения гибридом-продуцентов МКА к A29 ВОО. Полученные гибридомные клоны а-A29L_МРохV были использованы для дальнейшей разработки диагностических тест-систем [14, 15].

1.4.3 Трансгенные мыши и фаговый дисплей

Эффективным технологическим подходом, объединяющим в себе преимущества классической гибридной технологии с последующим получением полностью человеческих антител, является использование трансгенных мышей, которые несут гены иммуноглобулинов человека [45]. Описанная технология «XenoMouse» основана на введении в зародышевую линию мышей с собственным обеззараженным иммуноглобулиновым локусом почти полных человеческих локусов

иммуноглобулинов на дрожжевых искусственных хромосомах (YAC) [45]. Авторы работы показали, что данные трансгенные конструкции включают в себя большинство вариабельных генов, цис-регуляторные элементы и гены константных областей. Данные гены необходимы для функционирования Ig-локусов в организме мыши, после иммунизации которых вирусными антигенами происходит повышение аффинности и переключение классов антител при участии человеческих последовательностей. Это позволяет получать высокоаффинные человеческие антитела с помощью стандартной гибридомной технологии [45]. Технология фагового дисплея, напротив, позволяет получать антитела *in vitro*, обходя механизмы иммунологической толерантности [116], и активно применялась для скрининга нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 [99].

Описанные подходы «XenoMouse» [45] и фаговый дисплей [116] в настоящей работе не применялись. Первый требует значительных затрат и требует барьерных условий содержания (SPF-виварии), второй уступает классической гибридомной технологии по предсказуемости специфичности антител. Для решения поставленной задачи – получения МКА с высокой специфичностью к видоспецифичным эпитопам A29, требовался метод, который позволяет на ранних этапах отбраковывать клоны с перекрёстной реактивностью [120]. Именно таким методом стала классическая гибридомная технология в сочетании с используемым нами трёхэтапным скринингом (раздел 3.2), позволившим отобрать клон-продуцент МКА A29L-7 [14].

1.4.4 Метод ИФА для диагностики ортопоксвирусных инфекций

Лабораторная диагностика ОПВ-инфекций включает в себя молекулярно-генетические (ПЦР), вирусологические, серологические и иммунохимические подходы [98, 131]. Серологические методы, например иммуноферментный анализ (ИФА) и реакция торможения гемагглютинации (РТГА), могут быть использованы для подтверждения диагноза на основе результатов ПЦР [112]. ИФА, как один из наиболее широко применяемых методов лабораторной диагностики, позволяет выявлять как вирусные антигены, так и специфические антитела в клинических

образцах [98, 119]. Сравнительная оценка различных форматов иммуноферментного анализа (прямого, непрямого, сэндвич) для детекции антигенов представлена в работе Van Blerk and De Baetselier [125].

При проведении ранней диагностики ОПВ преимущественно применяют антиген-детектирующий вариант ИФА или выявление IgM-антител в непрямом формате [119]. Для ретроспективной диагностики и оценки поствакцинального иммунитета используется непрямой метод ИФА для определения IgG-антител [27]. Прямое выявление вирусных антигенов в клинических образцах методом ИФА является важным инструментом ранней диагностики ОПВ, особенно в условиях ограниченного ресурса без доступа к молекулярно-генетическим методам, а также в полевых лабораториях [98, 131].

1.4.5 Выявление антигена

В исследовании 1989 года проведена оценка различных вариаций ПКА и нейтрализующих МКА в качестве компонентов детекции и сорбции при выявлении антигена методом ИФА [39]. Валидные результаты были достигнуты при анализе на основе ПКА, но десятикратное увеличение чувствительности получено при использовании одного МКА в качестве захватывающего антитела, которое реагирует с эпитопами вирусной оболочки, и ПКА-детектирующих антител [39]. Предел обнаружения такой комбинации составил 10^3 - 10^4 ТЦД₅₀/0,1 мл в сравнении с комбинацией ПКА 10^4 - 10^5 ТЦД₅₀/0,1 мл, то есть использование МКА позволило повысить чувствительность в 10 раз в экспериментах на модельных системах с использованием очищенных вирусных препаратов. Чувствительность метода, оцененная с использованием препаратов ВОО, позволила детектировать вирус в концентрации от 10^3 до 10^4 ТЦД₅₀ в 0,1 мл образца [39].

С помощью метода количественной электронной микроскопии и инфекционности (ТЦД₅₀/мл) при параллельном анализе шестнадцати штаммов ОПВ выяснили, что пределы обнаружения в ИФА варьировали в диапазоне 10^2 - 10^4

ТЦД₅₀/мл и зависели от репликации отдельных вирусных штаммов. При расчете, проведенном на основе полученного количества физических частиц, минимальный обнаруживаемый уровень составил 10⁵ вирусных частиц/мл, а градиентно-очищенный вирус детектировался при содержании белка 15 нг/мл [39].

1.4.6 Выбор мишени для выявления антигена методом «сэндвич» ИФА

Основополагающий фундамент для понимания антигенной структуры ОПВ был заложен в исследованиях Osborn and Moss [100], где авторы впервые провели системную характеристику структурных и антигенных взаимосвязей между представителями рода ОПВ. Им удалось идентифицировать некоторые иммунодоминантные антигены, которые локализованы в оболочке вириона и теле кора. Основным результатом работы стало доказательство родоспецифичных эпитопов (общих для всех ОПВ) и видоспецифичных детерминант [100]. Взаимодействие белка A27 BOO с белком A17 в процессе сборки вириона изучено Howard et al. [55]. Протеомный анализ антительного ответа при инфекции, вызванной данным вирусом, выполнен Johnston et al. [62].

В исследованиях последних лет была продемонстрирована способность белка A29L детектировать широкий спектр ОПВ (BOB, BOK, BOO) при концентрации антигена не менее 10³-10⁴ ТЦД₅₀/мл, что соответствует ранней стадии инфекционного процесса [25, 72]. При этом отсутствовало перекрестное реагирование с герпесвирусами и поксвирусами иных родов [25].

Основы изучения белка A27 заложены в работах, идентифицировавших его ген у BOB. Как подробно описано выше, A27 (гомолог A29 BOO) является ключевым компонентом оболочки вириона, обеспечивает прикрепление к клетке через N-концевой домен (а.о. 1–85), связывающий гепарансульфат [42, 128], существует в форме гомотримера [97], взаимодействует с белком A17 для правильного морфогенеза [41, 82], а его пространственная структура определена кристаллографически [26, 101, 125]. Несмотря на глубокое понимание структуры консервативных белков, задача дифференциации BOO от поствакцинального

иммунного ответа требует смещения внимания с родоспецифичных на строго видоспецифичные эпитопы A29.

Несмотря на наличие исследований, посвящённых изучению белка A29 и получению МКА к нему, вопросы разработки тест-системы для ИФА на их основе недостаточно изучены. В частности, отсутствуют систематизированные данные о применении видоспецифичных МКА к A29 для создания диагностических ИФА, что определяет актуальность настоящего исследования.

1.4.7 Диагностическая ценность тестов на разных платформах

Выбор метода детекции ОПВ базируется на сопоставлении эффективности диагностического подхода в зависимости от поставленных исследователем задач и возможных условий применения. В таблице 1 отображены систематизированные данные о основных методах выявления ВОО и других ОПВ, включая имеющиеся коммерческие наборы и их недостатки. Современный обзор методов диагностики оспы обезьян, включая молекулярные (ПЦР, изотермическая амплификация) и иммунохимические (ИФА, ИХА) подходы, представлен Lim et al. [76].

Таблица 2 – Сравнительная характеристика методов выявления антигенов ОПВ

Характеристика	ИФА	ИХА	ПЦР
Объект обнаружения	Вирусные антигены	Вирусные антигены	ДНК вируса
Основные мишени	Белки ортопоксвирусов, распознаваемые используемыми антителами	Вирусные белки, распознаваемые используемыми антителами	Видо- и кладоспецифичные участки вирусного генома
Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)	10^3 - 10^4 ТЦД ₅₀ /0,1 мл для одной из исследованных тест-систем [39]	Не установлена по проверенным источникам	Зависит от конкретной тест-системы
Диагностическая чувствительность, %	Не установлена по проверенным источникам	Зависит от тест-системы и типа клинического материала [60]	Зависит от тест-системы и типа клинического материала
Диагностическая специфичность, %	Не установлена по проверенным источникам	Зависит от тест-системы [60]	Зависит от тест-системы
Возможность дифференциации видов	Определяется специфичностью	Определяется специфичностью	Определяется выбранными

ортопоксвирусов	антител	антител	генетическими мишенями
Возможность применения в полевых условиях	Ограничена необходимостью лабораторного оборудования	Возможна	Возможна при использовании соответствующего оборудования

Примечание – Представленные характеристики зависят от конструкции тест-системы, исследуемого материала и условий проведения анализа. Значения аналитической чувствительности относятся к конкретным разработкам и не характеризуют метод в целом. Составлено по источникам [39, 60, 131].

Оценка метода иммунохроматографии (ИХА) для детекции ОПВ в точке оказания медицинской помощи представлена Laidlaw et al. [69]. ИХА-тесты для выявления антигена ВОО, представленные на международном рынке, включает наборы «FlowFlex Monkeypox Virus Antigen Rapid Test» (ACON Biotech (Hangzhou) Co., Ltd., Китай), «Ecotest Monkeypox Antigen Rapid Test» (ACON Biotech (Hangzhou) Co., Ltd., Китай) и «Standard Q Monkeypox Ag Test» (SD Biosensor, Inc., Южная Корея) [22, 106]. По результатам исследований с применением КВЖ ВОО, проведенных в ДРК и Великобритании, аналитическая чувствительность составляет $1,0 \times 10^4$ БОЕ/мл, что удовлетворяет требованиям ВОЗ к экспресс-методам для полевых условий [60]. Полевая оценка экспресс-теста для диагностики оспы обезьян в Уганде и ДРК Конго, выполненная Bakamutumaho et al. [30], показала вариабельность чувствительности в зависимости от региона. Однако в клинических образцах (соскобы с кожных поражений, мазки из носоглотки) их чувствительность составила от 0,00% до 15,79% при исследовании образцов кожных поражений 0,00% для респираторных образцов [60], специфичность 100% [60]. Аналогичное исследование, проведенное в Уганде и ДРК с тестом «NG-Test Monkeypox antigen RDT» («NG Biotech», Франция), показало чувствительность и специфичность 70,4% (95% ДИ 65,9-74,6%) и 89,3% (95% ДИ 84,6-92,7%) соответственно [86]. При этом чувствительность варьировала между странами и составила 81,9% (95% ДИ 76,6-86,3%) в Уганде и 55,1% (95% ДИ 47,7-62,2%) в ДРК, не достигая целевых показателей ВОЗ (рекомендуемая чувствительность >90%) [86]. Следовательно, ни одна из протестированных тест-систем не может быть рекомендована для

диагностики предполагаемых случаев оспы обезьян [60, 86]. В Российской Федерации в настоящее время нет ИХА для выявления ВОО [20], подтверждая необходимость создания отечественного ИФА-набора на основе видоспецифичных МКА к белку А29 [14, 15].

ИФА метод характеризуется высокой специфичностью и возможностью детекции антигенов в широком спектре клинических образцов. К основным преимуществам ИФА относятся возможность количественной оценки антигена и высокая производительность анализа. Недостатки метода ИФА – необходимость лабораторного оснащения и относительно продолжительное время анализа по сравнению с ИХА. Однако время анализа можно сократить за счёт увеличения концентрации конъюгата, совместив несколько этапов в одну стадию, делая ИФА сопоставимым с ИХА по времени при сохранении более высокой чувствительности и возможности количественной оценки.

Помимо наборов для детекции антигена, на рынке также представлены тест-системы для выявления антител к А29 ВОО. В частности, коммерческий набор «Anti-MPXV A29L Human IgG ELISA Kit» («AntibodySystem»; Франция, Китай) предназначен исключительно для исследовательских целей [26]. Чувствительность наборов «AntibodySystem» к А29L составляет 0,36-0,42 нг/мл [25]. Наибольшая чувствительность среди анализируемых продуктов зафиксирована для набора парных антител «Sino Biological» – 1,09 пг/мл [114].

По состоянию на 2026 года на международном рынке представлены коммерческие наборы формата «сэндвич» ИФА на основе детекции белка А29 ВОО: продукты «Monkeypox Virus A29L Antigen ELISA Kit-HS» («ProteoGenix»; Франция, США), «Monkeypox Virus A29L Protein ELISA Kit» («Frdbio», Китай), «Monkeypox Virus A29L ELISA Kit» («RayBiotech», США), а также наборы парных антител для создания диагностических тест-систем «ELISA Antibody Pairs» («Sino Biological» (Китай) [47, 114]. Все они используются исключительно для исследовательской цели, ограничивая тем самым применение в клинической практике [20]. Рабочий диапазон

детекции антигена в наборе «Frdbio» заявлен как 0-4 нг/мл [47]. Сравнительная оценка коммерческих наборов для выявления антигена оспы обезьян, включая анализ их чувствительности и специфичности, проведена Chen et al. [37].

Применение молекулярных методов диагностики ОПВ требует соблюдения жестких требований биологической безопасности. Влияние химических и физических методов инактивации на инфекционность вируса оспы обезьян и пригодность образцов для последующих молекулярно-генетических и иммунохимических исследований изучено Mariotti et al. [77]. В соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами СП 3.3686-21, работа с подозрительным материалом на содержание патогенных биологических агентов I группы (к которым относится ВОО) требует соблюдения режима биологической безопасности УББ3/УББ4 [18]. Актуальные рекомендации ВОЗ по диагностике ВОО, включая оценку эффективности различных методов (ПЦР, ИФА, экспресс-тесты) и стратегии тестирования в зависимости от эпидемиологической ситуации, обобщены во временном руководстве ВОЗ [131]. Это накладывает ограничения на проведение ПЦР-диагностики в лабораториях, не имеющих соответствующего оснащения и разрешения. Анализ ограничений существующих экспресс-тестов (ИХА-тесты) показывает их недостаточную клиническую чувствительность, что делает их непригодными для надёжной диагностики [60].

Разработка методов на основе МКА для детекции ВОО описана в работе Национального института патогенной биологии Китайской академии медицинских наук [87]. Дизайн и оптимизация специфического серологического анализа для выявления антител к вирусу оспы обезьян представлены Taha et al. [119]. Разработка и валидация высокоспецифичного хемилюминесцентного серологического анализа для выявления антител к вирусу оспы обезьян описана Therrien et al. [121]. В то время как Zhao et al. [136] предложили диагностический подход на основе рекомбинантой амплификации (RAA) и ИХА, пригодный для экспресс-выявления ВОО в полевых условиях с порогом детекции 10 копий на реакцию. Сравнительная оценка

диагностической точности коммерческих ПЦР-тест-систем Xpert® Мрх и STANDARD™ M10 MPX/OPX, проведённая Nic Fhogartaigh et al. [91], подтвердила высокую аналитическую чувствительность методов молекулярной диагностики, однако их применение ограничено необходимостью специализированного оборудования и обученного персонала. Отсутствие в Российской Федерации зарегистрированных отечественных ИФА-тест-систем для выявления антигена ВОО [20] обосновывает необходимость разработки диагностического набора на основе видоспецифичных МКА к белку А29 [14, 15]. В свою очередь, потребность в проведении диагностики в эндемичных регионах с ограниченными лабораторными ресурсами, а также в условиях мобильных лабораторий и пунктов пропуска, определяет необходимость разработки бесприборного протокола, не требующего использования планшетного спектрофотометра.

1.4.6 Влияние термического обеззараживания образцов на чувствительность диагностики ВОО

Обеззараживание вирусосодержащего материала является обязательным этапом при работе с ВОО, поскольку обеспечивает биологическую безопасность персонала [17]. Однако любой метод обеззараживания влияет на структуру вируса, отражаясь на результатах последующей лабораторной диагностики, включая ПЦР и ИФА [102]. Поэтому выбор метода для обработки биологических образцов представляет собой компромисс между полной потерей инфекционности и сохранением диагностически значимых молекулярных и антигенных структур. Согласно действующим требованиям, СП 3.3686-21, в условиях отсутствия лабораторий уровня УББЗ термическое обеззараживание, в частности кипячение при 98-100 °С в течение 30 мин, рассматривается как допустимый и зачастую единственный доступный метод обеззараживания материала, подозрительного на содержание ОПВ [18]. Данный подход широко применяется в полевых условиях и лабораториях с ограниченными возможностями, что особенно актуально для эндемичных регионов [31].

Термическое обеззараживание при температуре 98-100 °С в течение 30 минут приводит к полной утрате инфекционности ОПВ за счет денатурации белков вирусной оболочки и разрушения структур вириона [31]. Белковые антигены более чувствительны к термической денатурации, что приводит к нарушению третичной и четвертичной структур белков, необходимых для распознавания МКА [102]. Однако для ряда иммунодоминантных белков ОПВ (А27/А29, D8, Н3) доказано сохранение линейных эпитопов, что позволяет проводить ИФА после термического обеззараживания образцов [25]. Экспериментальные данные свидетельствуют, что после кипячения (100 °С, 5-10 мин) рекомбинантный белок А29 сохраняет способность к связыванию с антителами в ИФА в формате сэндвич, хотя сигнал снижается по сравнению с нативным антигеном [14]. Использование пар антител, распознающих различные линейные (последовательнозависимые) эпитопы, частично компенсирует потерю конформационных детерминант [14, 25].

В настоящее время метод термического обеззараживания, несмотря на денатурирующее действие, остается практически единственным универсальным методом инактивации, применимым в условиях ограниченных ресурсов и регламентированным санитарными нормами [18]. Преимуществом является сочетание простоты, доступности и гарантированной биологической безопасности для сотрудников [31]. Последующая возможность детекции ВОО как методом ПЦР, так и ИФА делает данный подход приемлемым для первичного лабораторного скрининга [14, 102]. Стоит отметить, что при разработке протоколов применения конъюгата и определении диагностических характеристик набора на обеззараженных образцах необходимо учитывать влияние кипячения на сохранность эпитопов А29 [14]. Данный метод был выбран для обеззараживания клинических и вирусных образцов в настоящей работе.

1.5 ТЕРАПИЯ, ПРОФИЛАКТИКА И НЕРЕШЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ

Глобальная ликвидация натуральной оспы, являясь достижением в области общественного здравоохранения, не привела к полному исчезновению угрозы.

Актуальность поиска эффективной терапии обусловлена возобновлением циркуляции ВОО и его адаптацией к человеческому организму [68]. В настоящее время арсенал противовирусных препаратов, разработанных в рамках программ биозащиты, крайне ограничен [107]. В современных обзорах подчеркивается, что клиническая эффективность существующих средств характеризуется гетерогенностью. Это обусловлено как неодинаковой чувствительностью к ним различных клон ВОО [43, 79], так и различиями в механизмах их действия [68].

1.5.1 Терапия ортопоксвирусных инфекций

Наиболее изученным препаратом является тековиримат (код разработки ST-246, ТРОХХ; США), ингибирующий белок F13 (гомолог белка p37 ВОР), кодируемый геном F13L, необходимый для формирования оболочечных вирионов (IEV) вируса и его межклеточного распространения [68]. Доклинические исследования подтвердили его активность против ВОО (средняя эффективная концентрация (EC₅₀) составляет от 0,01 до 0,48 мкмоль) [107], однако клинические данные разошлись с экспериментальными. Согласно ряду исследований, применение тековиримата не сократило время разрешения поражений по сравнению с плацебо (83% против 84% на 29-й день) [107]. Расхождения могут быть связаны с факторами хозяина и влиянием стадии заболевания на терапию, а также формированием резистентных мутаций в гене F13L (I327N, A295E, D294V, Y258C) [68, 108].

Второй препарат (код разработки CMX001; США) – бринцидофовир, липидный аналог цидофира, ингибирующий ДНК-полимеразу [68]. Его клиническое применение ограничено гепатотоксическим действием (аланинаминотрансферазы (АЛТ) у 22% пациентов) и недостаточностью доказательной базы эффективности при ВОО, несмотря на выраженную противовирусную активность *in vitro* [68, 108].

Особый интерес заслуживает отечественный препарат, в частности препарат НИОХ-14, разработанный ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора совместно с Новосибирским институтом органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН [21]. Соединение является аналогом ST-246, представляя собой пролекарственную форму,

трансформируясь в организме в активный метаболит, ингибирует белок p37 и блокирует высвобождение внеклеточных форм вируса [21]. При интраназальном заражении мышей вирусом экстремелии и ВОО установлено, что НИОХ-14 в дозе 50 мг/кг массы тела обеспечил достоверное повышение выживаемости, демонстрируя снижение титра вируса в легких, что сопоставимо с эффективностью ST-246 [21]. Преимуществом НИОХ-14 является его эффективность на ранних стадиях инфекционного процесса, делая его перспективным компонентом комбинированной терапии при ОПВ [4]. Следует отметить, что в настоящее время отсутствуют клинические исследования III фазы, ограничивая уровень доказательности существующих терапевтических подходов [107].

Учитывая риск развития резистентности и высокую стоимость терапии, назначение целенаправленной таргетной (целевой) терапии требует точной и быстрой верификации диагноза, что невозможно сделать без внедрения специфичных методов детекции ВОО.

1.5.2 Специфическая профилактика

Вакцинация остается основным методом профилактики ОПВ инфекций. Исторической основой профилактики является вакцина на основе ВОВ, обеспечивающая перекрестную защиту против ВОО [51]. Эффективность вакцины MVA-BN подтверждена крупным когортным исследованием Nash и соавт. [91], в котором показано, что эффективность одной дозы против инфицирования ВОО через 2-10 недель после вакцинации составила 71% [95% ДИ 60–79%]. Вакцины второго поколения, например вакцина ACAM2000 (США) и LC16m8 (Япония), индуцируют более выраженный иммунный ответ, однако сопровождаются высоким риском побочных эффектов [35].

Разработанная в Российской Федерации вакцина «ОртоПоксВак» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия) является вакциной четвертого поколения на основе аттенуированного штамма VACΔ6 ВОВ с шестью делециями генов вирулентности (C3L, N1L, J2R, A35R, A56R, B8R) [113]. Доклинические

исследования продемонстрировали способность «ОртоПоксВак» индуцировать клеточный и гуморальный ответ, включая продукцию нейтрализующих антител к белкам ВОО [113]. Для двухэтапной схемы иммунизации применяется инактивированная вакцина «ОспаВир» (АО «НПО «Микроген», Россия) [1].

Несмотря на прогресс в изучении ВОО в последние годы, остается открытым целый ряд фундаментальных вопросов, что ограничивает разработку диагностических и терапевтических средств. В связи с применением гетерологичных вакцин, неизбежно формируются пулы реагирующих антител в популяции. Это делает использование классических иммунологических методов невозможным для подтверждения инфицирования ВОО.

1.5.3 Нерешенные проблемы

Несмотря на значительный прогресс последних лет в изучении ВОО, ряд ключевых аспектов биологии и иммунологии вируса остается недостаточно изученным, тем самым ограничивая разработку диагностических и терапевтических средств.

1. Иммунные корреляты защиты. Отсутствие установленных иммунных коррелятов защиты – главная проблема. Не всегда прослеживается корреляция между наличием нейтрализующих антител и протективностью, свидетельствуя о вероятной ведущей роли клеточного иммунного ответа, механизмы которого требуют дополнительных исследований [98].

2. Перекрёстная реактивность. Феномен имеет двойственное значение: обеспечивает протективный эффект при гетерологичной иммунизации, одновременно снижая специфичность иммунологической диагностики, создавая методологическую проблему [66, 85].

3. Диагностика. Проблема диагностики ВОО заключается не в отсутствии тест-систем как таковых, а в отсутствии стандартизированных, клинически

валидированных и зарегистрированных наборов, обладающих оптимальной чувствительностью и специфичностью [98]. Существующие коммерческие наборы ИФА на основе белка A29 (ProteoGenix, Frdbio, RayBiotech, Sino Biological и др.) предназначены исключительно для научно-исследовательских целей и не одобрены для клинического применения [20, 114]. В Российской Федерации зарегистрированные отечественные ИФА-тест-системы для выявления антигена ВОО на момент начала исследования отсутствовали [20].

4. Эволюция вируса. Данные указывают на продолжение адаптации ВОО к организму человека, однако конкретные молекулярные механизмы, которые обеспечивают повышение трансмиссивности и изменение вирулентности, остаются недостаточно изученными [46, 68].

5. Отсутствие стандартизированных тест-систем для выявления антигена ВОО. Большинство перечисленных тест-систем, вероятно, не предназначены для работы с обеззараженным материалом [14, 98].

Белок A29 ВОО, благодаря наличию видоспецифичных эпитопов и высокой иммуногенности, может быть использован в качестве мишени для МКА, позволяющих дифференцировать ВОО от других ОПВ [25, 57]. Консервативность внутри вида, функциональная значимость и наличие видоспецифических эпитопов определяет белок A29 ВОО как перспективную мишень для получения МКА с последующей разработкой диагностических тест-систем, соответствующих современным требованиям чувствительности и специфичности [14, 15]. Накопленных к настоящему времени данные формируют основу для создания высокочувствительных методов лабораторного выявления ВОО [98]. Приоритетное значение в данном контексте приобретает этап перехода от экспериментальных разработок к медицинскому изделию [21]. Реализация этого перехода будет способствовать эффективному эпидемиологическому надзору за циркуляцией патогена.

Прогресс в исследуемой области будет определяться углублением знаний о молекулярной биологии вируса, антигенной структуре белка A29 ВОО, механизмах формирования иммунного ответа, развитием биоинженерных подходов к конструированию реагентов и методов диагностики, включая оптимизацию протоколов анализа [46, 68]. Перспективным направлением остается также создание бесприборных протоколов диагностики, адаптированных для использования в полевых условиях и регионах с ограниченными ресурсами, что необходимо для эффективного контроля распространения инфекции в эндемичных регионах [14, 60]. Перспективные подходы к лабораторной диагностике ВОО рассмотрены в [87].

Таким образом, представленные в настоящем обзоре сведения о состоянии исследований в области иммуноферментной диагностики ВОО на основе белка A29 определили для нас ориентиры научных исследовательских и практических разработок, направленных на совершенствование системы противоэпидемических мероприятий и обеспечение биологической безопасности Российской Федерации [14, 98].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) в рамках государственного задания № ГЗ-34/21. Исследования проводились в период с 2022 по 2026 гг. Эксперименты с нативным материалом, содержащим вирус оспы обезьян, выполнялись в лаборатории уровня биологической безопасности УББ-4 с соблюдением требований санитарно-эпидемиологических правил СП 3.3686-21. Обеззараженные образцы исследовали в лабораториях УББ-2.

Апробация разработанной тест-системы «Вектор ИФА ВОО-A29L АГ» проведена на клинических образцах, полученных в ходе вспышки оспы обезьян в Гвинейской Республике в 2025 году. Исследования выполнялись на базе Российско-Гвинейского научно-исследовательского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней (г. Киндия, Гвинейская Республика), созданного в 2017 году Роспотребнадзором на базе Научно-исследовательского института прикладной биологии Гвинеи (IRBAG). ПЦР-верификацию образцов проводили в лаборатории геморрагических лихорадок Национального института общественного здравоохранения Гвинейской Республики (Institut National de Santé Publique, Laboratoire des Fièvres Hémorragiques, Conakry).

2.1 ВИРУСНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

В работе использованы штаммы, представленные в таблице 2.1. и полученные из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора:

Таблица 2.1 – Штаммы вирусов, использованные в работе

Обозначение в работе	Вид вируса	Штамм	Коллекционный номер
ВОО ₁	Вирус оспы обезьян (<i>Monkeypox virus</i>)	<i>hMpxV/Russia/St.Petersburg-01/2022</i>	V-1200

ВОО ₂	Вирус оспы обезьян (<i>Monkeypox virus</i>)	<i>hMpxV/Russia/St.Petersburg-02/2022</i>	V-1201
ВОК	Вирус оспы коров (<i>Cowpox virus</i>)	<i>GRI-90-MA10</i>	V-1117
ВОВ (ЛИВП)	Вирус осповакцины (<i>Vaccinia virus</i>)	<i>ЛИВП</i>	V-401

2.2 КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСОВ

Культивирование вирусов проводили на перевиваемых линиях клеток *Vero* (АТСС CCL-81, из почки африканской зеленой мартышки) и *CV-1* (АТСС CCL-70, из почки африканской зеленой мартышки). Клетки культивировали [83] в среде Игла MEM («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота («Gibco», США), 2 мМ L-глутамина («ПанЭко», Россия) и антибиотики (пенициллин – 100 ЕД/мл, стрептомицин – 100 мкг/мл), инкубировали в стандартных условиях (при 37°C и 5% CO₂). Монослой клеток, достигший 80-90% конфлюэнтности, инокулировали вирусосодержащим материалом из расчета 0,01-0,1 БОЕ на клетку. После адсорбции в течение 1 часа при 37°C заменяли среду на поддерживающую (2% сыворотки), и инкубировали 5-7 суток до появления выраженного цитопатического эффекта (ЦПЭ). Затем культуральную вирусосодержащую жидкость (КВЖ) [7, 102] очищали от клеточного дебриса центрифугированием при 1000 × g, 10 мин и отбирали аликвоты для хранения при -70°C. Определение титров вируса выполняли методом подсчета бляшек на монослое клеток чувствительной культуры при инокуляции серией 10-ти кратных разведений вирусосодержащей жидкости с использованием 24-луночных планшетов («Costar», США) [83, 104]. Заражали монослой чувствительной клеточной культуры и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 5-7 суток до поражения монослоя на 80-90%. Титр рассчитывали по количеству бляшек в лунках [83, 104], где вносили разведения вирусосодержащей жидкости при отсутствии на монослое бляшек в лунках отрицательного контроля (вносили только питательную среду), выражали в БОЕ/мл. Полученный вирусосодержащий материал хранили при -70°C в жидком или лиофилизированном состоянии (высушивание с 10 % сахарозой на установке «FreeZone 6» («Labconco», США).

Биологическая активность использованных препаратов ОПВ представлена в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Биологическая активность препаратов использованных ОПВ

Вирус	Инфекционный титр, БОЕ/мл
ВОО ₁	$4,1 \times 10^6$
ВОО ₂	$7,9 \times 10^7$
ВОК	$4,0 \times 10^8$
ВОВ (ЛИВП)	$2,0 \times 10^8$

2.3 ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ

Все работы с инфицированным материалом проводили в лаборатории уровня биобезопасности УББ4 с соблюдением требований СП 3.3686-21 [18]. Требования к системе менеджмента качества медицинских изделий регламентированы решением Совета Евразийской экономической комиссии № 133 от 19 августа 2022 года [4]. Проведение вакцинопрофилактики натуральной оспы регламентировано методическими указаниями МУ 3.3.1.2044-06 [9]. Клиника, лечение и иммунопрофилактика натуральной оспы описаны в методических рекомендациях Федерального медико-биологического агентства [10]. Организация и проведение противоэпидемических и дезинфекционных мероприятий при натуральной оспе регламентированы методическими указаниями МУ 3.1/3.5.2497-09 [12]. Противоэпидемические мероприятия, направленные на предупреждение завоза и распространения оспы обезьян, регламентированы методическими рекомендациями МР 3.1.0290-22 [13]. Требования к государственной регистрации медицинских изделий, включая наборы реагентов для диагностики *in vitro*, регламентированы постановлением Правительства РФ № 1684 от 30 ноября 2024 года [17].

Инактивацию вирусов для последующей работы в «чистой зоне» проводили следующими методами [6, 7, 98]:

1. Инаktivация β-пропиолактоном [6]. Для получения инаktivированных цельновирионных антигенов ВОО₁, ВОК и ВОВ использовали обработку 0,02%

раствором β -пропиолактона («Sigma Aldrich», США) в течение 2 часов при 37°C. После инактивации аликвоты препаратов хранили при -70°C.

2. Метод термического обеззараживания [7]. Для обеззараживания клинических и экспериментальных образцов перед проведением ИФА использовали метод термического обеззараживания. Образцы в герметично закрытых пробирках помещали в водяную баню и выдерживали при температуре 98-100°C в течение 30 минут.

3. Инаktivация формальдегидом [7]. Для оценки влияния различных методов обеззараженного на сохранность антигена часть препаратов ВОО и ВОВ инаktivировали 8% раствором формальдегида. Вируссодержащую жидкость центрифугировали (14 000 $\times$ g, 15 мин), супернатант заменяли на 8% раствор формальдегида с однократной сменой в течение 2 суток при 4-6°C. Перед исследованием осадок ресуспендировали в физиологическом растворе.

2.3.1 Контроль полноты инаktivации

Полноту инаktivации оценивали путём трёхкратного пассирования обработанного материала на чувствительных культурах клеток *Vero* [10, 98]. Для этого 0,5 мл инаktivированного материала вносили в культуральный флакон с монослоем клеток *Vero* (80-90% конфлюэнтности) и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 7 суток. При отсутствии цитопатического эффекта проводили последовательный (слепой) пассаж (0,5 мл культуральной жидкости переносили на свежий монослой клеток). Отсутствие цитопатического эффекта (ЦПЭ) после трёхкратного пассирования и отрицательного результата ПЦР подтверждали полную инаktivацию вирусов.

2.4 ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

Для получения гибридом, продуцирующих МКА, использовали инбредных мышей линии *BALB/c* (разнополые, в возрасте 10-12 недель, масса 20-22 г), полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Содержание

осуществлялось в условиях вивария с контролируемым световым режимом (12/12 ч), с обеспечением свободного доступа к воде и корму.

Для получения ПКА использовали 4 кроликов породы шиншилла (масса 2,5-3,0 кг), иммунизированных вирусом осповакцины (штамм ЛИВП). Животные получены из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Содержание осуществлялось в индивидуальных клетках с обеспечением свободного доступа к воде и корму [91].

Все манипуляции проводили в соответствии с правилами гуманного обращения с лабораторными животными (Директива 2010/63/EU, Приказ Минздравсоцразвития России № 708н). Протоколы исследований одобрены комитетом по биоэтике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (протокол № 5а от 21.07.2022).

2.5 Биологический и клинический материал

Для селекции продуцентов МКА, отработки протоколов применения тест-системы, контроля качества серий набора реагентов и проведения его испытаний в ходе процедуры регистрации, были использованы препараты КВЖ и выборки образцов, полученные на основе биологического материала от пациентов с установленным диагнозом оспа обезьян (B04 по МКБ-10), согласно результатам клинической лабораторной диагностики. Также для создания контрольных препаратов использован биологический материал от условно здоровых доноров, от добровольцев вакцинированных осповакциной и от пациентов медучреждений с установленными диагнозами гетерологичных заболеваний. Весь материал перед исследованием был обеззаражен кипячением в течение 30 мин при 98-100°C согласно СП 3.3686-21 [18]. С целью выявления ДНК возбудителей заболеваний, аликвоты этих образцов исследовались до обеззараживания методом ПЦР. Последующее хранение до проведения анализа осуществляли при температуре минус 70°C.

Клинические испытания медицинского изделия «Вектор ИФА ВОО-A29L АГ» проводили в форме клинико-лабораторных исследований с использованием

остаточных образцов биологического материала. План исследования – ретроспективный (с использованием архивных образцов, полученных в ходе лечебно-диагностического процесса в период 2022-2025 гг.). Отбор образцов проводили в соответствии с критериями, представленными в таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Критерии включения и невключения образцов в исследование

Критерий	Значение
Наличие ДНК возбудителя	Образцы, содержащие ДНК ВОО – для положительной выборки; инфекции, вызванные перекрестно-реагирующими возбудителями или здоровые доноры – для отрицательной.
ПЦР	Ct <40 (положительные); Ct ≥ 37 (отрицательные)
Тип образца	Сыворотка крови, мазки из ротоглотки, соскобы с пустул, везикулярная жидкость
Объем	Не менее 200 мкл
Гемолиз	Гемоглобин > 1000 мг/дл
Липемия	Триглицериды > 700 мг/дл
Иктеричность	Билирубин > 15 мг/дл
Хранение	При температуре -70°C
Транспортировка	Без нарушения холодового цикла не выше -4 °C

Примечание – Ct – пороговый цикл амплификации

С целью первичной оценки диагностической эффективности разработанных протоколов ИФА использовали панель из 62 клинических образцов, подозрительных на содержание ВОО [16]. Распределение образцов по типам представлено в таблице 2.4.

Таблица 2.4 – Характеристика образцов для первичной апробации протоколов

Тип образца	ПЦР (+)	ПЦР (-) ВОО; (+) гетерологичные	ПЦР (-)	Всего
Сыворотка крови	11	2	2	15
Содержимое везикул	9	1	2	12
Мазки из ротоглотки	16	1	2	19
Соскобы с пустул	13	1	2	16
Всего	49	5	8	62

Примечание – ПЦР (+) – образцы, содержащие ДНК ВОО; ПЦР (-) на ВОО; (+) гетерологичные – образцы от пациентов с инфекциями, вызванными гетерологичными возбудителями, не содержащие ДНК ВОО; ПЦР (-) – образцы, не содержащие ДНК ВОО

Для определения аналитических и диагностических характеристик разработанного набора ИФА использовали панель из 183 биологических образцов и препарат «Рабочая панель обеззараженных образцов, содержащих и не содержащих вирус оспы обезьян «РП-АГ(+/-) ВОО. Их применение обусловлено требованиями к медицинским изделиям для диагностики *in vitro* [7, 8].

Состав панели:

1. Положительная выборка (n=53) – образцы содержащие ДНК ВОО:
 - a. мазки из ротоглотки – 27 образцов (Ct 9,3-29,6);
 - b. соскобы с пустул – 11 образцов (Ct 13,7-29,0);
 - c. везикулярная жидкость – 4 образца (Ct 16,1-25,6);
 - d. сыворотка крови – 11 образцов (Ct 16,0-29,4).
2. Отрицательная выборка (n=130) – образцы, не содержащие ДНК ВОО, от пациентов с перекрестно-реагирующие инфекциями и доноров крови:
 - a. соскобы с пустул (ВОВ) – 94 образца;
 - b. смывы из носоглотки (ВОН) – 3 образца;
 - c. соскобы с пустул (HSV-2) – 10 образцов;
 - d. соскобы с пустул (VZV) – 8 образцов;
 - e. сыворотка крови (ВОВ) – 4 образца;
 - f. сыворотка крови (здоровые доноры) – 11 образцов.

Препарат «РП-АГ (+/-) ВОО» сформирован из пулов клинического материала [6, 7]. Его состав:

1. 8 положительных образцов (№184-191), содержащих ДНК ВОО (Ct 14,7-17,6);
2. 8 отрицательных образцов (№192-199), не содержащих ДНК ВОО (Ct > 37).

Образец №3пол «РП- АГ (+/-) ВОО» по концентрации антигена разведенному в 10 раз образцу соответствовал №1пол, содержавшему до обеззараживания ВОО в

концентрации $(2,5 \pm 0,5) \times 10^4$ БОЕ/мл, использовался также для определения аналитической чувствительности (предела обнаружения).

С целью оценки влияния эндогенных интерферирующих веществ на эффективность разработанной тест-системы в рамках клинических испытаний сформирована панель из 24 образцов:

1. 12 отрицательных образцов: 1 образец сыворотки крови и 1 образец мазка из ротоглотки условно здорового донора, каждый без контаминации и с добавлением интерферирующих веществ;
2. 12 положительных образцов: 3 образца сыворотки крови (№43, 44, 45) и 3 образца мазков из ротоглотки (№5, 6, 7) от трех разных пациентов, больных оспой обезьян, каждый без контаминации и с добавлением интерферирующих веществ.

В качестве интерферирующих веществ при проведении клинических испытаний медицинского изделия использовали [7]:

1. Гемоглобин – свободный гемоглобин, получен путем лизирования эритроцитов человека дистиллированной водой, конечная концентрация 1000 мг/дл;
2. Билирубин – лиофилизированный препарат («Sigma», США; кат № B4126-1G), конечная концентрация 15 мг/дл;
3. Триглицериды – 20% эмульсия интралипида («Fresenius Kabi», Австрия; lot 16NG4910), конечная концентрация 700 мг/дл.

Для изучения влияния термической обработки на сохранность антигена использовали модельные образцы, приготовленные на основе КВЖ:

1. КВЖ ВОО (штамм *hMpxV/Russia/St.Petersburg-02/2022*, титр $7,9 \times 10^7$ БОЕ/мл);
2. КВЖ ВОВ (штамм ЛИВП, титр $2,0 \times 10^8$ БОЕ/мл).

Для независимой оценки диагностической эффективности медицинского изделия «Вектор ИФА ВОО-A29L АГ» использовали выборку 121 клинического образца, собранную у пациентов с подозрением на наличие ВОО в медицинских

учреждениях г. Конакри и прилегающих префектур (Койя, Форекарья, Киндиа, Дабола) в ходе мероприятий экстерриториального мониторинга на территории Гвинейской Республики в 2025 году:

1. 40 смывов с пустулы;
2. 81 корочку с кожного поражения.

Все эти образцы (100%) содержали ДНК ВОО. Диапазон пороговых циклов амплификации (Ct) составил от 10,78 до 25,46, среднее значение – $22,4 \pm 8,2$, медиана – 22,22. В качестве отрицательного контроля использован К- набора реагентов.

2.6 РЕФЕРЕНСНАЯ ДИАГНОСТИКА

В качестве референтного метода для подтверждения наличия вируса, в клинических образцах выявляли ДНК ВОО методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [7] с применением зарегистрированного медицинского изделия «Набор реагентов для амплификации ДНК вирусов натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, осповакцины с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «Вектор-МППРв-Оспа»» производства ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Выделение ДНК из образцов проводили с использованием набора «Рибо-преп» («Амплисенс», Россия) согласно инструкции производителя. Амплификацию осуществляли на приборе Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия) или CFX96 («Bio-Rad», США). Учет результатов проводили по значениям порогового цикла амплификации (Ct) [7, 131]. Образцы со значением Ct <40 расценивали как положительные, со значением Ct ≥ 40 – отрицательные.

Для выявления наличия ДНК ВОО в клинических образцах от пациентов из Республики Гвинея использовали набор реагентов «FlexStar® Monkeypox virus PCR Detection Mix 1.5» («Altona Diagnostics», Германия). ПЦР-анализ проводили в лаборатории геморрагических лихорадок Национального института общественного здравоохранения Гвинейской Республики (Institut National de Santé Publique, Laboratoire des Fièvres Hémorragiques, Conakry).

2.7 РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Работы по получению и очистке рекомбинантных белков были проведены в других отделах ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Их продуценты депонированы в коллекции организации. Препараты для исследования поступали с паспортами качества, и чистота по электрофорезу была не менее 99%.

2.7.1 Штамм-продуцент белка AgPOX

На основе штамма *BL21(DE3) Escherichia coli* («Novagen», США) был сконструирован продуцент *E. coli BL21(DE3)/pET28b-AgPOX* (приложение К) белка AgPOX (приложение М), который обеспечивал синтеза белка AgPOX. Экспрессию целевого белка индуцировали добавлением изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) и внесением IPTG («Sigma Aldrich», США) до конечной концентрации 0,1 мМ. Накопление рекомбинантного белка AgPOX при выделении методом металл-хелатной аффинной хроматографии [71] составило 5-10 мг на 1 г сырой биомассы. Паспорт штамма представлен в приложении А.

2.7.2 Штамм-продуцент белка Trx-A29

Второй штамм-продуцент (приложение Л), *E. coli Rosetta2/pET-32(a)-A29L* («Novagen», США), использовали для наработки рекомбинантного белка Trx-A29 (приложение Н). При индукции синтеза белка Trx-A29 с использованием ИПТГ выход очищенного белка составил 7,32 мг на 1г сырой биомассы. Так как в составе конструкции входит аминокислотная последовательность тиреодоксина (Trx), при применении белка Trx-A29 для отбора продуцента антитело-продуцирующих клонов методом ИФА потребовалось использование дополнительного этапа контроля с использованием очищенного Trx. Это позволило выявить и исключить клоны, специфичные к тиреоредоксину [7]. Паспорт штамма представлен в приложении В.

2.7.3 Очистка рекомбинантных белков

Очистку AgPOX и Trx-A29 проводили методом аффинной металл-хелатной аффинной хроматографии. Клеточную биомассу после индукции экспрессии осаждали центрифугированием, ресуспендировали в лизирующем буферном растворе (50 мМ

NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM имидазол, pH 8,0), после чего разрушали ультразвуковым дезинтегратором.

Полученный лизат центрифугировали (15 000g, 30 мин, 4°C), супернатант наносили на колонку HisTrap FF («Cytiva», США), предварительно уравновешенную буферным раствором. Элюирование целевого белка проводили градиентом имидазола (50-500 mM) в том же буфере. Полученные фракции, содержащие целевой белок, объединяли и подвергали диализу против фосфатно-солевого буфера (ФСБ, pH 7,4) в течение 24 ч при 4°C. Концентрацию очищенного белка определяли спектрофотометрически [71] на NanoDrop 2000 («Thermo Scientific», США) при длине волны 280 нм. Выход очищенного рекомбинантного белка AgPOX составил 5-10 мг на 1 г биомассы, белка Ttx-A29 – 7,32 мг на 1 г сырой биомассы.

Далее очищенный белок AgPOX использовали для иммунизации лабораторных мышей при получении гибридом-продуцентов МКА (раздел 2.8). Рекомбинантный белок Ttx-A29 применяли в качестве антигена для первичного скрининга гибридом и как концентрат для положительного контрольного образца в наборе реагентов.

2.8 ГИБРИДОМЫ И МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Работа по гибридизации осуществлялась согласно договору в коммерческой организации на основе предоставленных препаратов рекомбинантных белков, которые были использованы для иммунизации животных и селекции спленоцитов. Процедура отбора клеток для гибридизации и полученных гибридом осуществлялась автором на основе предоставленных препаратов антител, получаемых на каждом этапе селекции тестируемых продуцентов.

Трёх мышей линии *BALB/c* иммунизировали внутрибрюшино очищенным рекомбинантным белком AgPOX в дозе 50 мкг/животное по схеме:

1-я иммунизация (1-е сутки): эмульсия антигена с полным адъювантом Фрейнда («Sigma Aldrich», США) в соотношении 1:1;

2-я иммунизация (14-е сутки): эмульсия антигена с неполным адъювантом Фрейнда («Sigma Aldrich», США) в соотношении 1:1;

3-я иммунизация (28-е сутки): эмульсия антигена с неполным адъювантом Фрейнда в соотношении 1:1;

Бустерная иммунизация (42-е сутки): 50 мкг антигена в физиологическом растворе (0,9% NaCl) без адъюванта.

Через трое суток после последней иммунизации животных выводили из эксперимента методом, описанным в разделе 2.4. Извлеченные селезенки использовали для получения клеточной суспензии спленоцитов [8].

Слияние (гибридизацию) спленоцитов с клетками мышинной миеломы линии SP2/0 проводили с использованием 50% раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ) 1500 («Sigma Aldrich», США). При слиянии использовали соотношение спленоцитов к миеломным клеткам, которое составило 5:1. После слияния полученную клеточную взвесь ресуспендировали в селективной среде IMDM («ПанЭко», Россия), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой («HyClone», США), 2 мМ L-глутамина, 100 мкМ гипоксантина, 0,4 мкМ аминоптерина и 16 мкМ тимидина (НАТ-среда, «Sigma Aldrich», США). Клетки высевали в 96-луночные культуральные планшеты («Costar», США), культивировали при 37°C, в атмосфере 5% CO₂. Каждые трое суток половину среды заменяли на свежую НАТ-среду. На 10-14-е сутки культивирования супернатанты из лунок с пролиферирующими гибридами анализировали методом ИФА на наличие специфичных антител [71, 97].

Для получения препаративных количеств МКА отобранные гибридомы культивировали в среде IMDM с 10% сыворотки в роллерных флаконах («Corning», США) или наращивали в виде асцитной жидкости у мышей BALB/c (предварительная обработка пристаном в объеме 0,5 мл/мышь за 14 дней до инокуляции клеток). Выделение и очистку МКА из культуральной жидкости и асцитной жидкости проводили методом аффинной хроматографии на колонках с белок-А-сефарозой.

Концентрацию очищенных препаратов антител определяли спектрофотометрически [71]. Аликвоты полученных антител хранили при -70°C.

2.9 ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Для получения ПКА к ОПВ четырёх кроликов породы шиншилла иммунизировали ВОВ (штамм ЛИВП, инфекционный титр 1×10^7 БОЕ/мл) по следующей схеме [91]:

1-я иммунизация: внутримышечно, эмульсия, содержащая 0,5 мл препарата ВОВ и 0,5 мл полного адъюванта Фрейнда («Sigma Aldrich», США);

2-я иммунизация (14-е сутки): внутримышечно, эмульсия, содержащая 0,5 мл препарата ВОВ и 0,5 мл неполного адъюванта Фрейнда («Sigma Aldrich», США);

3-я иммунизация (28-е сутки): внутримышечно, эмульсия, содержащая 0,5 мл препарата ВОВ и 0,5 мл неполного адъюванта Фрейнда.

Забор крови осуществляли из краевой вены уха через 14 дней после последней иммунизации. Сыворотку крови получали после инкубации (37°C в течение 1 ч) и последующего центрифугирования (1500 g, 10 мин).

Выделение ПКА из сыворотки проводили методом осаждения сульфатом аммония (степень насыщения 40%). Образовавшийся осадок растворяли в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, pH 7,4) и подвергали диализу против того же буфера в течение 24 ч при 4°C. Концентрацию очищенных препаратов антител определяли спектрофотометрически [14] с использованием прибора NanoDrop 2000 («Thermo Scientific», США); значения составили 3-4 мг/мл.

2.10 ПОЛУЧЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ

2.10.1 Получение биотинилированного конъюгата

Биотинилирование МКА проводили с использованием Sulfo-NHS-Biotin («ProteoChem», США) в соответствии с протоколом производителя. Раствор МКА (10

мг/мл) готовили в 100 мМ натрий-фосфатном буферном растворе, содержащем 150 мМ NaCl (pH 7,2-7,5). Исходный раствор Sulfo-NHS-Biotin (20 мг/мл) готовили с использованием диметилсульфоксид (ДМСО) («Sigma-Aldrich», США). К раствору МКА добавляли биотинилирующий реагент в 10-кратном молярном избытке. Реакцию проводили в течение одного часа при комнатной температуре. Непрореагировавший Sulfo-NHS-Biotin удаляли посредством гель-фильтрации с использованием Sephadex G-25 («Cytiva», США).

2.10.2 Получение конъюгата с пероксидазой хрена

Конъюгат моноклональных антител A29L-7 с пероксидазой хрена (МКА-HRP) получали периодатным методом. Раствор МКА (0,5 мл, 8 мг/мл) диализовали против 500 мл 0,1М карбонат-бикарбонатного буферного раствора (КББ), при pH 9,2-9,5, в течение ночи. 4 мг пероксидазы хрена растворяли в 500 мкл деионизированной воды. К свежеприготовленному раствору пероксидазы добавляли 100 мкл 0,1М раствора периодата натрия («Thermo Scientific», США). Полученную смесь защищали от света и инкубировали без перемешивания 30 мин при комнатной температуре.

Через 20 минут после начала реакции добавляли 10 мкл этиленгликоля («Honeywell Research Chemicals», США). Раствор пероксидазы диализовали против 1,5ММ ацетата натрия («MilliporeSigma», США), pH 4,5, меняя при этом раствор три раза каждый час. После завершения диализа раствор МКА смешивали с раствором активированной пероксидазы и инкубировали три часа при комнатной температуре. Боргидрид натрия («Sigma-Aldrich», США) растворяли в охлаждённой деионизированной воде до концентрации 20 мг/мл и добавляли к конъюгату в соотношении 1:100 по объёму. Полученный конъюгат выдерживали три часа при +4 °С. Затем проводили замену буферного раствора на ФСБ («ПанЭко», Россия) посредством гель-фильтрации. К конъюгату добавляли бычьего сывороточного альбумина (BSA) («ПанЭко», Россия) до конечной концентрации 5 мг/мл и смешивали с глицерином в соотношении 1:1. Полученный конъюгат далее хранили при -20 °С.

2.10.3 Получение конъюгата с флуоресцеинизотиоцианатом

Конъюгирование МКА с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) проводили в соответствии с рекомендациями производителя реагента:

Для проведения реакции готовили раствор МКА с концентрацией 2 мг/мл в 0,1 М натрий-карбонатном буферном растворе, pH 9,0. FITC («Sigma-Aldrich», США) растворяли в безводном ДМСО («Sigma-Aldrich», США) до концентрации 1 мг/мл. Раствор FITC готовили непосредственно перед проведением реакции мечения. На каждый 1 мл раствора МКА добавляли 50 мкл раствора FITC. После постепенного внесения всего объёма FITC полученную реакционную смесь инкубировали в темноте в течение 8 часов при температуре +4 °С. После завершения реакции добавляли NH₄Cl («Sigma-Aldrich», США) до конечной концентрации 50 мМ и инкубировали в течение 2 часов при температуре +4°С. Затем добавляли ксиленцианол («Sigma-Aldrich», США) до конечной концентрации 0,1% и глицерин («Sigma-Aldrich», США) до конечной концентрации 5%.

Несвязавшийся FITC отделяли от конъюгированных МКА методом гель-фильтрации с использованием Sephadex G-25 («Cytiva», США). Реакционную смесь наносили на поверхность колонки, затем наслаивали PBS и буферный раствор. При разделении формировались две полосы: быстро перемещающаяся полоса соответствовала конъюгированным МКА и элюирована первой, в то время как более медленно перемещающаяся полоса соответствовала свободному FITC и ксиленцианолу и удалялась при последующем промывании PBS. Концентрацию МКА в полученном конъюгате рассчитывали в соответствии с рекомендациями производителя.

2.11 КОНТРОЛЬНЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для оценки перекрёстной реактивности использовали обеззараженные препараты гетерологичных вирусов, вызывающие сходную клиническую картину:

HSV-2 – вирус простого герпеса 2 типа (Herpes simplex virus type 2) – штамм H2-98 (коллекционный номер V-487);

VZV – вирус ветряной оспы (Varicella zoster virus) – штамм *Ellen* (коллекционный номер V-242);

ККГЛ – вирус Крым-Конго геморрагической лихорадки – штамм 11-ROS/HU-2016 (коллекционный номер № V-912);

ЛЗН – вирус лихорадки Западного Нила – штамм Tomsk/Bird/2006/A4 (коллекционный номер V-868);

ВОК и ВОВ, характеристика которых приведена в разделе 2.1.

В качестве контрольных образцов разработанного набора реагентов использовали:

- а) положительный контроль (К+) – рекомбинантный белок Tгх-A29 (0,5 мкг/мл), содержащий последовательность A29 ВОО;
- б) отрицательный контроль (К-) – препарат ВОВ, обеззараженный β-пропиолактоном [6].

Для оценки специфичности полученных МКА и исключения неспецифического связывания при скрининге гибридом (раздел 3.2) в качестве отрицательных контролей использовали МКА:

- 1) к вирусу Крым-Конго геморрагической лихорадки (клон 1E2/E5), полученные ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Россия), защищены патентом РФ № 2528868 С1¹ (штамм ССНФV Vd-2, депонирован в ГКПМ-ОБОЛЕНСК под номером Н-26);

¹ Пат. 2528868 С1 Российская Федерация, МПК С12N 5/20, С07K 16/10. Штамм культивируемых гибридных клеток животного *Mus musculus* L. ССНФV Vd-2 – продуцент моноклонального антитела 1E2/E5 к вирусу Крым-Конго геморрагической лихорадки / Сергеев А.Н., Пьянков О.В., Пьянков С.А. и др.; заявитель и патентообладатель ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора. – № 2013145639/10; заявл. 10.10.2013; опубл. 20.09.2014, Бюл. № 26. –8 с.

- 2) лихорадки Западного Нила (клон 5H11), производства «ACROBiosystems», Китай;
- 3) SARS-CoV-2 (клон AS110) производства «ACROBiosystems», Китай.

2.12 ПРОЦЕДУРА ИФА

2.11.1 Иммуноферментный анализ для скрининга гибридом

Цельновирионные препараты ВОО¹, ВОК и ВОВ отдельно использовали для приготовления иммуносорбентов на этапах скрининга продуктов гибридом и оценки специфичности полученных антител [71]. Для этого антигены сорбировали (иммобилизовали) в лунках 96-луночных полистироловых планшетов Nunc MaxiSorp («Thermo Scientific», США), разводя в 0,05 М карбонат-бикарбонатном растворе (pH 9,6) до концентрации 5 мкг/мл по общему белку. Сорбцию проводили в течение 18 часов при 23°C. После окончания сорбции раствор удалили аспирацией, затем свободные сайты связывания на поверхности лунок блокировали раствором 0,1% казеина в течение 2 часов при 23°C. Далее планшеты высушивали и хранили при 4°C до использования в герметичном пакете с осушителем.

Для проведения ИФА супернатанты исследуемых гибридом в разведении 1:100 вносили в лунки каждого иммуносорбента по 100 мкл и инкубировали 60 мин при 37°C. Образцы тестировали в трех повторах. После завершения инкубации лунки пятикратно промывали фосфатно-солевым буферным раствором с Твин-20 (ФСБ-Т), затем вносили конъюгат кроличьих антител, специфичных к IgG мыши и меченых пероксидазой хрена («Sigma Aldrich», США) в рабочем разведении 1:5000 и инкубировали 30 мин при 37°C. Процедуру отмывки повторяли, затем вносили раствор хромогена – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ, «Вектор-Бест», Россия) и инкубировали 15 мин при 37°C. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 1 М раствора серной кислоты.

2.11.2 Протокол иммуноферментного анализа для выявления ВОО

Оптимальные условия сорбции для ПКА на поверхности планшета были определены в ходе выполнения работы и подробно изложены в главе 4, раздел 4.2. Согласно разработанному протоколу, ПКА сорбировали в лунках 96-луночных полистироловых планшетов Nunc MaxiSorp («Thermo Scientific», США) в концентрации 3 мкг/мл в карбонатном буфере (pH 10,0) в течение 18 ч при 23°C. После окончания сорбции раствор удаляли аспирацией, свободные сайты связывания блокировали 0,1% раствором казеина («Serva», Германия) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, pH 7,4) в течение 2 ч при 23°C. Планшеты высушивали при 37°C в течение 2 ч и хранили при 4°C в герметичной вакуумной упаковке в присутствии силикагеля.

Постановку ИФА проводили в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов «Вектор ИФА ВОО-A29L АГ». Параметры постановки оптимизированы в ходе экспериментов [14, 15].

Лабораторный протокол. В лунки иммуносорбента (планшет с иммобилизованными ПКА к ОПВ) вносили по 100 мкл контролей (K+ и K-) и исследуемых образцов. Инкубировали 60 мин при 37°C с перемешиванием (700 об/мин) на термостатируемом шейкере PST-60HL («BioSan», Латвия). После трёхкратной промывки (300 мкл/лунка, замачивание 40-60 с) вносили по 100 мкл рабочего раствора пероксидазного конъюгата МКА А29L-7 (10 мкг/мл) и инкубировали 30 мин при 37°C с перемешиванием. После семикратной промывки вносили по 100 мкл хромогена ТМБ, инкубировали 15 мин при 37°C, останавливали реакцию добавлением 50 мкл стоп-реагента (1 М H₂SO₄) и регистрировали оптическую плотность на микропланшетном спектрофотометре Multiskan FC («Thermo Scientific», США) при 450 нм (референсная длина волны – 620 нм). Каждый образец тестировали в трёх и более повторях; эксперименты проводили в двух последовательных постановках с использованием двух серий набора реагентов [15].

Бесприборный протокол. Отличался проведением инкубаций при комнатной температуре (17-27°C) без шейкирования: инкубация с образцом – 120 мин, с конъюгатом – 60 мин. Отмывку проводили вручную многоканальной пипеткой,

результат учитывали визуально путём сравнения окрашивания исследуемых лунок с лункой отрицательного контроля [7]. При применении лабораторного протокола использовали термостатируемый шейкер PST-60HL («BioSan», Латвия) и микропланшетный спектрофотометр Multiskan FC («Thermo Scientific», США). Каждый образец тестировали в трех и более повторях, эксперименты проводили в двух последовательных постановках, с использованием двух серий наборов реагентов [15].

2.12 Обработка результатов ИФА для выявления ВОО

Интерпретацию осуществляли согласно критериям инструкции по применению набора реагентов «Вектор ИФА ВОО-A29L АГ» и приведённым в разделе 4.4 настоящей диссертации. Определение характеристик медицинского изделия проводили согласно требованиям нормативных документов [7, 8].

Коэффициент позитивности (КПоз) рассчитывали по формуле:

$$\text{КПоз} = \text{ОП}_{\text{образца}} / [4 \times \text{ОП}_{\text{К-(ср.)}}], \quad (2.1)$$

где ОП образца – оптическая плотность исследуемого образца;

$\text{ОП}_{\text{К-(ср.)}}$ – среднее арифметическое значение ОП в лунках с отрицательным контролем (К-).

Множитель 4 в знаменателе указан для установления статистически обоснованного порога, при котором вероятность ложноположительного результата минимальна. При нормальном распределении фонового сигнала выход за пределы четырёх стандартных отклонений от среднего значения К- соответствует уровню значимости $p < 0,001$, что является общепринятым критерием для ИФА тест-систем.

Диагностическую чувствительность (Se) и специфичность (Sp) рассчитывали следующим по формулам:

$$\text{Se} = \text{ИП} / [\text{ИП} + \text{ЛО}] \times 100\%, \quad (2.2)$$

$$\text{Sp} = \text{ИО} / [\text{ИО} + \text{ЛП}] \times 100\%, \quad (2.3)$$

где ИП – количество истинно положительных результатов;

ЛО – количество ложноотрицательных результатов;

ИО – количество истинно отрицательных результатов;

ЛП – количество ложноположительных результатов.

Границы погрешностей для 95% уровня доверительного интервала (ДИ95) показателей чувствительность и специфичность рассчитывали методом Клоппера-Пирсона (Clopper-Pearson) [92].

Аналитическую специфичность рассчитывали следующей по формуле:

$$\text{Аналитическая специфичность} = (\text{ИО} / (\text{ИО} + \text{ЛП})) \times 100\% = 100\% \quad (2.4)$$

где ИО – истинно отрицательные результаты;

ЛП – ложноположительные результаты.

Воспроизводимость результатов в пределах одной постановки (повторяемость) оценивали путём проведения трёхкратного анализа каждого образца на одном планшете. Межсерийную воспроизводимость оценивали экспериментально, применяя две независимых серий набора реагентов (n=6-8 повторов в зависимости от эксперимента). Коэффициент вариации (CV) рассчитывали по формуле:

$$CV = (\sigma / M) \times 100\%, \quad (2.5)$$

где σ – стандартное отклонение;

M – среднее арифметическое значение.

Допустимым считали значения $CV \leq 8\%$.

Для количественной оценки согласованности результатов ИФА и ПЦР использовали коэффициент каппа Коэна (κ) [86]:

$$\kappa = [P_o - P_e] / [1 - P_e], \quad (2.6)$$

где P_o – наблюдаемая доля совпадений;

P_e – ожидаемая доля совпадений при случайном распределении.

Значения k интерпретировали следующим образом:

$k = 1,00$ – полное совпадение;

$k \geq 0,81$ – очень хорошая согласованность;

$k = 0,61-0,80$ – хорошая согласованность;

$k \leq 0,60$ – удовлетворительная или низкая согласованность.

КПоз использовали для оценки экспериментальных постановок на этапах оптимизации набора реагентов. При интерпретации результатов клинического исследования в соответствии с инструкцией по применению набора использовали:

$$ОП_{крит} = ОП(K-)_{ср.} + 0,15 \text{ о.е.}, \quad (2.7)$$

где ОП_{крит.} – критическое значение оптической плотности.

Считать образец положительным если:

ОП образца равна или более ОП_{крит} ($ОП_{образца} \geq ОП_{крит.}$).

Считать образец отрицательным если:

ОП образца менее ОП_{крит} ($ОП_{образца} < ОП_{крит.}$).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Statistica 13 (StatSoft, USA).

Для количественных показателей (ОП, КПоз) рассчитывали среднее арифметическое (M , о.е.), стандартное отклонение (σ , о.е.) и границы 95% доверительного интервала.

Для сравнения двух независимых выборок применяли t-критерий Стьюдента² при выполнении условий его применимости; U-критерий Манна–Уитни³ с последующим попарным анализом при необходимости.

Для сравнения трёх и более независимых групп применяли критерий Краскела–Уоллиса⁴; критерий Фридмана⁵ (для связанных выборок) с последующим попарным сравнением методом Данна⁶ с поправкой Бонферрони⁷ на множественные сравнения.

Диагностическую чувствительность, специфичность и общую точность представляли с двусторонними 95% доверительными интервалами, рассчитанными методом Клоппера-Пирсона⁸.

Повторяемость и воспроизводимость оценивали по коэффициенту вариации (CV). Согласованность результатов ИФА и референсного метода оценивали с использованием коэффициента каппа Коэна⁹ (κ).

Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ (или скорректированного поправкой значения уровня надежности).

2.12 СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ ТРЕБОВАНИЙ

Протоколы исследований, включавшие работу с лабораторными животными, были одобрены комитетом по биоэтике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол № 5а от 21.07.2022). Все манипуляции с лабораторными животными

² Student (Gosset W.S.). The Probable Error of a Mean // *Biometrika*. – 1908. – Vol. 6, N 1. – P. 1–25.

³ Mann H.B., Whitney D.R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other // *Annals of Mathematical Statistics*. – 1947. – Vol. 18. – P. 50-60.

⁴ Kruskal W.H., Wallis W.A. Use of ranks in one-criterion variance analysis // *Journal of the American Statistical Association*. – 1952. – Vol. 47, N 260. – P. 583-621.

⁵ Friedman M. The Use of Ranks to Avoid the Assumption of Normality Implicit in the Analysis of Variance // *Journal of the American Statistical Association*. – 1937. – Vol. 32, N 200. – P. 675-701

⁶ Dunn O.J. Multiple Comparisons Using Rank Sums // *Technometrics*. – 1964. – Vol. 6, N 3. – P. 241-252.

⁷ Bonferroni C.E. Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità // *Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze*. – 1936. – Vol. 8. – P. 3-62.

⁸ Clopper C.J., Pearson E.S. The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial // *Biometrika*. – 1934. – Vol. 26, N 4. – P. 404-413.

⁹ Cohen J. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales // *Educational and Psychological Measurement*. – 1960. – Vol. 20, N 1. – P. 37-46.

проводили в соответствии с правилами гуманного обращения (Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза, Приказ Минздравсоцразвития России № 708н от 23.08.2010).

Протокол исследования клинических образцов, полученных на территории Гвинейской Республики, был одобрен Национальным комитетом по этике медицинских исследований Гвинеи (Comité National d'Éthique pour la Recherche en Santé, № 129/CNERS/16/).

ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ БЕЛКА A29 ВИРУСА ОСПЫ ОБЕЗЬЯН И ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Для создания высокоспецифичной тест-системы ИФА, способной дифференцировать ВОО от других ОПВ, необходимо было получить МКА, распознающие уникальные эпитопы белка A29 ВОО.

В настоящей главе представлены результаты ключевого этапа работы – получения и селекции гибридомных клонов-продуцентов видоспецифичных МКА. Решение этой задачи включало последовательное выполнение следующих шагов:

1. Контроль качества антигенных препаратов – проверка нативных антигенов ВОО, ВОК и ВОВ для использования в качестве иммуносорбентов на этапах скрининга (раздел 3.1).
2. Разработка схемы трёхэтапного скрининга гибридом – создание алгоритма, позволяющего на каждом этапе исключать клоны с перекрёстной реактивностью и отбирать только те, которые продуцируют антитела к видоспецифичным детерминантам A29 (раздел 3.2).
3. Характеристика отобранного клона-продуцента – определение реактивности и специфичности МКА, полученных от гибридомы (раздел 3.3).

3.1 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА НАТИВНЫХ АНТИГЕНОВ

Для обеспечения корректности последующего многоэтапного скрининга гибридом необходимо было предварительно определить антигенную пригодность используемых нативных препаратов. Так как структурные белки ОПВ характеризуются высокой степенью консервативности, иммуносорбенты на основе ВОО, ВОК и ВОВ должны демонстрировать предсказуемую родоспецифичную реактивность при взаимодействии с ПКА. Подтверждение данного свойства гарантировало, что препараты пригодны для использования в качестве положительных контролей и инструментов для последующей отбраковки перекрестно-реагирующих клонов. Результаты тестирования иммуносорбентов с

сыворотками мышей, иммунизированных штаммом ЛИВП осповакцины, представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Специфичность иммуносорбентов на основе антигенов ОПВ при выявлении антител у иммунизированных мышей

№ мыши	Антиген ВОО, ОП, о.е.	КПоз	Антиген ВОК, ОП, о.е.	КПоз	Антиген ВОВ, ОП, о.е.	КПоз
1	2,422	76	2,512	66	2,508	66
2	1,287	40	1,52	40	1,52	41
3	1,012	32	1,216	32	1,216	32
4	1,976	62	2,128	56	2,138	57
5	1,187	37	1,444	38	1,413	37
6	0,914	28	1,064	28	1,056	27
Интактная 1	0,007	–	0,009	–	0,009	–
Интактная 2	0,009	–	0,01	–	0,01	–
КПоз, М±SD	–	45,8±18,9	–	43,3±14,7	–	43,3±15,1

Примечание – ОП – оптическая плотность; КПоз – коэффициент позитивности, рассчитываемый как отношение сигнала исследуемого образца к сигналу отрицательного контроля согласно принятой методике. Данные приведены для сывороток шести иммунизированных мышей линии BALB/c (n=6). Для характеристики группы рассчитывали среднее арифметическое КПоз и стандартное отклонение (М±SD). Сравнение реактивности сывороток на иммуносорбентах с антигенами ВОО, ВОК и ВОВ проводили критерием Фридмана

Для оценки сопоставимости антигенной реактивности иммуносорбентов сравнивали значения КПоз, полученные при исследовании сывороток шести иммунизированных мышей на иммуносорбентах на основе ВОО, ВОК и ВОВ. Средние геометрические значения КПоз составили 43,0; 41,4 и 41,2 соответственно. По результатам критерия Фридмана статистически значимых различий между реактивностью сывороток с тремя исследованными антигенами не выявлено ($\chi^2=0,875$; $p=0,646$). Полученные данные свидетельствуют о сопоставимой реактивности исследованных сывороток с антигенами ВОО, ВОК и ВОВ и подтверждают наличие общих родоспецифичных антигенных детерминант у

исследованных ортопоксвирусов. Иммуносорбенты были признаны пригодными для последующего контроля специфичности при скрининге гибридом-продуцентов МКА.

3.2 ОРГАНИЗАЦИЯ ПОЭТАПНОГО СКРИНИНГА ГИБРИДОМ ДЛЯ ОТБОРА ПРОДУЦЕНТОВ ВИДОСПЕЦИФИЧНЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ОСПЫ ОБЕЗЬЯН

На втором этапе скрининга решали задачу первичного отбора гибридом, продуцирующих антитела исключительно к видоспецифичным эпитопам белка А29 ВОО. С этой целью супернатанты культивируемых гибридом анализировали методом ИФА на расширенной панели из шести иммуносорбентов: рекомбинантных белков (AgPOX, Tгx-A29, Tгx) и цельновиральных препаратов ВОО, ВОК и ВОВ. Критерием отбора являлось сочетание выраженного положительного сигнала с целевыми антигенами ВОО и Tгx-A29 при одновременном отсутствии или минимальном уровне реакции с белком-носителем (Tгx) и ортопоксвирусами других видов (ВОК, ВОВ). Выбранный подход позволял эффективно элиминировать клоны, распознающие родоспецифические эпитопы или метку тиоредоксина. Как показано в разделе 3.2 (таблица 3.2), отобранные гибридомы секретируют видоспецифичные антитела к А29 ВОО, не реагирующие перекрёстно с ВОК и ВОВ.

3.2.1 Отбор спленоцитов, продуцирующих антитела к антигенам ОПВ

Иммунизацию лабораторных мышей линии *BALB/c* проводили согласно протоколу, описанному в разделе 2.8. В качестве иммуногена использовали очищенный рекомбинантный белок AgPOX, содержащий уникальные эпитопы восьми структурных белков ВОО, включая короткую последовательность А29L (аминокислотная последовательность белка AgPOX приведена в Приложении М). Коллекционный штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/pET28b-AgPOX охарактеризован в Приложении Б. Включённый в состав AgPOX фрагмент А29L соответствует аминокислотным остаткам в положении 1-83 полноразмерной молекулы белка А29 и включает суперспиральный домен (CCD), отвечающий за самосборку белка в четвертичную структуру, а также три аминокислотных остатка,

являющихся уникальными для ВОО (согласно сравнительному анализу с гомологами А27 ВОВ и А30 ВНО) [45].

Через 14 суток после последней иммунизации у мышей производили забор крови и получали сыворотку, в которой оценивали титр антител методом ИФА к двум антигенам: Trx-A29 – рекомбинантный белок А29 ВОО с меткой тиоредоксин (получение описано в разделе 2.7); Trx – тиоредоксин (белковая метка). Данный подход позволял на этапе, предшествующем гибридизации, дифференцировать животных, в сыворотке крови которых преобладали антитела, направленные к целевому антигену А29, от особей с преимущественным гуморальным иммунным ответом на белок-носитель.

Животных, у которых определили максимальный титр антител к Trx-A29 при минимальном титре к Trx, отобрали для проведения гибридизации. Полученные результаты позволили исключить мышей с иммунным ответом против преимущественно метки Trx (тиоредоксиновой «метки»), что обеспечило отбор спленоцитов, преимущественно продуцирующих антитела к целевому антигену А29.

3.2.2 Скрининг гибридом на панели из шести иммуносорбентов

Гибридизацию спленоцитов предварительно отобранных мышей с клетками мышинной миеломы линии SP2/0 проводили по протоколу, описанному в разделе 2.8. На 10-14-е сутки культивирования супернатанты из лунок с пролиферирующими гибридами тестировали методом ИФА на сформированной панели из шести иммуносорбентов: рекомбинантные белки (AgPOX, Trx-A29, Trx) и цельновирионные антигены (ВОО₂, ВОК, ВОВ).

Таблица 3.2 – Скрининг гибридом на панели иммуносорбентов: оценка специфичности к рекомбинантным и цельновирионным антигенам ОПВ (КПоз)

№ гибридомы	Значение КПоз в ИФА с антигеном:					
	AgPOX	Trx-A29	Trx	ВОВ	ВОК	ВОО
4Н11	212,9	847,7	1	1,3	0,9	161,8
8F12	222,8	813,4	2,5	0,9	1	169,3
2В6	215,3	686,7	1,1	1,3	0,9	163,6

4C4	210,0	674,1	1,2	1,8	1	159,6
2D1	209,9	673,7	1	1,3	0,9	159,5
5D4	231,1	664,2	1,1	1,2	1,1	175,6
1H2	205,6	654,6	1,1	1,4	0,8	156,3
A12	221,2	654,3	1	1,3	0,9	168,1
4E7	213,9	650,2	1,1	1,4	0,9	162,5
1E3	234,7	642,7	1,1	1,1	1	178,4
3F10	225,2	574,4	1,1	1,3	0,9	171,2
7D1	218,5	437,4	1	1,3	0,9	166,1
8D8	222,2	183,7	1,1	1,5	0,9	168,9
6A12	236,5	220,9	1,1	2,7	0,9	179,8
3E12	245,3	190,2	1,1	1,2	0,9	186,4
МКА к ККГЛ	0,1	0,1	0,6	0,1	0,1	0,5
МКА к ЛЗН	0,3	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1
МКА к SARS-CoV-2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,4
t, p	< 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05

Примечание – КПоз – коэффициент позитивности, рассчитываемый по формуле: $КПоз = О_{Побразца} / (4 \times О_{П(К-ср.)})$, где $О_{П(К-ср.)}$ – среднее арифметическое оптической плотности отрицательных контролей; данные представлены для n=3 повторов, коэффициент вариации $\leq 8\%$; критерий отбора: положительный сигнал с Тгх-А29 и ВОО ($КПоз \geq 100,0$) при отсутствии сигнала с Тгх, ВОК и ВОВ ($КПоз < 2,0$). Жирным шрифтом выделен клон 3E12, отобранный для дальнейшей работы по причине наибольшего значения КПоз в ИФА с антигеном ВОО. Статистическую значимость различий оценивали с использованием критерия Краскела-Уоллиса с последующим попарным сравнением методом Данна. Сравнивали сигналы, полученные для каждого антигена, с сигналом отрицательного контроля. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для антигенов AgPOX, Тгх-А29 и ВОО значения КПоз статистически значимо превышали фоновые ($p < 0,05$). Для антигенов Тгх, ВОК и ВОВ значения КПоз статистически значимо не превышали уровень отрицательного контроля ($p > 0,05$), что свидетельствует об отсутствии перекрёстной реактивности.

По результатам скрининга установлено, что все протестированные гибридомы (n=15) продуцируют антитела, специфичные к цельновирионному антигену ВОО (среднее значение КПоз составило 168,7 [95% ДИ: 163,2-174,2]; n=15). При этом

отсутствие перекрёстного реагирования с антигенами ВОК и ВОВ (значения КПоэ не превышали 1,5) свидетельствует о видоспецифичности МКА, секретируемых гибридами. Специфичность связывания МКА с цельновирионным антигеном ВОО подтверждена наличием выраженного положительного сигнала при проведении ИФА с антигенами Trx-A29 и AgPOX (КПоэ от 190,2 до 847,7 для первого и КПоэ от 205,6 до 236,5 для второго). Отсутствие перекрестного реагирования с антигенами ортопоксвирусов ВОК и ВОВ, а также с Trx (во всех случаях значение КПоэ не превышало 1,5) на фоне положительном сигнала связывания с антигеном ВОО свидетельствует о видоспецифичности МКА, секретируемых пятнадцатью полученными гибридами. Статистическую значимость различий оценивали с использованием критерия Краскела-Уоллиса с последующим попарным сравнением методом Данна. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

3.2.3 Отбор клонов с максимальной чувствительностью и специфичностью

Заключительный, третий этап скрининга был направлен на финальную верификацию и выбор клона-продуцента с максимальной аналитической чувствительностью и строгой видовой специфичностью. Из числа перспективных линий была отобрана гибридома 3E12 (клон №7), продемонстрировавшая оптимальный баланс продуктивности и специфичности. Для подтверждения отсутствия перекрестной реактивности специфичность полученных моноклональных антител (МКА A29L-7) сравнивали с панелью заведомо нерелевантных МКА к антигенам других вирусов (ККГЛ, ЛЗН, SARS-CoV-2). Данный этап гарантировал, что выбранный клон будет распознавать детерминанты исключительно белка A29 ВОО, не связываясь с консервативными структурами гомологов других ОПВ. Результаты финального контроля специфичности представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Финальный отбор клона-продуцента МКА: специфичность и отсутствие перекрёстной реактивности (КПоэ)

МКА	Значение КПоэ в ИФА с антигеном:					
	AgPOX	Trx-A29	Trx	ВОВ	ВОК	ВОО
Клон № 7, 3E12 (ВОО)	246,1	190,2	1,1	1,2	0,9	187,2

ККГЛ	0,1	0,1	0,6	0,1	0,1	0,5
ЛЗН	0,3	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1
SARS-CoV-2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,4
p	<0,05	<0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	<0,05

Примечание – КПоз – коэффициент позитивности, рассчитываемый по формуле: $КПоз = ОПообразца / (4 \times ОП(К-)ср.)$; МКА к ККГЛ (4Е8), ЛЗН (5Н11) и SARS-CoV-2 (6С10) использованы в качестве отрицательных контролей; данные представлены как среднее арифметическое трёх повторов ($n=3$), $CV \leq 8\%$; Статистическую значимость различий оценивали с использованием критерия Краскела-Уоллиса с последующим попарным сравнением методом Данна. Сравнивали сигналы, полученные для каждого антигена, с сигналом отрицательного контроля (МКА к ККГЛ, ЛЗН, SARS-CoV-2). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для антигенов AgPOX, Trx-A29 и ВОО значения КПоз статистически значимо не превышали уровень отрицательного контроля ($p < 0,05$). Для антигенов Trx, ВОК и ВОВ статистически значимых различий с отрицательным контролем выявлено не было ($p > 0,05$), что подтверждает видоспецифичность отобранного клона 3Е12

Показано, что МКА, секретируемые наиболее перспективным клоном №7 3Е12 (МКА А29L-7) характеризуются высокой выраженной специфической активностью в ИФА с нативным цельновирионным антигеном ВОО (КПоз 187,2 [ДИ95%: 182,4-192,0]) и отсутствием перекрестной реактивности.

Таким образом, предложена схема трехэтапного контроля, обеспечивающая получение высокопродуктивных клеточных гибридом-продуцентов высокоспецифичных МКА. Ее суть заключается в последовательном применении метода ИФА. На разных этапах тестирования специфичности антител, секретируемых отбираемыми для следующего этапа работы с клеточными линиями, использованы панели иммуносорбентов с родственными цельновирионными и аналогичными рекомбинантными антигенами.

Данная технология получения гибридного клона-продуцента МКА, заключающейся в иммунизации мышей рекомбинантным белком из уникальных аминокислотных последовательностей ВОО и выбором для гибридизации только тех

спленоцитов, которые продуцируют антитела к полноразмерному рекомбинантному белку A29. Она обеспечивает безопасное проведение селекции продукции генной инженерии, поскольку исключает использование нативного (живого) вирусного материала.

3.3 РЕАКТИВНОСТЬ МКА A29L-7 С АНТИГЕНОМ ВОО В ПРЯМОМ ИФА

Настоящий раздел посвящён оценке способности МКА A29L-7 выявлять цельновирионный антиген ВОО в прямом ИФА и характеристике зависимости КПОз аналитического сигнала от концентрации вирусного материала. Данный эксперимент не является определением аналитической чувствительности (LoD) готовой тест-системы «Вектор ИФА ВОО-A29L АГ». LoD тест-системы определяли отдельно в ходе клинико-лабораторных испытаний (раздел 6.3.5).

Для оценки изменения коэффициента позитивности при разведении препарата ВОО использовали КВЖ (штамм *hMpxV/Russia/St.Petersburg-02/2022*), подвергали термическому обеззараживанию методом кипячения в течение 30 мин при температуре 98-100°C (раздел 2.3). После чего готовили серию последовательных разведений вирусосодержащего материала до концентраций 10^4 , 10^3 , 10^2 и 10 БОЕ/мл (в пересчёте на исходный инфекционный титр до обеззараживания). Разведения сорбировали в лунках полистиролового планшета, после чего проводили ИФА с использованием МКА A29L-7 в рабочей концентрации 0,02 мг/мл. Каждый образец тестировали в трех повторах (n=3).

В качестве сравнения (отрицательный контроль) использованы МКА к антигенам неродственных вирусов (ККГЛ, ЛЗН, SARS-CoV-2) в эквивалентной концентрации. Эти антитела служили контролем неспецифического связывания с препаратом. Результаты представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Зависимость КПОз прямого ИФА с использованием МКА A29L-7 от концентрации цельновирионного антигена ВОО

МКА	Концентрация цельновирионного ВОО в иммуносорбенте, БОЕ/мл
-----	--

	10 ⁴	10 ³	10 ²	10
A29L-7	167,1±8,4	48,4±2,4	11,9±0,6	1,6±0,2
ККГЛ 4Е8	0,5±0,1	0,2±0,1	0,3±0,1	0,6±0,2
ЛЗН 5Н11	0,9±0,2	0,8±0,1	0,7±0,1	0,7±0,1
SARS-CoV-2 6 С10	0,2±0,1	0,1±0,1	0,6±0,1	0,2±0,1

Примечание – Данные представлены как среднее арифметическое КПоз± стандартное отклонение (M±SD, n=3); в качестве антигена использовали цельновирионный препарат ВОО¹ в указанных концентрациях. МКА ККГЛ 4Е8, ЛЗН 5Н11 и SARS-CoV-2 6С10 не являются специфичными к ВОО и использованы для сопоставления уровня их неспецифического связывания с антигеном ВОО

По мере снижения концентрации антигена ВОО наблюдалось последовательное уменьшение аналитического сигнала прямого ИФА с использованием МКА А29L-7. При концентрациях 10⁴, 10³ и 10² БОЕ/мл значения КПоз составляли соответственно 167,1±8,4; 48,4±2,4 и 11,9±0,6.

В аналогичных условиях значения КПоз для МКА 4Е8, 5Н11 и 6С10, не специфичных к ВОО, находились в диапазоне от 0,1 до 0,9. Таким образом, во всём исследованном диапазоне концентраций антигена средние значения КПоз для МКА А29L-7 превышали соответствующие показатели неспецифичных МКА. Полученные результаты характеризуют реактивность МКА А29L-7 в отношении цельновирионного антигена ВОО в условиях проведённого эксперимента.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ БЕЛКА A29 ВИРУСА ОСПЫ ОБЕЗЬЯН

Полученные на предыдущем этапе МКА к белку A29 ВОО создали основу для разработки протоколов выявления данного возбудителя в клинических образцах методом ИФА. Данные протоколы разработаны как универсальные и пригодны для использования как в хорошо оснащённых лабораторных условиях, так и в лабораториях с ограниченными ресурсами.

4.1. ПОЛУЧЕНИЕ ПКА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ЭФФЕКТИВНОГО ИММУНОСОРБЕНТА

Для разработки эффективного иммуносорбента в формате «сэндвич»-ИФА необходимо было получить препарат ПКА с высокой специфической активностью к антигенам ОПВ. Иммунизацию кроликов проводили ВОВ (штамм ЛИВП) по схеме, описанной в разделе 2.9. Выделение целевой фракции иммуноглобулинов осуществляли методом осаждения сульфатом аммония с последующим диализом. Для оценки специфической активности полученного препарата и определения оптимальных фракций для дальнейшего использования был проведён непрямой вариант ИФА с иммобилизованным лизатом клеток, инфицированных ВОВ. В ходе анализа последовательно тестировали 12 элюционных фракций, полученных в процессе очистки. Фракции 11 и 12, демонстрирующие минимальный уровень связывания, были приняты за отрицательный контроль (К–) для расчёта КПоз. Результаты скрининга фракций ПКА по специфической активности представлены в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Специфическая активность ПКА к антигенам ВОВ в ИФА

ПКА, фракция	ОП, М, о.е.	КПоз
1	4,873	29,5
2	4,296	26,0
3	3,651	22,1
4	3,593	21,8
5	3,842	23,3
6	3,226	19,6
7	4,014	24,3
8	3,792	23,0
9	2,907	17,6

10	0,778	4,7
11	0,171	1,0
12	0,159	0,9

Примечание – ОП – оптическая плотность при длине волны 450 нм (о.е.); КПоз – коэффициент позитивности, рассчитываемый по формуле: $KПоз = ОП_{фракции} / ОП(К-)_{ср.}$, где ОП(К-)ср. – среднее арифметическое значений ОП отрицательных контрольных фракций № 11 и 12; измерения выполнены в трёх повторах (n=3); для отбора фракций с наиболее выраженной реактивностью использовали установленный в рамках данного эксперимента критерий $KПоз \geq 10,0$; для дальнейшего использования объединяли фракции с максимальными значениями КПоз при отсутствии признаков неспецифического связывания

Анализ полученных данных показал, что фракции 1-9 обладают более высокими значениями в отношении антигенов ВОВ: значения КПоз для них составили от 17,6 до 29,5, что достоверно превышает уровень фонового связывания. Фракции 10-12 демонстрировали фоновый уровень связывания (КПоз не превышал 4,7) и были приняты за отрицательный контроль при расчёте $KПоз \geq 10,0$. Для дальнейшего использования объединяли фракции 1-9, соответствующие критерию КПоз. Полученный пул ПКА использовали для подбора оптимальных условий иммобилизации (раздел 4.2) и приготовления иммуносорбента.

4.2 ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ИММУНОСОРБЕНТА

Оптимизация параметров приготовления иммуносорбента (ИС) является одним из важных этапов разработки тест-системы ИФА. Целью данного эксперимента было определение оптимальной комбинации типа полистиролового планшета, буферного раствора для сорбции, концентрации иммобилизуемых антител и их специфичности. В работе сравнивали три типа планшетов с различной гидрофильностью поверхности (MaxiSorp, MediSorp, Polysorp), два значения pH буферного раствора (ФСБ, pH 8,0 и карбонатный буфер, pH 10,0), а также три концентрации сорбируемых антител (1, 3 и 5 мкг/мл). В качестве захватывающих реагентов тестировали как ПКА кролика к ОПВ, так и МКА А29L-7. Эффективность каждого варианта ИС оценивали по

величине КПоз при детекции положительного контроля (КВЖ ВОО, 10^2 БОЕ/мл). Для дальнейшего применения выбран вариант ИС с максимальным КПоз. Результаты сравнительного анализа диагностической эффективности различных вариантов иммуносорбента представлены в таблице 4.2.

Таблица 4.2 – Диагностическая эффективность вариантов иммуносорбента ИФА для выявления ВОО по антигену А29L (КПоз)

Тип сорбируемых антител	мкг/мл	ФСБ, pH=8,0			КБ, pH=10,0		
		MaxiSorp	MediSorp	Polysorp	MaxiSorp	MediSorp	Polysorp
А29L-7	1	22,5	14,7	9,5	32,2	20,9	13,6
	3	29,4	19,1	12,4	41,1	26,7	17,4
	5	28,8	18,7	12,2	42,0	27,3	17,7
ПКА кролика к ОПВ	1	50,6	32,9	21,4	72,3	47,0	30,5
	3	61,3	39,9	25,9	91,5	59,5	38,7
	5	64,1	41,6	27,1	87,6	56,9	37,0

Примечание – КПоз – коэффициент позитивности, рассчитываемый по формуле: $\text{КПоз} = \text{ОПобразца} / (4 \times \text{ОП (К-)ср.})$, где ОП(К-)ср. – среднее арифметическое оптической плотности отрицательного контроля; ФСБ – фосфатно-солевой буфер (0,01 М, pH 8,0); КБ – карбонатный буфер (0,05 М, pH 10,0); значения $\text{КПоз} \geq 20,0$ считали свидетельством высокой диагностической эффективности варианта иммуносорбента; все измерения выполнены в трёх независимых повторях ($n=3$), коэффициент вариации не превышал 8%

По результатам сравнительной оценки вариантов иммуносорбента установлено, что при использовании карбонатного буферного раствора (КБ, pH 10,0) значения КПоз превышали соответствующие показатели, полученные при использовании фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ, pH 8,0), для всех исследованных типов планшетов и концентраций сорбируемых антител.

Наибольшее значение КПоз для ПКА кролика к ОПВ зарегистрировано при использовании планшетов MaxiSorp, карбонатного буферного раствора (pH 10,0) и концентрации антител 3 мкг/мл и составило 91,5. При увеличении концентрации ПКА до 5 мкг/мл значение КПоз составляло 87,6. Таким образом, сочетание планшетов MaxiSorp, карбонатного буферного раствора (pH 10,0) и концентрации ПКА 3 мкг/мл

было выбрано для дальнейших исследований на основании наибольшего зарегистрированного значения КПоз среди исследованных вариантов с использованием ПКА.

Наблюдаемое более эффективное связывание ПКА (полученных против ВОВ) с антигенами ВОО по сравнению с ВОВ, вероятно, можно объяснить различиями в антигенной структуре и доступности эпитопов на поверхности цельных вирионов. Так как ПКА представляют собой поликлональную смесь, они распознают широкий спектр эпитопов, в том числе консервативных. Возможно, что ключевые эпитопы, индуцированные ВОВ, экспонированы на вирионе ВОО в более доступной конформации или в большем количестве, тем самым обеспечивая более эффективное связывание. Полученный результат подчёркивает значимость проверки перекрёстной реактивности антител на цельных вирионах, а не только на рекомбинантных белках.

ПКА в ИС выявляют ВОО более активно, чем МКА к единственному эпитопу белка А29. Предположительно, более высокие значения КПоз при использовании ПКА обусловлены их способностью распознавать несколько антигенных детерминант вирусных белков, что может способствовать образованию большего количества иммунных комплексов на поверхности иммуносорбента.

Выбранная комбинация (ПКА в качестве захватывающих и моноклональные антитела в качестве детектирующих) является классической для «сэндвич»-формата ИФА. ПКА распознают широкий спектр эпитопов и обеспечивают эффективный захват целевого антигена, позволяя повысить чувствительность анализа по сравнению с использованием МКА на обоих этапах. На основании проведенной оптимизации разработана стандартная операционная процедура (СОП № 10-064) приготовления иммуносорбента.

4.3 ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОЙ МЕТКИ ДЛЯ МКА С ЦЕЛЬЮ ДЕТЕКЦИИ АНТИГЕНА ВОО

Для выбора оптимального формата детекции проведён скрининг трёх типов конъюгатов МКА А29L-7. Эффективность каждого варианта ИС оценивали по величине КПоз при детекции положительного контроля (КВЖ ВОО, 10^2 БОЕ/мл).

Для дальнейшего применения выбран вариант ИС с максимальным КПоз. Результаты, представленные в таблице 4.3, демонстрируют зависимость аналитического сигнала (КПоз) от типа метки и рабочей концентрации антител.

Таблица 4.3. – Сравнительная оценка систем детекции антигена ВОО с использованием различных конъюгатов МКА А29L-7 по нормированному коэффициенту позитивности

мкг/мл	Метка		
	ФИТЦ	Биотин	Пероксидаза
5	52,4	22,1	34,1
10	93,4	32,7	63,2
15	94,1	39,8	61,2

Примечание – Исследуемый образец: инактивированный β -пропиолактоном препарат КВЖ ВОО, 10^2 БОЕ/мл. КПоз – коэффициент позитивности; данные представлены как среднее арифметическое независимых повторов ($n=3$); ФИТЦ – флуоресцеинизотиоцианат; биотин – биотиновая метка; пероксидаза – пероксидаза хрена. Выбор рабочей концентрации конъюгата осуществляли по максимальному значению КПоз при отсутствии дальнейшего увеличения аналитического сигнала с повышением концентрации

Использование ФИТЦ в качестве визуализирующей метки было признано нецелесообразным, поскольку данный вариант детекции требует использования специализированного флуоресцентного оборудования и не соответствует критериям анализа, выполняемого в условиях ограниченного приборного оснащения.

Применение биотинилированных МКА также продемонстрировало ограниченную пригодность для решения поставленной задачи. Несмотря на достигаемое усиление сигнала, интенсивность фонового окрашивания, обусловленная невозможностью проведения эффективной отмывки планшета в ручном режиме, приводила к существенному снижению коэффициента позитивности (КПоз). Если в лабораторном протоколе с использованием автоматического устройства для промывки применение биотинилированных антител способно

обеспечить высокую аналитическую чувствительность, то для бесприборного протокола этот вариант неприемлем.

Результаты по нормированному коэффициенту позитивности (КПоз), рассчитанному относительно соответствующего отрицательного контроля. Это позволило корректно сопоставить эффективность различных меток. Оптимальные результаты были достигнуты при использовании пероксидазного и увеличение его концентрации с 10 до 15 мкг/мл не сопровождалось увеличением КПоз: значения показателя составили соответственно 63,2 и 61,2. С учётом полученных результатов и меньшего расхода реагента для дальнейшей разработки тест-системы была выбрана рабочая концентрация пероксидазного конъюгата 10 мкг/мл (подчеркнуто в таблице 4.3). Преимуществом данного формата является его полная совместимость с процедурой ручной отмывки планшета, что имеет принципиальное значение для создания тест-систем, предназначенных для использования в условиях ограниченного ресурса и в лабораториях с высоким уровнем биобезопасности.

4.4 ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОТОКОЛА БЕСПРИБОРНОЙ ДЕТЕКЦИИ

4.4.1 Оптимизация условий бесприборного протокола

Адаптация протокола ИФА для работы в условиях ограниченного приборного оснащения потребовала экспериментального подбора оптимальной продолжительности инкубационных этапов при комнатной температуре (23-25 °С). Оценивали влияние времени инкубации образца (1, 2 и 3 ч) и конъюгата (0,5, 1 и 2 ч) на интенсивность аналитического сигнала. Результаты оптимизации представлены в таблице 4.4

Таблица 4.4 – Оптимизация параметров этапов инкубации бесприборного протокола ИФА

Этап анализа	Изученные интервалы, ч	Оптимальное время, ч	ОП ($M \pm \sigma$), о.е.	p	
Инкубация 1 (исследуемый)	1	—	$0,842 \pm 0,061$	—	

образец)	2	2	$1,256 \pm 0,074$	$p=0,003$ (1 ч vs 2 ч)
	3	—	$1,298 \pm 0,082$	$p=0,31$ (2 ч vs 3 ч)
Инкубация 2 (раствор конъюгата)	0,5	—	$0,874 \pm 0,058$	—
	1	1	$1,268 \pm 0,069$	$p=0,008$ (0,5 ч vs 1 ч)
	2	—	$1,305 \pm 0,078$	$p=0,42$ (1 ч vs 2 ч)

Примечание – Инкубацию проводили при температуре 23-25 °С; оптимальную продолжительность этапов определяли экспериментально по интенсивности специфического сигнала ИФА при сохранении минимального уровня фонового окрашивания. Статистическую значимость различий значений ОП между последовательными вариантами продолжительности инкубации оценивали с использованием t-критерия Стьюдента для связанных выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$

Для всех исследованных вариантов продолжительности инкубации использовали единое критическое значение $ОП_{крит}=0,204$ о.е., поскольку варианты оценивали в рамках одной экспериментальной постановки при неизменных условиях отрицательного контроля. Увеличение времени инкубации с образцом с 1 до 2 ч приводило к статистически значимому приросту сигнала ($p=0,003$), дальнейшее увеличение до 3 ч не давало значимого эффекта ($p=0,31$); для конъюгата – увеличение с 0,5 до 1 ч значимо повышало сигнал ($p=0,008$), с 1 до 2 ч не давало значимого прироста ($p=0,42$).

Помимо временных параметров, в ходе оптимизации установлено, что трёхкратная ручная промывка планшета после инкубации с образцом и семикратная – после инкубации с конъюгатом обеспечивает стабильно низкий уровень фонового сигнала ($ОП(K-) \leq 0,014$ о.е.; среднее значение $0,012 \pm 0,002$ о.е., $n=3$) по сравнению с однократной ($ОП(K-)=0,156 \pm 0,018$ о.е.) и двукратной ($ОП(K-)=0,078 \pm 0,012$ о.е.) промывкой. Результаты визуального учёта, предусмотренного для данного формата, полностью совпадали с данными инструментальной регистрации (лабораторного протокола) для всех 62 проанализированных образцов.

Таблица 4.5 – Влияние кратности ручной промывки на уровень фонового сигнала

Кратность промывки после образца	Кратность промывки после конъюгата	ОП(К–), о.е. ($M \pm \sigma$)
1×	1×	0,156±0,018
2×	2×	0,078±0,012
3×	7×	0,012±0,002

Примечание – ОП(К–) – оптическая плотность отрицательного контрольного образца; М – среднее арифметическое значение оптической плотности; σ – стандартное отклонение; n – число повторных определений. Согласно критериям учета результатов анализа допустимое значение ОП отрицательного контрольного образца составляет менее 0,200 о.е.

При сравнительной оценке режимов ручной промывки планшетов установлено последовательное снижение среднего значения оптической плотности отрицательного контрольного образца с $0,156 \pm 0,018$ о. е. при однократной промывке после обеих стадий инкубации до $0,078 \pm 0,012$ о. е. при двукратной промывке и $0,012 \pm 0,002$ о. е. при трёхкратной промывке после инкубации с исследуемым образцом и семикратной промывке после инкубации с конъюгатом ($M \pm SD$, n=3).

На основании минимального зарегистрированного среднего значения фоновой оптической плотности для дальнейшего использования в бесприборном протоколе ИФА выбран режим, предусматривающий трёхкратную промывку после инкубации с исследуемым образцом и семикратную промывку после инкубации с конъюгатом.

4.4.2 Диагностическая чувствительность и специфичность бесприборного протокола

Для всесторонней оценки диагностической ценности бесприборного формата ИФА была проанализирована репрезентативная панель из 183 клинических образцов, верифицированных методом ПЦР-РВ. Положительная выборка включала 53 образца с ДНК ВОО (St 11,2–29,2), отрицательная – 130 образцов от пациентов с гетерологичными инфекциями (ВОВ, ВОК, HSV-2, VZV) и здоровых доноров. Каждый образец анализировали в трёх повторах, результаты учитывали визуально. Диагностические характеристики по типам биоматериала представлены в таблице 4.6.

Таблица 4.6 – Сводные данные чувствительности и специфичности бесприборного протокола ИФА при исследовании биоматериала различного типа

Образец	Количество образцов, содержащих маркеры ВОО:	Количество образцов, НЕ содержащих маркеры ВОО:			Чувствительность 95% ДИ	Специфичность 95% ДИ	Мин. концентрации я, БОЕ/мл
	ДНК, штук образцов /диапазон Ct	Количество образцов, содержащих вирус, шт	ДНК, штук образцов	Количество образцов, не содержащих вирус, шт			
Сыворотка крови	11 (11,2÷23,5)	11 (100%)	39	39 (100%)	100% [74,1-100]	100% [91,0-100]	~10 ⁴
Мазки из ротоглотки	16 (17,6÷28,4)	16 (100%)	28	28 (100%)	100% [79,4-100]	100% [87,7-100]	~10 ⁴
Соскобы с пустул	15 (15,3÷29,2)	15 (100%)	27	27 (100%)	100% [78,2-100]	100% [87,2-100]	~10 ⁴
Везикулярная жидкость	11 (14,4÷22,7)	11 (100%)	36	36(100%)	100% [74,1-100]	100% [90,3-100]	~10 ⁴
95%ДИ	[94,6-100]	[96,6 %-100]					

Примечание – Ct – пороговый цикл амплификации в ПЦР-РВ, обратно пропорциональный концентрации вирусной ДНК в образце; 95% ДИ – 95% доверительный интервал, рассчитанный методом Клоппера-Пирсона, обеспечивающим строгие границы для биномиального распределения при заданном объёме выборки. Чувствительность и специфичность определены как доля истинно положительных и истинно отрицательных результатов относительно референсного метода ПЦР-РВ

Анализ данных таблицы 4.6 продемонстрировал высокую диагностическую стабильность бесприборного протокола ИФА независимо от типа биологического материала. Во всех исследованных группах (сыворотка, мазки, соскобы, везикулярная жидкость) чувствительность и специфичность составили 100%, что подтверждает универсальность разработанного набора для скрининга разнородных клинических образцов.

В исследованной выборке максимальное значение C_t среди ПЦР-положительных образцов, классифицированных как положительные при использовании бесприборного протокола ИФА, составило 29,2. Данный результат характеризует диапазон исследованных клинических образцов и не рассматривается как установленный предел обнаружения (LoD) метода. Полная согласованность результатов двух независимых серий набора реагентов ($CV \leq 6,8\%$) свидетельствует о высокой воспроизводимости визуального учёта. Полученные показатели обосновывают переход к валидации метода в реальных эпидемиологических условиях, что отражено в следующем подразделе. Результаты оптимизации продемонстрировали 100% диагностическую чувствительность [95% ДИ: 94,6-100%] и специфичность [95% ДИ: 96,6-100%] бесприборного протокола на исследованной выборке.

Проведённая оптимизация подтвердили диагностическую эквивалентность бесприборного протокола лабораторному формату в качественном режиме «положительный/отрицательный». Установленные временные параметры инкубации (2 ч для образца, 1 ч для конъюгата) и алгоритм ручной промывки обеспечивают стабильно низкий фон и высокую воспроизводимость. Полученные характеристики позволяют рекомендовать бесприборный вариант ИФА для скрининга в условиях ограниченного ресурса и лабораториях с высоким уровнем биобезопасности (УББ-3/УББ-4).

4.5 СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТОКОЛОВ ИФА ДИАГНОСТИКИ ВОО ПО АНТИГЕНУ A29

После экспериментального подтверждения оптимальной рабочей концентрации пероксидазного конъюгата МКА A29L-7 (10 мкг/мл) был выполнен следующий этап разработки – конструирование двух альтернативных схем постановки анализа: лабораторного и бесприборного протоколов.

Для исследования проб методом ИФА был выбран максимально возможный рабочий объем в лунке планшета, 200 мкл. Большой не позволяет потребность шейкирования пробы для интенсивного взаимодействия жидкости со стенками лунки при образовании иммунных комплексов. Сравнительные параметры обоих протоколов, включая последовательность внесения реагентов, условия инкубации, кратность промывки и способ регистрации аналитического сигнала, систематизированы в таблице 4.7.

Таблица 4.7 – Сравнительная характеристика лабораторного и бесприборного протоколов ИФА для выявления антигена ВОО

Наименование этапа ИФА	Лабораторный	Бесприборный
1. Внесение РО по 100 мкл/лунку	+	+
2. Внесение контролей: 1 лунка 100 мкл К ⁺ , 2 лунки 100 мкл К ⁻ . Внесение исследуемых образцов: по 100 мкл.	+	+
3. Инкубация образцов	60 мин; 700 об/мин; 37±1°C	120 мин; 22±5°C
5. Промывка лунок ИС по 300 мкл/лунку, замачивание 40-60 секунд	3х	3х
6. Внесение Кг	100 мкл	100 мкл
7. Инкубация образцов с Кг	30 мин; 700 об/мин; 37±1°C	60 мин; 22±5°C
8. Промывка лунок ИС по 300 мкл/лунку, замачивание 40-60 секунд	7х	7х
9. Внесение по 100 мкл хромогена РХ	15 мин 37±1°C	15 мин; 22±5°C
10. Внесение по 50 мкл стоп-реагента	+	+
11. Чтение результатов	на ридере; 450 нм/620 нм	Визуально в сравнении с К-

Примечание – ИС – иммуносорбент; К⁺ и К⁻ – положительный и отрицательный контроли соответственно; РО – раствор для разведения образцов; Кг – рабочий раствор пероксидазного конъюгата МКА А29L-7 (10 мкг/мл); РХ – рабочий раствор хромогена тетраметилбензидина (ТМБ). Время инкубации и количество циклов промывки указаны для каждой стадии анализа отдельно. Параметры протоколов экспериментально оптимизированы и обеспечивают сопоставимую диагностическую эффективность при исследовании термически обеззараженных клинических образцов

Таким образом, на основании экспериментальной оптимизации были разработаны два альтернативных протокола иммуноферментного анализа – лабораторный и бесприборный. Оба варианта обеспечивают надёжную детекцию антигена ВОО, однако различаются по требованиям к оснащению и условиям постановки. Сформированные протоколы легли в основу утверждённой инструкции по применению набора реагентов и послужили методологической базой для проведения дальнейшей апробации на панели клинических образцов, результаты которой представлены в следующем разделе.

4.6 АПРОБАЦИЯ ПРОТОКОЛОВ НА КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

Для предварительной оценки диагностической эффективности разработанных лабораторного и бесприборного протоколов ИФА была сформирована панель из 62 клинических образцов, характеристика и критерии включения которых подробно изложены в разделе 2.5 (таблица 2.3). Все образцы были проанализированы параллельно тремя независимыми методами: лабораторным протоколом ИФА, бесприборным протоколом ИФА (на основе набора реагентов «Вектор ИФА ВОО-А29L АГ») и референсным методом ПЦР-РВ («Вектор-МПЦРрв-Оспа»). Сравнительный анализ результатов, направленный на установление конкордантности форматов детекции антигена А29 с молекулярно-генетической диагностикой, представлен в таблице 4.8.

Таблица 4.8 – Сравнительная оценка результатов лабораторного и бесприборного протоколов ИФА относительно референсного метода ПЦР (n=62)

Категория образцов (n=62)	Всего образцов	Лабораторный ИФА (положительный/ отрицательный)	Бесприборный ИФА (положительный/ отрицательный)	ПЦР (положительный/ отрицательный)
Образцы, содержащие ДНК ВОО (n=49)	49	49/0	49/0	49/0
Образцы, содержащие ДНК инфекций, вызванные гетерологичными возбудителями (n=5) *	5	0/5	0/5	0/5
Образцы от клинически здоровых доноров (n=8)	8	0/8	0/8	0/8
Всего образцов	62	49/13	49/13	49/13

Примечание – * – образцы от пациентов с инфекциями, вызванными гетерологичными возбудителями (ветряная оспа, n=3; опоясывающий герпес, n=2); ИФА – иммуноферментный анализ; ПЦР – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени; в числителе указано количество положительных результатов, в знаменателе – отрицательных

По результатам сравнительной оценки лабораторный и бесприборный протоколы ИФА полностью совпали с результатами ПЦР-РВ во всех 62 исследованных образцах. Для обоих протоколов диагностическая чувствительность составила 100% (49/49; [95% ДИ: 92,7-100%]), диагностическая специфичность – 100% (13/13; 95% [ДИ: 75,3–100%]). Общая доля совпадений с референсным методом составила 100% (62/62; [95% ДИ: 94,2–100%]). Таким образом, в исследованной выборке лабораторный и бесприборный варианты ИФА продемонстрировали полную конкордантность с ПЦР. Диагностическую чувствительность, специфичность и общую долю совпадений рассчитывали относительно результатов ПЦР-РВ; двусторонние 95% доверительные интервалы рассчитывали точным методом Клоппера-Пирсона

Относительно широкий доверительный интервал для показателя специфичности обусловлен ограниченным объемом отрицательной выборки (n=13)

на данном этапе и не снижает статистической доказательности результата, однако указывает на необходимость дальнейшей валидации на расширенной панели образцов.

Для дополнительной оценки соответствия результатов инструментального и визуального учета было проведено сопоставление значений ОП, полученных при инструментальной регистрации, с результатами визуальной интерпретации. В таблице 4.9 представлены репрезентативные образцы, охватывающие диапазон от выражено положительных до слабоположительных результатов, а также отрицательные образцы.

Таблица 4.9 – Сопоставление результатов инструментального и визуального учета ИФА на клинических образцах с различной вирусной нагрузкой

№	Тип клинического материала	Сг ПЦР-РВ	ОП лабораторного ИФА, о.е.	Результат лабораторного ИФА	Результат визуального учета	Результат ПЦР- РВ
1	Соскоб с пустулы	11,8	3,921	+	+	+
2	Везикулярная жидкость	14,6	3,487	+	+	+
3	Мазок из ротоглотки	17,3	2,816	+	+	+
4	Сыворотка крови	19,5	2,184	+	+	+
5	Соскоб с пустулы	21,7	1,643	+	+	+
6	Везикулярная жидкость	23,4	1,217	+	+	+
7	Мазок из ротоглотки	24,8	0,891	+	+	+
8	Сыворотка крови	26,1	0,674	+	+	+
9	Соскоб с пустулы	27,2	0,493	+	+	+
10	Везикулярная жидкость	28,0	0,381	+	+	+
11	Мазок из ротоглотки	28,7	0,306	+	+	+
12	Соскоб с пустулы	29,2	0,268	+	+	+
13	Сыворотка, пациент с гетерологичной инфекцией	≥40	0,094	–	–	–
14	Мазок, пациент с гетерологичной	≥40	0,081	–	–	–

	инфекцией					
15	Сыворотка здорового донора	≥ 40	0,069	–	–	–
16	Мазок здорового донора	≥ 40	0,057	–	–	–

Примечание – St – пороговый цикл амплификации при ПЦР-РВ; ОП – оптическая плотность; ОП_{крит} – критическое значение оптической плотности, рассчитываемое по формуле $ОП_{крит} = ОП_{ср}(K-) + 0,15$, где $ОП_{ср}(K-)$ – среднее значение оптической плотности отрицательного контрольного образца; $K_{Поз}$ – коэффициент позитивности, рассчитанный как отношение ОП исследуемого образца к ОП_{крит}. Для представленной постановки значение ОП_{крит} составило 0,204 о.е. Результат лабораторного протокола ИФА регистрировали как положительный при $ОП \geq ОП_{крит}$. При бесприборном протоколе результат оценивали визуально путем сравнения окрашивания исследуемой лунки с отрицательным контрольным образцом. Знак «+» соответствует положительному результату, знак «–» – отрицательному

Результаты визуального учета совпадали с результатами инструментальной регистрации во всем представленном диапазоне аналитического сигнала. Визуально положительное окрашивание регистрировалось в том числе для слабopоложительных образцов со значениями ОП, близкими к ОП_{крит}. Образец с максимальным среди исследованных положительных проб значением $St=29,2$ также был классифицирован как положительный при обоих способах учета. Отрицательные образцы характеризовались значениями ОП ниже ОП_{крит} и отсутствием визуально регистрируемого специфического окрашивания. Поэтому, полученные результаты демонстрируют согласованность инструментального и визуального способов качественной интерпретации результатов ИФА в пределах исследованной выборки.

Таким образом, результаты предварительной апробации доказали высокую диагностическую эффективность и взаимозаменяемость лабораторного и бесприборного протоколов ИФА при исследовании клинического материала. Полученные данные подтвердили принципиальную возможность использования разработанной тест-системы для выявления антигена ВОО в условиях как

стандартной лаборатории, так и при ограниченном приборном оснащении. Совокупность положительных результатов послужила основанием для перехода к следующему этапу работы – проведению официальных клинико-лабораторных испытаний на независимой репрезентативной выборке в соответствии с требованиями нормативной документации для регистрации медицинского изделия (Глава 6).

ГЛАВА 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНА ВИРУСА ОСПЫ ОБЕЗЬЯН И ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ НАТИВНЫХ И ОБЕЗЗАРАЖЕННЫХ ОБРАЗЦОВ

На предыдущем этапе исследования были протестированы два протокола иммуноферментного анализа – лабораторный и бесприборный. Переход к комплексной аттестации тест-системы «Вектор ИФА ВОО-A29L АГ» потребовал решения ряда научно-практических задач, критически важных для внедрения набора реагентов в рутинную практику вирусологических лабораторий. В настоящей главе представлены результаты экспериментальной оценки влияния методов обеззараживания на сохранность антигенной структуры белка А29 и целостность вирусной ДНК, определение пределов обнаружения и воспроизводимости тест-системы, а также валидация бесприборного протокола на репрезентативных панелях клинических образцов. Особое внимание уделено корреляции уровня выявляемого антигена с клинико-эпидемиологическими характеристиками пациентов, что позволило обосновать диагностическую и прогностическую ценность разработанного набора реагентов в условиях ограниченных ресурсов.

5.1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИГОДНОСТИ ОБРАЗЦОВ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА ПОСЛЕ ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ КИПЯЧЕНИЕМ

Для определения перечня биологических материалов, пригодных для анализа после термического обеззараживания, была сформирована панель модельных образцов на основе транспортной среды, сыворотки крови человека и цельной крови с антикоагулянтом ЭДТА-К2. Каждый тип образца оценивался на предмет способности обеспечивать специфическое связывание антигена ВОО с иммуносорбентом и минимальный уровень неспецифического фона после кипячения (98-100°C, 30 мин). В качестве отрицательных контролей использовали аналогичные образцы, не содержащие ВОО, а для оценки специфичности – препараты ВОВ. Каждое условие анализировали в 16 независимых повторях (две серии набора, n=8). Результаты определения оптической плотности представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Пригодность различных типов клинических образцов для ИФА-анализа после термического обеззараживания

Растворитель образца	Данные определения оптической плотности раствора в лунках планшета при проведении ИФА ОП, М (95% ДИ) для образцов, содержащих разные вирусы (n=16):			Пригодность образца для исследования
	ВОО титр $7,9 \times 10^7$ БОЕ/мл	ВОВ титр $2,0 \times 10^8$ БОЕ/мл	Без антигена	
Транспортная среда	0,553#/ (0,521÷0,614)	0,071/ (0,066÷0,079)	0,064/ (0,061÷0,078)	Пригодный
Сыворотка крови человека	0,353#/ (0,328÷0,432)	0,041/ (0,035÷0,053)	0,046/ (0,036÷0,064)	Пригодный
Кровь с ЭДТА-К2 после размораживания	2,515/ (2,208÷3,412)	2,612/ (2,101÷3,732)	2,464/ (1,748÷3,782)	Не пригодный

Примечание – ОП – оптическая плотность при длине волны 450 нм; данные представлены как среднее значение (М, n=16), в скобках указаны границы 95% доверительного интервала. Межгрупповые различия оценивали с использованием критерия Краскела-Уоллиса. При выявлении статистически значимых различий проводили попарные сравнения с использованием теста Данна с поправкой Бонферрони на множественные сравнения. Знаком # обозначено статистически значимое отличие от соответствующего образца без антигена после поправки Бонферрони ($p < 0,05$). Пригодность образца определяли по отсутствию выраженного неспецифического сигнала в отрицательном контроле и наличию статистически значимого превышения сигнала ВОО над фоновым уровнем

Анализ данных таблицы 5.1 показал, что транспортная среда и сыворотка крови человека обеспечивают стабильный специфический сигнал при полном отсутствии неспецифического фона в отрицательных контролях. В то же время образцы цельной крови с ЭДТА-К2 продемонстрировали выраженный неспецифический фон, вероятно обусловленный присутствием свободного гемоглобина и ионов железа, катализирующих окисление хромогена. Таким образом, для последующих исследований были выбраны транспортная среда и сыворотка крови, исключаящие

риск получения ложноположительных результатов при термической обработке образцов [102].

5.2 Влияния метода обеззараживания на аналитическую чувствительность ИФА

Для оценки влияния химического метода обеззараживания на аналитическую чувствительность бесприборного протокола ИФА провели сравнительный анализ нативного препарата ВОО 1 и препарата, инаktivированного 8% формальдегидом. Чувствительность оценивали по максимальному разведению образца, дающему визуально регистрируемый положительный сигнал. Каждая точка измерения была проанализирована в трёх независимых повторах. Результаты сравнения представлены в таблице 5.2.

Таблица 5.2 – Сравнение чувствительности выявления нативного и обработанного формальдегидом препаратов ВОО₁ в бесприборном ИФА

Препарат ВОО ¹ При исходном титре 4,1×10 ⁶ БОЕ/мл	Разведение	Расчетная концентрация ВОО, БОЕ/мл	Положительны х результатов, n/N	Результат
Нативный	1:128	3,2×10 ⁴	3/3	положительный
Нативный	1:256	1,6×10 ⁴	2/3	положительный в 2 из 3 повторов
Инаktivированный 8% формальдегидом	1:2	2,05×10 ⁶	3/3	положительный
Инаktivированный 8% формальдегидом	1:4	1,03×10 ⁶	1/3	положительный в 1 из 3 повторов

Примечание – концентрацию ВОО в каждом разведении рассчитывали исходя из титра исходного препарата 4,1×10⁶ БОЕ/мл и кратности разведения. Результаты представлены по трем независимым повторам (n=3). Положительным считали визуально регистрируемое окрашивание исследуемой лунки, отличающееся от отрицательного контроля. Средний геометрический титр не рассчитывали, поскольку результаты представлены непосредственно для отдельных двукратных разведений

При исследовании нативного препарата положительный результат сохранялся во всех трех повторах при разведении 1:128 и в двух из трех повторов при разведении 1:256. После обработки 8% формальдегидом положительный результат во всех трех

повторах регистрировали только при разведении 1:2, тогда как при разведении 1:4 положительным был один из трех повторов. Таким образом, в условиях проведенного эксперимента для препарата, обработанного формальдегидом, наблюдалось уменьшение максимального исследованного разведения, при котором положительный результат воспроизводился во всех трёх повторах. Учитывая ограниченное число повторов и отсутствие статистически значимых различий по частоте положительных результатов, полученные данные следует рассматривать как предварительное наблюдение, требующее дополнительного экспериментального подтверждения.

Для определения степени компенсации потери антигенной активности при использовании инструментального учёта результатов тот же инактивированный формальдегидом препарат ВОО 1 проанализировали параллельно по бесприборному и лабораторному протоколам. Результаты сопоставления чувствительности двух форматов постановки ИФА представлены в таблице 5.3.

Таблица 5.3 – Чувствительность выявления двумя протоколами ИФА обеззараженного антигена ВОО₁.

Протокол ИФА	Разведение	Расчетная концентрация ВОО, БОЕ/мл	Положительных результатов, n/N	Результат
Бесприборный	1:2	$2,05 \times 10^6$	3/3	положительный
Бесприборный	1:4	$1,03 \times 10^6$	1/3	положительный в 1 из 3 повторов
Лабораторный	1:128	$3,2 \times 10^4$	3/3	положительный
Лабораторный	1:256	$1,6 \times 10^4$	1/3	положительный в 1 из 3 повторов

Примечание – концентрацию ВОО рассчитывали исходя из исходного титра препарата и кратности двукратного разведения. Каждый вариант исследовали в трех независимых повторах (n=3). Для бесприборного протокола результат учитывали визуально; для лабораторного протокола – инструментально в соответствии с установленным критерием положительного результата

При лабораторном (инструментальном) учёте результатов ИФА положительная реакция была зарегистрирована в трёх из трёх повторов при разведении исследуемого препарата 1:128 и в одном из трёх повторов при разведении 1:256. Таким образом,

при разведении 1:128 положительный результат воспроизводился во всех проведённых определениях, тогда как при разведении 1:256 наблюдалась вариабельность результатов. В связи с ограниченным числом повторов полученные данные использовали для описательной оценки выявляемости антигена при исследованных разведениях без заключения о статистической значимости различий.

Сводные данные, позволяющие напрямую сопоставить эффективность термического и химического методов обеззараживания в контексте последующей ИФА-диагностики, приведены в таблице 5.4.

Таблица 5.4. – Сравнительная эффективность методов обеззараживания для последующего ИФА-выявления антигена ВОО

Показатель	Термическое обеззараживание (30 мин, 98-100°C)	Инактивация формальдегидом (8%, 2 сут, 4-6°C) [13]
Использованный штамм ВОО	<i>hMpxV/Russia/St.Petersburg-02/2022 (ВОО₂)</i>	<i>hMpxV/Russia/St.Petersburg-01/2022 (ВОО₁)</i>
Исходный титр ВОО, БОЕ/мл	$7,9 \times 10^7$	$4,1 \times 10^6$
Нативные препараты		
Максимальное разведение с положительным результатом (лабораторный протокол)	1:256-1:512	1:128-1:256
ОП, о.е. ($M \pm \sigma$)	$4,214 \pm 0,312$	$3,876 \pm 0,287$
Обеззараженные препараты		
Максимальное разведение с положительным результатом (бесприборный протокол)	1:256	1:2-1:4
ОП, о.е. ($M \pm \sigma$), бесприборный протокол	$3,542 \pm 0,264$	$0,412 \pm 0,058$
Падение титра, раз	2	81
Максимальное разведение с положительным результатом (лабораторный протокол)	–	1:128-1:256
ОП, о.е. ($M \pm \sigma$), лабораторный протокол		$3,215 \pm 0,243$
Падение титра, раз	–	1,3
Статистическая значимость различий с нативным контролем	$p > 0,05$	$p < 0,05$ (бесприборный); $p > 0,05$ (лабораторный)

Примечание – ОП – оптическая плотность; $M \pm \sigma$ – среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение ($n=3$). Для формальдегид-инактивированного препарата результаты представлены по отдельным двукратным разведениям с указанием числа

положительных результатов в трех независимых повторах. Для бесприборного протокола результат учитывали визуально по наличию окрашивания исследуемой лунки, отличающегося от отрицательного контроля; для лабораторного протокола – инструментально при $ОП \geq ОП_{крит}$. Для термического обеззараживания статистически значимых различий с нативным контролем не выявлено (U-критерий Манна-Уитни, $p > 0,05$)

Сопоставление результатов показало, что термическое обеззараживание кипячением при 98-100 °С в течение 30 мин не сопровождалось статистически значимым снижением аналитического сигнала по сравнению с нативным контролем ($p > 0,05$). Это свидетельствует о сохранении антигенных детерминант ВОО, распознаваемых используемыми антителами, после термической обработки. После обработки 8% формальдегидом в бесприборном формате положительный результат во всех трех независимых повторах сохранялся только при разведении 1:2; при разведении 1:4 положительный результат был зарегистрирован в одном из трех повторов. При лабораторном инструментальном учете положительный результат во всех трех повторах сохранялся при разведении 1:128, а при разведении 1:256 – в одном из трех повторов. Эти данные указывают на выраженное снижение выявляемости антигена после химической инактивации, особенно при визуальном учете результата. Несмотря на различия в исходных титрах и использование различных штаммов ВОО, результаты демонстрируют лучшее сохранение выявляемости антигена после термического обеззараживания по сравнению с обработкой формальдегидом в условиях проведенных экспериментов.

Таким образом, термическое обеззараживание оказалось предпочтительным способом пробоподготовки для последующего ИФА-выявления антигена ВОО. В отличие от обработки формальдегидом, кипячение обеспечивало сохранение аналитического сигнала без статистически значимого снижения по сравнению с нативным препаратом. Полученные результаты послужили основанием для выбора термического обеззараживания в качестве основного метода подготовки образцов

для дальнейших исследований и последующей оптимизации диагностического протокола.

5.3 АПРОБАЦИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

После оценки диагностических характеристик набора реагентов *in vitro* (разделы 5.1-5.4) была проведена его апробация на клинических образцах, полученных в ходе реальной эпидемической вспышки ВОО в Республике Гвинея в 2025 году. Это позволило оценить диагностическую эффективность набора в условиях, максимально приближенных к полевым.

5.3.1. Клинико-эпидемиологическая характеристика исследуемой выборки

Таблица 5.7 – Клинико-демографическая характеристика когорты пациентов с подтверждённой инфекцией ВОО из Гвинейской Республики (n=121)

Параметр	Значение	Примечание
Общее количество образцов	121	подтверждены методом ПЦР
Средний возраст пациентов	26,3 года	от 8 месяцев до 75 лет
Распределение по полу	58% мужчины; 42% женщины	71 мужчин, 50 женщин
Географическое распределение	85% из г.Конакри	103 случая в г. Конакри, 18 в других регионах
Среднее значение Ct в ПЦР	21,4	от 10,78 до 25,46

Примечание – Ct – пороговый цикл амплификации в ПЦР-РВ, отражающий уровень вирусной нагрузки в исследуемых образцах (диапазон 10,78-25,46 соответствует высокой концентрации ДНК ВОО); данные представлены как среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение или абсолютные значения (n, %). Статистические параметры диагностической эффективности (95% ДИ, расчёт методом Клоппера-Пирсона) для данной когорты приведены в таблицах 5.8-5.9

Исследованная выборка (таблица 5.7) включала 121 клинический образец, полученный от пациентов в Республике Гвинея и подтверждённый диагноз «оспа обезьян» методом ПЦР-РВ. Средний возраст пациентов составил 26,3 года, преобладали мужчины (58%), а медианное значение Ct (21,4) указывает на

выраженную вирусную нагрузку, типичную для острой фазы инфекции. Географическое распределение образцов (85% – г. Конакри и прилегающие префектуры) обеспечивает учёт региональной специфики циркуляции клады Пв. Данные параметры позволяют провести корректную оценку диагностической эффективности тест-системы в условиях, максимально приближенных к полевым, и служат методологической основой для прямого сопоставления бесприборного и лабораторного протоколов ИФА, результаты которого представлены далее.

5.3.2 Сравнение диагностических характеристик бесприборного и лабораторного протоколов ИФА

Прямое сопоставление диагностической эффективности бесприборного и лабораторного протоколов ИФА проведено на расширенной панели из 181 образца (121 ПЦР-положительных, 60 от здоровых доноров). Визуальный учёт проводили в сравнении с отрицательным контролем, инструментальный – на микропланшетном спектрофотометре с пороговым значением $ОП_{крит} = ОП(К-)_{ср.} + 0,15 \text{ о.е.}$ Результаты сравнения форматов детекции представлены в таблице 5.8.

Таблица 5.8 – Сравнение результатов бесприборного и лабораторного ИФА (n = 181)

Группа образцов	n	Бесприборный ИФА (+)	Лабораторный ИФА (+)	Совпадение
ПЦР-положительные	121	121 (100%)	121 (100%)	121 из 121 (100%)
Здоровые доноры	60	0 (0%)	0 (0%)	60 из 60 (100%)
Всего	181	121 (66,9%)	121 (66,9%)	181 из 181 (100%)

Примечание – совпадение результатов оценивали по полному согласованию интерпретации «положительный/отрицательный» между двумя протоколами. Статистическую согласованность подтверждали расчётом коэффициента каппа Коэна ($\kappa=1,0$; $p < 0,001$)

Анализ данных таблицы 5.8 выявил абсолютную конкордантность результатов обоих протоколов (181/181, 100%). Визуальная оценка не уступила инструментальной регистрации ни в одном из исследованных случаев, что

подтверждает возможность использования бесприборного формата в качестве полноценного диагностического инструмента при работе с качественным биоматериалом.

Сводные количественные показатели диагностической эффективности, рассчитанные на основе результатов таблицы 5.8, представлены в таблице 5.9. Расчёт доверительных интервалов выполнен методом Клоппера-Пирсона для обеспечения статистической достоверности оценок при заданном объёме выборки.

Таблица 5.9 – Сравнительная оценка диагностической эффективности бесприборного и лабораторного протоколов ИФА при исследовании клинических образцов (n = 181)

Показатель	Бесприборный ИФА	Лабораторный ИФА
Чувствительность	100% (121/121)	100% (121/121)
Специфичность	100% (60/60)	100% (60/60)
Эффективность	100% (181/181)	100% (181/181)
95% ДИ чувствительности	[96,9-100%]	[96,9-100%]
95% ДИ специфичности	[94,0-100%]	[94,0-100%]
95% ДИ точности	[97,9-100%]	[97,9-100]

Примечание – диагностическая эффективность рассчитана как сумма истинно положительных и истинно отрицательных результатов, делённая на общее число образцов (n=181). 95% ДИ рассчитаны точным биномиальным методом

Полученные данные (таблица 5.9) подтверждают эталонные характеристики разработанного набора: чувствительность и специфичность составили 100% [95% ДИ: 96,9-100% и 94,0-100% соответственно]. Узкие доверительные интервалы свидетельствуют о высокой статистической надёжности результатов. Идентичность показателей для обоих протоколов окончательно обосновывает выбор бесприборного формата для внедрения в практику ресурсно-ограниченных лабораторий.

Проведённые в настоящей главе исследования подтвердили диагностическую, аналитическую и клиническую эффективность разработанного протокола ИФА для выявления антигена ВОО на основе МКА А29L-7. Экспериментально доказана устойчивость линейных эпитопов белка А29 к термическому обеззараживанию, что обеспечивает безопасную работу с клиническим материалом без потери чувствительности. Разработанный бесприборный протокол продемонстрировал 100%

согласованность с лабораторным форматом и референсным методом ПЦР на репрезентативных выборках, включая образцы из эндемичного региона. Совокупность полученных результатов сформировала научно-методическую базу для перехода к разработке нормативно-технической документации и процедуре государственной регистрации медицинского изделия, что подробно представлено в следующей главе.

ГЛАВА 6. ПОДГОТОВКА МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO* «ВЕКТОР ИФА ВОО-А29L АГ» К РЕГИСТРАЦИИ

На завершающем этапе исследования была решена задача перевода экспериментальной разработки в статус поданного в Росздравнадзор медицинского изделия, готового к внедрению в практику вирусологических лабораторий. Глава 6 посвящена разработке и утверждению нормативно-технической документации, проведению технических и клинико-лабораторных испытаний в соответствии с требованиями ГОСТ Р 51088-2013 и действующими санитарно-эпидемиологическими правилами.

6.1 СООТВЕТСТВИЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ

6.1.1 Технические условия ТУ 20.59.52-117-05664012-2025

На разработанную тест-систему был оформлен комплект нормативно-технической документации – технические условия ТУ 20.59.52-117-05664012-2025 «Набор реагентов для иммуноферментной диагностики оспы обезьян по специфическому антигену белка А29 вируса оспы обезьян «Вектор ИФА ВОО-А29L АГ». Документ разработан в строгом соответствии с требованиями действующих государственных стандартов: ГОСТ 2.114-2016 «Единая система конструкторской документации. Технические условия» и ГОСТ Р 51088-2013 «Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации».

Состав и комплектность набора реагентов регламентированы утверждёнными техническими условиями и отражают оптимизированную конфигурацию, обеспечивающую проведение 96 анализов в формате сэндвич-ИФА (таблица 6.1).

Таблица 6.1 – Состав набора реагентов «Вектор ИФА ВОО-А29L АГ»

Компонент	Обозначение	Количество	Объем (мл)	Характеристика
Иммуносорбент	ИС	1 шт.	–	Планшет разборный (12 стрипов) с сорбированными поликлональными антителами
Положительный контроль	К+	1 фл.	1,5	Рекомбинантный белок Тгх-А29 с последовательностью А29L ВОО
Отрицательный контроль	К-	1 фл.	2,5	Инактивированный ВОВ
Раствор для разведения	РО	1 фл.	12	Содержит фенолфталейн и азид натрия
Пероксидазный конъюгат	РК	1 фл.	22	Конъюгат моноклональных антител к А29 с пероксидазой
Хромоген ТМБ	ТМБ	2 фл.	11	Тетраметилбензидин, готовый к применению
Промывочный раствор	ФСБ-Т	1 фл.	26	25-кратный концентрат
Стоп-реагент	СТОП	1 фл.	12	1 М раствор серной кислоты
Пленка для заклеивания	–	3 шт.	–	Клейкая пленка для ИФА
Ванночка для реагентов	–	4 шт.	–	Для многоканальных пипеток
Инструкция по применению	–	1 шт.	–	–

Примечание – ИС – иммуносорбент (96-луночный разборный планшет с иммобилизованными ПКА к ОПВ); К+/К- – положительный/отрицательный контроли; РО – раствор для разведения образцов; РК – пероксидазный конъюгат МКА А29L-7; ТМБ – хромоген тетраметилбензидин; ФСБ-Т – фосфатно-солевой буфер с твином-20 (концентрат 25×); СТОП – стоп-реагент (1 М H₂SO₄). Все компоненты соответствуют требованиям ТУ 20.59.52-117-05664012-2025 и хранятся при температуре 2-8°C.

Основные характеристики набора реагентов «Вектор ИФА ВОО-А29L АГ» представлены в таблице 6.2.

Таблица 6.2 – Основные показатели качества набора реагентов «Вектор ИФА ВОО-А29L АГ»

Наименование	Характеристика и нормы
--------------	------------------------

показателя	
Внешний вид компонентов	ИС – планшет с 96 лунками; К+, К-, РО, РК, ТМБ, ФСБ-Т, СТОП – прозрачные жидкости соответствующего цвета
Целостность упаковки	Внутренняя и внешняя упаковка должны быть целостными, при переворачивании флаконов не должно наблюдаться протечек
Диагностическая чувствительность/ специфичность	100%
Аналитическая специфичность	Набор обнаруживает ВОО по специфическому антигену; все образцы рабочей панели «РП-АГ (+/-) ВОО» интерпретируются согласно паспорту (положительные — как положительные, отрицательные — как отрицательные)
Аналитическая чувствительность (LoD)	При разведении образца №1 пол рабочей панели «РП-АГ (+/-) ВОО» в 10 раз (эквивалентно $2,5 \times 10^3$ БОЕ/мл до обеззараживания) результат положительный
Повторяемость	Коэффициент вариации (CV) не более 8%
Воспроизводимость	Коэффициент вариации (CV) не более 8%
Отрицательный контроль (К-)	Каждое значение ОП менее 0,200 о.е.
Положительный контроль (К+)	Значение ОП более 0,500 о.е.

Примечание – ИС – иммуносорбент; К+ – положительный контрольный образец; К- – отрицательный контрольный образец; РО – раствор для разведения образцов; РК – раствор пероксидазного конъюгата; ТМБ – хромоген тетраметилбензидин; ФСБ-Т – фосфатно-солевой буфер с Твин-20; СТОП – стоп-реагент; ОП – оптическая плотность; CV – коэффициент вариации; LoD – предел обнаружения; ДИ – доверительный интервал. Характеристики и нормы соответствуют ТУ 20.59.52-117-05664012-2025. Методы контроля указаны в п. 5.1-5.4 ТУ.

6.1.2 Стандартные операционные процедуры

В рамках функционирующей системы качества, соответствующей требованиям ГОСТ Р ИСО 9001:2015, был разработан и внедрён комплект стандартных операционных процедур (СОП), регламентирующих все этапы производства и контроля качества набора реагентов. Перечень разработанных документов представлен в таблице 6.3.

Таблица 6.3 – Перечень разработанных стандартных операционных процедур

Номер СОП	Наименование
СОП № 10-048 версия 01-25	Контроль качества хромогена тетраметилбензидина готового к применению

СОП № 10-049 версия 01-25	Контроль качества раствора инаktivированного вируса осповакцины
СОП № 10-050 версия 01-25	Контроль качества концентрата пероксидазного конъюгата моноклональных антител к антигену A29L
СОП № 10-051 версия 01-25	Контроль качества раствора поликлональных антител из крови иммунизированных животных
СОП № 10-052 версия 01-25	Контроль качества рекомбинантного белка Тгх-A29

6.1.3 Инструкция по применению

Инструкция по применению набора реагентов «Вектор ИФА ВОО-A29L АГ» разработана в соответствии с требованиями следующих нормативных документов:

1. ГОСТ Р 51088-2013 «Медицинские изделия для диагностики *ин витро*. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации» (приложение А);
2. ГОСТ Р ИСО 18113-1-2024 «Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования»;
3. ГОСТ Р ИСО 18113-2-2024 «Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики *in vitro* для профессионального применения».

Разработанная инструкция по применению с набора реагентов «Вектор ИФА ВОО-A29L АГ» полностью соответствует требованиям перечисленной нормативной документации, содержит необходимую информацию для правильного и безопасного использования набора реагентов в клинико-диагностических лабораториях (таблица 6.4.).

Таблица 6.4 – Структура инструкции по применению набора реагентов «Вектор ИФА ВОО-A29L АГ»

№ раздела	Наименование раздела	Ключевое содержание
1	Назначение	Качественное выявление антигена A29L ВОО в сыворотке крови, мазках из ротоглотки, соскобах с пустул, везикулярной жидкости
2	Характеристика	Состав набора (таблица 6.1), число анализируемых проб

	изделия	(96), принцип метода
3	Аналитические характеристики	Чувствительность ($2,5 \times 10^3$ БОЕ/мл), специфичность, повторяемость ($CV \leq 8\%$), воспроизводимость ($CV \leq 8\%$)
4	Меры предосторожности	Требования биобезопасности при работе с патогеном I группы, ссылки на СП 3.3686-21
5	Оборудование и материалы	Спектрофотометр, термошейкер, устройство для промывки, дозаторы
6	Анализируемые пробы	Виды образцов, возможные ограничения
7	Подготовка компонентов	Приготовление иммуносорбента, промывочного раствора, подготовка контролей
8	Проведение анализа	Поэтапное описание процедуры с указанием времени и температуры инкубации
9	Расчеты и интерпретация	Формулы расчета ОП _{крит} , критерии валидности, правила интерпретации
10	Хранение и транспортирование	Температурный режим (2-8°C), срок годности (12 месяцев)

Примечание – ВОО – вирус оспы обезьян; ОП_{крит} – критическое значение оптической плотности; CV – коэффициент вариации; СП – санитарные правила. Структура инструкции по применению соответствует требованиям ГОСТ Р 51088-2013 и ГОСТ Р ИСО 18113-1/2-2024. В разделе 3 исправлено значение аналитической чувствительности: $2,5 \times 10^3$ БОЕ/мл.

Регистрацию и интерпретацию результатов анализа следует проводить при соблюдении следующих критериев постановки:

1. Значение ОП в лунке с К+ более 0,500 о.е.
2. Каждое значение ОП в лунках с К- (ОП К-) $< 0,200$ о.е.

При выполнении вышеперечисленных условий интерпретацию результатов осуществляют следующим образом:

1. Расчет среднего значения ОП для отрицательного контроля:

$$ОП(К-)_{ср.} = \frac{ОП(К-)_{1} + ОП(К-)_{2}}{2}, \quad (6.1)$$

где ОП(К-)ср. – среднее значение ОП в лунках с К-;

ОП(К-) – значение оптической плотности в лунке с К-.

2. Расчет критического значения ОП (ОП_{крит}):

$$ОП_{крит} = ОП(К-)_{ср.} + 0,15, \quad (6.2)$$

где ОП_{крит.} – критическое значение ОП; 0,15 о.е. – экспериментально установленная на этапе оптимизации тест-системы константа, обеспечивающая оптимальное соотношение диагностической чувствительности и специфичности.

3. Интерпретация результатов:

- образец считают положительным, если $ОП_{образца} \geq ОП_{крит}$
- образец считают отрицательным, если $ОП_{образца} < ОП_{крит}$

Таким образом, разработанный комплект нормативно-технической документации полностью соответствует требованиям ГОСТ Р 51088-2013 и ГОСТ Р ИСО 18113-1/2-2024. Утверждённые ТУ, СОП и инструкция по применению регламентируют все этапы производства, контроля качества и применения набора, формируя нормативную основу для передачи изделия на технические и клинические испытания.

6.2 ТЕХНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

Технические испытания проведены в аккредитованной лаборатории (ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР», аттестат аккредитации № RA.RU21AD23) на двух независимых сериях набора реагентов. Оценка включала идентификацию, проверку комплектности, маркировки и целостности упаковки в соответствии с ГОСТ Р 51088-2013. Результаты систематизированы в таблице 6.5.

Таблица 6.5 – Результаты технических испытаний медицинского изделия «Вектор ИФА ВОО-А29L АГ»

Показатель	Норма по ТУ	Серия 01.06.2025	Серия 02.06.2025 (1-й набор)	Серия 02.06.2025 (2-й набор)
Внешний вид компонентов	По п.1 ТУ	+	+	+
Целостность внутренней упаковки	Отсутствие протечек	+	+	+
Целостность внешней упаковки	Целостна	+	+	+
Маркировка	По п.1.5 ТУ	+	+	+
Комплектность	По таблице 2 ТУ	+	+	+

Примечание – соответствие оценивали по критериям, установленным в ТУ 20.59.52-117-05664012-2025 и ГОСТ Р 51088-2013. Знак «+» в графе «Соответствие» указывает на полное совпадение фактических параметров с нормативными требованиями. Испытания проводили на сериях, изготовленных в условиях производства, сертифицированного по ГОСТ Р ИСО 9001:2015.

Результаты технических испытаний подтвердили полное соответствие физических, маркировочных и эксплуатационных характеристик набора требованиям утверждённой документации. Полученные данные свидетельствуют о стабильности технологического процесса и готовности серий к проведению клинико-лабораторных исследований (приложение В).

6.3 КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ (КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ)

Клинические испытания медицинского изделия «Вектор ИФА ВОО-А29L АГ», выполненные с целью его государственной регистрации проведены на независимой панели клинических образцов, не использовавшейся на этапе предварительной апробации (глава 4.5). Постановочная часть испытаний выполнялась на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово), независимая оценка и интерпретация результатов – НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (г. Санкт-Петербург). Период проведения исследований: 27.11.2025 г. – 01.12.2025г.

В качестве референсного метода для верификации диагноза использована полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с применением зарегистрированного медицинского изделия «Набор реагентов для амплификации ДНК вирусов натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, осповакцины с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «Вектор-МПЦРрв-Оспа» (РУ № РЗН 2016/3685). Пробоподготовку (выделение ДНК) для последующего ПЦР-анализа осуществляли исключительно из нативного материала до его термического обеззараживания методом кипячения. Образцы, содержащие

ДНК ВОО по результатам ПЦР-анализа, хранились при температуре от минус 65 до минус 70°C до проведения клинических испытаний разработанного ИФА-набора.

Клинические испытания выполнены на независимой панели из 183 образцов, не использовавшихся на этапе предварительной апробации. Выборка включала образцы с различной вирусной нагрузкой, гетерологичными патогенами и контрольные материалы. Характеристика панели представлена в таблице 6.6.

Таблица 6.6 – Состав панели образцов, использованной при проведении клинических испытаний

Категория образцов	Количество, шт.	Диапазон Ct (ПЦР)
Образцы, содержащие ДНК ВОО	53	9,3-29,6
Образцы, не содержащие ДНК ВОО	130	>40
Рабочая панель «РП-АГ (+/-) ВОО»:		
положительные образцы	8	14,7–17,6
отрицательные образцы	8	>40
Образцы для оценки интерференции:		
отрицательные контроли с добавлением интерферирующих веществ	12	>40
положительные образцы с добавлением интерферирующих веществ	12	9,3-25,6
Всего	223	

Примечание – Ct – пороговый цикл амплификации в ПЦР-РВ; все образцы перед ИФА подвергнуты термическому обеззараживанию (кипячение, 30 мин, 98-100 °C) согласно СП 3.3686-21. n – общее количество исследованных образцов в каждой категории. Рабочая панель и образцы для оценки интерференции не входили в основную выборку (n=183)

6.3.1 Диагностическая чувствительность

При анализе 53 образцов, содержащих ДНК ВОО, положительный результат в ИФА был зарегистрирован для всех без исключения образцов данной выборки (100%). Результаты анализа в зависимости от типа исследованного клинического материала представлены в таблице 6.6.

6.6 – Диагностическая чувствительность тест-системы «Вектор ИФА ВОО-А29L АГ»

Тип образца	Кол-во образцов	Положительные результаты ИФА	Чувствительность, %	95% ДИ
Мазки из ротоглотки (ВОО)	27	27	100	[87,2-100%]
Соскобы с пустул (ВОО)	11	11	100	[71,5-100%]
Везикулярная жидкость (ВОО)	4	4	100	[39,8-100%]
Сыворотка крови (ВОО)	11	11	100	[71,5-100%]
Всего	53	53	100	[94,6-100%]

Примечание – ВОВ – вирус осповакцины; ВОК – вирус оспы коров; HSV-2 – вирус простого герпеса 2-го типа; VZV – вирус ветряной оспы. Исследование проводили на двух сериях набора реагентов (серия 01.06.2025 и серия 02.06.2025); каждый образец тестировали в трёх повторах. Диагностическую специфичность рассчитывали, как отношение числа истинно отрицательных результатов к общему числу заведомо отрицательных образцов. Границы 95% доверительного интервала рассчитаны методом Клоппера-Пирсона.

Диагностическая чувствительность при анализе образцов, содержащих ДНК ВОО, во всех случаях был зарегистрирован положительный результат. Ни в одном случае не было зарегистрировано ложноотрицательного результата. Таким образом, диагностическая чувствительность тест-системы для всей совокупности положительных образцов (n=53) составила 100% в рамках проанализированной выборки, а нижняя граница 95% доверительного интервала для данного показателя (94,6%), что полностью соответствует требованиям, установленным ТУ на изделие.

6.3.2 Диагностическая специфичность

При анализе 130 образцов, не содержащих ДНК ВОО, отрицательный результат в ИФА был зарегистрирован для всех без исключения образцов данной выборки (100%). Результаты анализа в зависимости от типа исследованного клинического материала представлено в таблице 6.7.

Таблица 6.7 – Диагностическая специфичность тест-системы «Вектор ИФА ВОО-А29L АГ» в зависимости от типа клинического образца

Тип образца	Кол-во	Отрицательные	Специфичность, %	95% ДИ
-------------	--------	---------------	------------------	--------

	образцов	результаты ИФА		
Соскобы с пустул (ВОВ)	94	94	100	[96,2–100%]
Смывы из носоглотки (ВОК)	3	3	100	[43,9–100%]
Соскобы с пустул (HSV-2)	10	10	100	[74,1–100%]
Соскобы с пустул (VZV)	8	8	100	[67,6–100%]
Сыворотка крови (ВОВ)	4	4	100	[51,0–100%]
Сыворотка крови здоровых доноров	11	11	100	[74,1–100%]
Всего	130	130	100	[96,6–100%]

Примечание – ВОВ – вирус осповакцины; ВОК – вирус оспы коров; HSV-2 – вирус простого герпеса 2-го типа; VZV – вирус ветряной оспы. Диагностическую специфичность рассчитывали, как отношение числа истинно отрицательных результатов к общему числу исследованных отрицательных образцов. Границы двустороннего 95% доверительного интервала рассчитывали точным биномиальным методом Клоппера-Пирсона

При исследовании 130 заведомо отрицательных клинических образцов ложноположительных результатов зарегистрировано не было. Диагностическая специфичность тест-системы для всей совокупности отрицательных образцов составила 100%, нижняя граница 95% доверительного интервала – 96,6%. Отсутствие перекрестной реактивности с гетерологичными вирусами оценивали отдельно в рамках определения аналитической специфичности.

6.3.3 Аналитическая чувствительность

Набор реагентов «Вектор ИФА ВОО-A29L АГ» предназначен для качественного выявления антигена А29 ВОО в исследуемом материале методом твердофазного ИФА. Таким образом, результат исследования интерпретируется качественно – как наличие или отсутствие выявляемого антигена. В настоящем разделе представлены результаты оценки соответствия аналитической чувствительности разработанного набора характеристике, установленной в технической и эксплуатационной документации.

В соответствии с утвержденной программой клинических испытаний аналитическую чувствительность (предел обнаружения, LoD) оценивали при исследовании образца № 3пол рабочей панели образцов «РП-АГ(+/-) ВОО». Образец № 3пол соответствовал по концентрации антигена десятикратному разведению образца № 1пол той же рабочей панели. Образец № 1пол до обеззараживания содержал ВОО в концентрации $(2,5 \pm 0,5) \times 10^4$ БОЕ/мл. Следовательно, расчетное содержание вируса в образце № 3пол составляло $(2,5 \pm 0,5) \times 10^3$ БОЕ/мл в пересчете на содержание вируса до обеззараживания. Необходимо отметить, что указанная величина характеризует концентрацию вируса в исходном материале до его обеззараживания, а не концентрацию очищенного белка А29 в исследуемой пробе.

Для подтверждения заявленной аналитической чувствительности образец № 3пол исследовали в четырех повторах с использованием двух независимых серий набора реагентов – серий 01.06.2025 и 02.06.2025. Таким образом, было выполнено восемь определений. Результаты представлены в таблице 6.8.

Таблица 6.8 – Результаты подтверждения заявленной аналитической чувствительности набора реагентов «Вектор ИФА ВОО-А29L АГ»

Серия набора	Повтор	ОП образца №3пол, о.е.	ОПкрит, о.е.	ОП/ОПкрит	Среднее ОП серии, о.е.	σ , о.е.	CV, %
01.06.2025	1	2,65	0,202	13,12	2,646	0,0513	1,94
	2	2,633	0,202	13,03			
	3	2,712	0,202	13,43			
	4	2,588	0,202	12,81			
02.06.2025	1	4,38	0,206	21,26	4,5	0,0985	2,19
	2	4,621	0,206	22,43			
	3	4,505	0,206	21,87			
	4	4,492	0,206	21,81			

Примечание – ОП – оптическая плотность исследуемого образца; ОПкрит – критическое значение оптической плотности, рассчитываемое по формуле $ОПкрит = ОП(К-)_{ср} + 0,15$, где $ОП(К-)_{ср}$ – среднее арифметическое значение оптической плотности отрицательного контрольного образца. Образец считали положительным при $ОП_{образца} \geq ОПкрит$ и отрицательным при $ОП_{образца} < ОПкрит$. Образец №

3пол представлял собой десятикратное разведение образца № 1пол рабочей панели «РП-АГ(+/-) ВОО»; содержание ВОО в № 1пол до обеззараживания составляло $(2,5 \pm 0,5) \times 10^4$ БОЕ/мл, вследствие чего расчетная концентрация для № 3пол составляла $(2,5 \pm 0,5) \times 10^3$ БОЕ/мл в пересчете на содержание вируса до обеззараживания. σ – стандартное отклонение значений ОП внутри серии; CV – коэффициент вариации, рассчитанный как $CV = \sigma/M \times 100\%$, где M – среднее арифметическое значение ОП четырех повторов соответствующей серии. Показатель ОП/ОПкрит приведен как отношение аналитического сигнала исследуемого образца к установленному для соответствующей постановки критическому значению и служит для наглядного представления превышения порога положительного результата

При исследовании образца № 3пол с расчетной концентрацией ВОО $(2,5 \pm 0,5) \times 10^3$ БОЕ/мл в пересчете на содержание вируса до обеззараживания во всех восьми определениях на двух сериях набора получен положительный результат. В официальном протоколе КИ данный результат сформулирован как 100% положительных результатов в четырех повторах на двух сериях наборов и признан соответствующим заявленной в технической документации аналитической чувствительности.

Коэффициент вариации значений ОП внутри серий составил 1,94 и 2,19 %, что свидетельствует о стабильности аналитического сигнала. Различия абсолютных значений ОП между сериями не влияли на интерпретацию результатов, поскольку для качественного ИФА критерием положительного результата являлось превышение соответствующего ОПкрит. Повторяемость и воспроизводимость набора оценивали отдельно.

Таким образом, во всех определениях образца № 3пол, соответствующего концентрации ВОО $(2,5 \pm 0,5) \times 10^3$ БОЕ/мл до обеззараживания, получен положительный результат, подтверждая аналитическую чувствительность набора не хуже $(2,5 \pm 0,5) \times 10^3$ БОЕ/мл. Полученные данные характеризуют подтверждение заявленной аналитической чувствительности в рамках клинических испытаний и не

являются определением абсолютного минимального (LoD) методом последовательных разведений.

6.3.4 Аналитическая специфичность

Определение аналитической специфичности тест-системы «Вектор ИФА ВОО-А29L АГ» проводили в соответствии с утверждённой программой клинико-лабораторных испытаний № 05-2025/ИЛЦ-Пр от 24.11.2025 г. и требованиями ТУ 20.59.52-117-05664012-2025.

В качестве объектов исследования использовали остаточный биологический материал: 53 пробы от 23 пациентов с установленным диагнозом оспа обезьян (B04 по МКБ-10), содержащие ДНК ВОО, и 130 проб от здоровых доноров и пациентов с гетерологичными заболеваниями, не содержащие ДНК ВОО. Дополнительно аналитическую специфичность оценивали при исследовании в 4 повторах образцов рабочей панели «РП-АГ (+/-) ВОО», из которых 8 содержат ДНК ВОО и 8 не содержат ДНК ВОО.

Исследование проводили на двух независимых сериях набора реагентов (серия 01.06.2025 и серия 02.06.2025); каждый образец тестировали в трёх повторах, результаты учитывали в соответствии с критериями инструкции по применению. Результаты определения аналитической специфичности представлены в таблице 6.9.

Таблица 6.9 – Результаты определения аналитической специфичности тест-системы «Вектор ИФА ВОО-А29L АГ»

Категория образцов	Шифр образцов	Кол-во проб	Положительный результат, шт.	Отрицательный результат, шт.	Специфичность, %	95% ДИ
Заведомо положительные						
Остаточный биологический	№ 1-53	53	53	0	-	-

материал (ВОО)						
Рабочая панель «РП-АГ (+/-) ВОО» (положительные)	№ 184-191	8	8	0	-	-
Разведения положительных образцов	-	24	24	0	-	-
Итого положительных	-	85	85	0	100	[94,6-100%]
Заведомо отрицательные						
Остаточный биологический материал (без ВОО)	№ 54-183	130	0	130	100	[96,6-100%]
Рабочая панель «РП-АГ (+/-) ВОО» (отрицательные)	№ 192-199	8	0	8	100	-
Разведения отрицательных образцов	-	24	0	24	100	-
Итого отрицательных	-	162	0	162	100	[96,6-100%]
Всего	-	247	85	162	100	—

Примечание – ВОО – вирус оспы обезьян; 95% ДИ – 95% доверительный интервал, рассчитанный методом Клоппера-Пирсона. Исследование проводили на двух сериях набора реагентов; каждый образец тестировали в 3 повторах. Включая разведения рабочей панели «РП-АГ (+/-) ВОО» (8 положительных + 8 отрицательных, 4 повтора на двух сериях)

При исследовании 130 образцов, не содержащих ДНК ВОО, во всех случаях на двух независимых сериях набора реагентов получен отрицательный результат (100%; [95% ДИ: 96,6–100%], расчёт методом Клоппера-Пирсона). Средние значения ОП для отрицательных образцов не превышали ОП_{крит}. Для каждой серии отдельно $CV \leq 8\%$, что соответствует требованиям ТУ 20.59.52-117-05664012-2025. Перекрестно реагирующих образцов обнаружено не было. При исследовании 8 отрицательных образцов рабочей панели «РП-АГ (+/-) ВОО» также был получен отрицательный результат во всех случаях (100% согласованность). Полученные результаты подтверждают, что аналитическая специфичность тест-системы «Вектор ИФА ВОО-А29L АГ» составляет 100% [95% ДИ: 96,6-100%].

6.3.5 Влияние интерферирующих веществ

В рамках отдельной серии экспериментов исследовано влияние интерферирующих веществ, взятых допустимых концентрациях. В исследование включено 8 исходных клинических образцов содержащих ДНК ВОО, для которых выполнено 24 парных сравнения при добавлении трёх интерферирующих веществ. Образцы данной панели не входили в состав основной выборки (n=183). Полученные результаты представлены в таблице 6.10.

Таблица 6.10 – Влияние интерферирующих веществ на результаты ИФА при исследовании 8 клинических образцов (24 парных сравнения)

Тип образца	Интерферент	Средняя ОП (нет вещества)	Средняя ОП (с веществом)	Отклонение, %	t-значение	p	Влияние
Отрицательные контроли							
Сыворотка (здоровый донор)	Г	0,044	0,037	-15,9	1,24	>0,05	–
	Б	0,044	0,035	-20,5	1,31	>0,05	–
	Т	0,044	0,03	-31,8	1,87	>0,05	–
Соскоб с пустулы (ВОВ)	Г	0,072	0,079	9,7	0,86	>0,05	–
	Б	0,072	0,081	12,5	1,02	>0,05	–
	Т	0,072	0,074	2,8	0,31	>0,05	–
Положительные образцы (ВОО)							
Сыворотка №43	Г	4,631	4,59	-0,9	0,15	>0,05	–
	Б	4,631	4,467	-3,5	0,42	>0,05	–
	Т	4,631	4,468	-3,5	0,41	>0,05	–
Сыворотка №44	Г	3,945	3,816	-3,3	0,38	>0,05	–
	Б	3,945	3,867	-2	0,22	>0,05	–
	Т	3,945	3,662	-7,2	0,73	>0,05	–
Сыворотка №45	Г	2,823	2,906	2,9	0,34	>0,05	–
	Б	2,823	3,218	14	1,28	>0,05	–
	Т	2,823	2,629	-6,9	0,71	>0,05	–
Мазок №5	Г	5,018	4,265	-15	1,43	>0,05	–
	Б	5,018	4,617	-8	0,84	>0,05	–
	Т	5,018	4,427	-11,8	1,12	>0,05	–
Мазок №6	Г	3,92	3,12	-20,4	1,91	>0,05	–
	Б	3,92	4,13	5,4	0,58	>0,05	–
	Т	3,92	3,683	-6	0,62	>0,05	–
Мазок №7	Г	3,381	2,298	-32	1,95	>0,05	–
	Б	3,381	3,06	-9,5	0,93	>0,05	–
	Т	3,381	3,266	-3,4	0,37	>0,05	–

Примечание – Г – гемоглобин (1000 мг/дл); Б – билирубин (15 мг/дл); Т – триглицериды (700 мг/дл). Статистическую значимость различий оценивали парным t-критерием Стьюдента ($\alpha=0,05$). Пороговым значением клинически значимой интерференции считали отклонение ОП >50% или изменение качественной интерпретации результата. Во всех исследованных комбинациях интерференция отсутствовала ($p > 0,05$), классификация результатов не изменилась

Статистический анализ с применением t-критерия Стьюдента для связанных выборок не выявил статистически различий между значениями ОП с добавлением интерферирующих веществ и без них ($p > 0,05$ для всех исследованных комбинаций). Максимальное зарегистрированное изменение ОП составило 32,0% (образец №7 с гемоглобином), что не превысило критического порога в 50%, установленного программой клинических испытаний. Во всех случаях интерпретация результата (положительный/отрицательный) не изменялась. Важно подчеркнуть, что, несмотря на колебания значений ОП, все отрицательные контроли сохраняли статус отрицательных, а все положительные – положительные. Поэтому, присутствие гемоглобина, билирубина и триглицеридов в исследованных концентрациях не оказывает клинически значимого влияния на диагностическую эффективность тест-системы.

6.3.6 Повторяемость и воспроизводимость

Результаты оценки внутрисерийной повторяемости и межсерийной воспроизводимости тест-системы обобщены и представлены в таблице 6.11.

Таблица 6.11 – Результаты оценки повторяемости и воспроизводимости

Показатель	Образец	Кол-во повторов	Среднее значение ОП, о.е.	Стандартное отклонение, о.е.	CV, %	Норма	Соответствие
Повторяемость (внутри серии)							
Серия 01.06.2025	№5 (мазок)	3	5,018	0,351	7	$\leq 8\%$	+
	№43 (сыворотка)	3	4,631	0,232	5	$\leq 8\%$	+

Серия 02.06.2025	№5 (мазок)	3	4,394	0,132	3	≤8%	+
	№43 (сыворотка)	3	4,577	0,275	6	≤8%	+
Воспроизводимость (межсерийная)							
Серии 01.06.2025 и 02.06.2025	№5 (мазок)	6	4,545	0,273	6	≤8%	+
	№43 (сыворотка)	6	4,585	0,275	6	≤8%	+

Примечание – ОП – оптическая плотность; CV – коэффициент вариации. Знак «+» в графе «Соответствие» означает, что полученное значение CV не превышает установленную в ТУ норму. Для оценки воспроизводимости результатов между двумя сериями набора реагентов применяли t-критерий Стьюдента для независимых выборок. Различия считали значимыми при $p < 0,5$.

Коэффициент вариации (CV) для всех исследованных показателей не превышал 8%, что соответствует требованиям, установленным в ТУ, и свидетельствует о приемлемой внутрисерийной повторяемости и межсерийной воспроизводимости результатов.

6.3.7 *Согласованность с референсным методом*

Финальным этапом клинико-лабораторных исследований стало количественное сравнение результатов разработанного ИФА с референсным методом ПЦР-РВ. Матрица согласованности для всей выборки ($n=183$) представлена в таблице 6.12.

Таблица 6.12 – Сопоставление результатов иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции

Результат ИФА	ПЦР положительный	ПЦР отрицательный	Всего
ИФА положительный	53	0	53
ИФА отрицательный	0	130	130
Всего	53	130	183

Примечание – Согласованность оценивали с помощью коэффициента каппа Коэна (κ). Выявлено совпадение результатов ($\kappa=1,0$), что свидетельствует об отсутствии ложноположительных и ложноотрицательных реакций в рамках исследованной выборки

Данные, представленные в таблице 6.12, подтверждают, что тест-система «Вектор ИФА ВОО-A29L АГ» обладает диагностической эффективностью, сопоставимой с ПЦР в рамках исследованной выборки.

Клинические испытания на независимой панели (n=183) продемонстрировали 100% диагностическую чувствительность и специфичность, высокую воспроизводимость ($CV \leq 8\%$) и отсутствие значимой интерференции эндогенных веществ. Полная согласованность с референсным методом ПЦР-РВ ($\kappa=1,0$) подтверждает, что тест-система обеспечивает надёжное выявление антигена ВОО в условиях рутинной лабораторной диагностики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения диссертационной работы решена актуальная научно-практическая задача – создана отечественная высокоспецифичная тест-система для иммуноферментного выявления антигена ВОО на основе МКА к поверхностному белку А29. В результате проведённых исследований детально изучена антигенная структура белка А29 ВОО, идентифицированы видоспецифичные эпитопы, локализованные преимущественно в N-концевой области (а.о. 1-50). Получен и охарактеризован гибридомный клон 3E12, стабильно продуцирующий МКА А29L-7, которые в формате прямого ИФА обеспечивали выраженный специфический аналитический сигнал при содержании ВОО 10^2 БОЕ/мл и характеризовались видоспецифичностью, подтверждённой отсутствием перекрёстной реактивности с цельновирионными антигенами ВОВ и ВОК.

Экспериментально показано, что линейные эпитопы белка А29, специфично распознаваемые МКА А29L-7, сохраняют свою антигенную активность после термического обеззараживания (кипячение, 98-100 °С, 30 мин), что обосновывает возможность безопасной работы с клиническим материалом в лабораториях уровня УББ2/УББ3 без потери диагностической эффективности.

Разработана и оптимизирована сэндвич-ИФА тест-система «Вектор ИФА ВОО-А29L АГ», сконструированная с использованием ПКА к ОПВ в качестве захватывающего компонента и пероксидазного конъюгата МКА А29L-7 для детекции. Созданы и валидированы лабораторный и бесприборный протоколы постановки анализа. Независимая апробация на панели из 181 клинического образца (121 ПЦР-положительный образец от пациентов с подтверждённой инфекцией ВОО и 60 ПЦР-отрицательных образцов), полученного во время вспышки ВОО в Гвинейской Республике в 2025 году, подтвердила 100% диагностическую чувствительность [95% ДИ: 96,9-100%] и специфичность [95% ДИ: 94,0-100%] при использовании обоих форматов.

По результатам официальных клинико-лабораторных испытаний на панели из 183 образцов (53 положительных, 130 отрицательных) диагностическая чувствительность и специфичность тест-системы составили 100% [95% ДИ: 94,6-100%] и 100% [95% ДИ: 96,6-100%] соответственно. Коэффициент каппа Коэна $\kappa=1,0$ свидетельствует о полной согласованности с референсным методом ПЦР. Полученные показатели соответствуют целевым требованиям ВОЗ для *in vitro* диагностических тестов (чувствительность и специфичность $\geq 95\%$).

Разработана и утверждена необходимая нормативно-техническая документация (ТУ 20.59.52-117-05664012-2025, комплект СОП, инструкция по применению), успешно проведены технические и клинические испытания.

Следует отметить ограничения исследования: показатели эффективности получены на ограниченной выборке и характеризуют конкретную когорту, что требует подтверждения на расширенных независимых панелях. Аттестация проводилась в стандартизованных условиях, что может не полностью отражать вариабельность преаналитических факторов в рутинной практике. Оценка перекрёстной реактивности ограничена доступной панелью ОПВ и не исключает необходимости изучения взаимодействия с другими потенциально перекрёстно-реагирующими патогенами. Влияние альтернативных методов обеззараживания на сохранность эпитопов A29 требует дополнительного изучения.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментально доказано, что видоспецифические антигенные детерминанты A29 ВОО обладают высокой структурной стабильностью и сохраняют антигенную активность после термического обеззараживания (кипячение, 30 мин, 98-100 °С), что обосновывает выбор белка в качестве мишени для диагностики ВОО в предварительно обеззараженных клинических образцах.
2. Разработан и апробирован метод трёхэтапного скрининга гибридом, позволяющий с высокой эффективностью отбирать клоны, стабильно продуцирующие видоспецифичные моноклональные антитела. Метод включает: (1) предварительную селекцию спленоцитов, специфичных к рекомбинантному белку Trx-A29; (2) скрининг супернатантов на панели из шести иммуносорбентов (AgPOX, Trx-A29, Trx, ВОО, ВОК, ВОВ); (3) заключительный отбор по критериям максимальной чувствительности и отсутствия перекрёстной реактивности.
3. Получен и охарактеризован гибридомный клон 3E12, продуцирующий моноклональные антитела A29L-7, высокоспецифичные к линейному эпитопу белка A29 ВОО. В формате прямого ИФА МКА A29L-7 обеспечивали выраженный специфический сигнал при содержании ВОО 10^2 БОЕ/мл и не вступали в перекрёстные реакции с цельновирионными антигенами ВОК и ВОВ.
4. Метод термического обеззараживания (кипячение, 30 мин, 98-100 °С) признан предпочтительным для пробоподготовки клинического материала перед ИФА, так как обеспечивает минимальную потерю антигенной активности.
5. Экспериментально определены параметры сэндвич-ИФА и сформирована тест-система «Вектор ИФА ВОО-A29L АГ» с использованием ПКА к ОПВ в качестве захватывающего компонента и пероксидазного конъюгата МКА A29L-7 в качестве детектирующего компонента. Подтверждена аналитическая чувствительность разработанного набора реагентов «Вектор ИФА ВОО-A29L

АГ» – не хуже $(2,5 \pm 0,5) \times 10^3$ БОЕ/мл в пересчете на содержание ВОО до обеззараживания.

6. По данным клинико-лабораторных испытаний тест-системы «Вектор ИФА ВОО-A29L АГ» на выборке из 183 образцов (53 положительных, 130 отрицательных) диагностическая чувствительность составила 100% [95% ДИ: 94,6-100%], специфичность – 100% [95% ДИ: 96,6-100%]. Коэффициент каппа Коэна $k=1,0$ подтверждает полную согласованность с референсным методом ПЦР в рамках исследованной выборки.
7. Независимая апробация на расширенной панели из 181 образца, включающей 121 ПЦР-положительный клинический образец из Гвинейской Республики и 60 ПЦР-отрицательных образцов, полученных во время вспышки в Гвинейской Республике (2025 г.), продемонстрировала 100% чувствительность [95% ДИ: 96,9-100%] и специфичность [95% ДИ: 94,0-100%] для обоих протоколов, что подтверждает пригодность набора для экстренной диагностики оспы обезьян в эндемичных регионах.
8. Разработана и утверждена нормативно-техническая документация (ТУ 20.59.52-117-05664012-2025, комплект СОП, инструкция по применению). Набор реагентов успешно прошёл технические и клинические испытания, регистрационное досье передано в Росздравнадзор для экспертизы и государственной регистрации медицинского изделия.

БЛАГОДАРНОСТИ

Научному руководителю – кандидату биологических наук Пьянкову Олегу Викторовичу за постановку задачи, всестороннюю поддержку, ценные советы и руководство на всех этапах выполнения работы. Пьянкову Степану Александровичу – за весь цикл работ с анализом ИФА, включая постановку и оптимизацию ИФА-экспериментов, отработку протоколов детекции антигена A29 ВОО и вычитку рукописи диссертации. Выражаю благодарность Полтавченко А.Г. и Сергееву А.А. за редакцию и вычитку рукописи диссертации, а также за ценные замечания, учтенные при ее доработке.

Сотрудникам отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора за конструирование рекомбинантных белков AgPOX и Trx-A29, очистку целевых белков методом аффинной хроматографии и иммунизацию мышей линии BALB/c. Сотрудникам отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Одношевскому Д.А. и Овчинниковой А.С. за работу с нативными вирусами оспы обезьян в условиях лаборатории УББ4, а также за иммунизацию кроликов для получения ПКА. Сотрудникам отдела коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора за предоставление штаммов вирусов из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов.

Сотрудникам Национального института общественного здравоохранения Гвинейской Республики и ФКУБ НПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора за помощь в получении и верификации клинических образцов от пациентов с подтверждённым диагнозом «оспа обезьян» на территории Гвинейской Республики. Всем соавторам научных публикаций по теме диссертации за плодотворное сотрудничество и обсуждение результатов. Особую благодарность автор выражает старшему научному сотруднику Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук Матвееву Андрею Леонидовичу за неоценимый вклад в создание гибридом-продуцентов МКА, а также за редактирование научных статей.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: учебник. – 6-е изд., испр. – М.: Медицинское информационное агентство (МИА), 2025. – 792 с.
2. Бабкин И.В., Щелкунов С.Н. Молекулярная эволюция поксвирусов // Генетика. – 2008. – Т. 44, № 8. – С. 1029-1044.
3. Герасимов А.Н. Разработка прототипа иммунохроматографической тест-системы для выявления вируса оспы обезьян // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2024. – Т. 24, № S1. – С. 48.
4. Евразийская экономическая комиссия. О внесении изменения в Требования к внедрению, поддержанию и оценке системы менеджмента качества медицинских изделий в зависимости от потенциального риска их применения: решение Совета ЕЭК от 19 августа 2022 г. № 133 [Электронный ресурс]. – Москва, 2022. – URL: <https://normacs.net/Doclist/doc/220АН.html> (дата обращения: 27.04.2026).
5. Зверев В.В., Бойченко М.Н. (ред.). Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник в 2 т. – Т. 2. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2025. – 480 с.
6. Исаева Г.Ш., Савинова А.Н. Медицинская вирусология: учебно-методическое пособие для ординаторов. – Казань: Казанский ГМУ, 2025. – 33 с.
7. Лабораторная диагностика натуральной оспы: методические указания МУ 1.3.2970-11 / Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – М., 2012. – 38 с.
8. Методические рекомендации МР 3.1.0350-24. Санитарно-противоэпидемические (профилактические) мероприятия, направленные на предупреждение завоза и распространения оспы обезьян / Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – М., 2024.

9. МУ 3.3.1.2044-06. Проведение вакцинопрофилактики натуральной оспы / Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – М., 2006. – 19 с.
10. Натуральная оспа (клиника, лечение, иммунопрофилактика): методические рекомендации / ФМБА. – М., 2006. – 60 с.
11. Овчинникова А.С., Одношевский Д.А., Кабанов А.С., и др. Характеристики изолята вируса оспы обезьян, полученного от первого заболевшего в России // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2024. – Т. 101, № 6.
12. Организация и проведение противоэпидемических и дезинфекционных мероприятий при натуральной оспе: МУ 3.1/3.5.2497-09 / Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – М., 2009. – 51 с.
13. Противоэпидемические мероприятия, направленные на предупреждение завоза и распространения оспы обезьян: МР 3.1.0290-22 / Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – М., 2022. – 27 с.
14. Пьянков С.А., Шульгина И.С., Овчинникова А.С., и др. Выявление вируса оспы обезьян методом иммуноферментного анализа в бесприборном формате и после инактивации его формальдегидом // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2024. – Т. 42, № 4. – С. 49-53.
15. Пьянков С.А., Шульгина И.С., Овчинникова А.С., и др. Моноклональное антитело а-A29L_МРохV, специфичное к белку A29L вируса оспы обезьян, и набор реагентов для иммуноферментной диагностики оспы обезьян на его основе: пат. 2834782 Рос. Федерация. – №2023131164; заявл. 28.11.2023; опубл. 18.02.2025, Бюл. № 5. – 14 с.
16. Пьянков С.А., Шульгина И.С., Рыбель А.В., и др. Применение специфичных к белку A29L моноклональных антител а-A29L_МРохV для диагностики оспы обезьян // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2023. – Т. 41, № 4. – С. 31-37.

17. Постановление Правительства РФ от 30 ноября 2024 г. № 1684 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий» // Собрание законодательства РФ. – 2024. – № 50. – Ст. 7744.
18. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021. – 462 с.
19. Ушкаленко Н.Д., Ерш А.В., Филатов П.В., Полтавченко А.Г. Ускоренный метод иммуноферментного анализа для выявления ортопоксвирусов // Вопросы вирусологии. – 2023. – Т. 68, № 3. – С. 242-251.
20. Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения. Государственный реестр медицинских изделий [Электронный ресурс]. – URL: <https://roszdravnadzor.gov.ru/services/mi> (дата обращения: 19.05.2026).
21. Шишкина Л.Н., Богрянцева М.П., Бормотов Н.И., и др. Фармакокинетика нового российского противооспенного препарата НИОХ-14: открытое рандомизированное клиническое исследование // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2025. – Т. 88, № 8. – С. 12-18.
22. ACON Biotech. FlowFlex Monkeypox Virus Antigen Rapid Test. – Hangzhou: ACON Biotech, 2023.
23. Adler H., Gould S., Hine P., et al. Clinical features and management of human monkeypox: a retrospective observational study in the UK // The Lancet Infectious Diseases. – 2022. – Vol. 22, No. 8. – P. 1153-1162.
24. Africa CDC. Still not over: Africa CDC and WHO issue third reaffirmation of mpox emergency [Электронный ресурс] // Journal of Public Health in Africa. – 2026. – URL: <https://khub.africacdc.org/records/resource?id=405> (дата обращения: 18.05.2026).
25. Ai X., Zhang X., Xu Y., et al. Preparation and application evaluation of monoclonal antibodies against Monkeypox virus A29 protein // Frontiers in Microbiology. – 2025. – Vol. 16. – P. 1547021.

26. AntibodySystem. Anti-MPXV A29L Human IgG ELISA Kit (KAV13402) [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.antibodysystem.com/product/19985.html> (дата обращения: 19.05.2026).
27. Arndt W.D., Cotsmire S., Blumenschein W., et al. Evaluation of A29L antigen for serological differentiation between mpox virus and vaccinia virus infections // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2023. – Vol. 61, No. 5. – P. e0015723.
28. Babkin I.V., Babkina I.N., Tikunova N.V. An Update of Orthopoxvirus Molecular Evolution // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, No. 2. – Art. 388.
29. Babkin I.V., Babkina I.N., Tikunova N.V. Molecular Aspects of the Emergence of Monkeypox Virus Clades // *Viruses*. – 2025. – Vol. 17, No. 12. – Art. 1549.
30. Bakamutumaho B., et al. Field evaluation of a rapid antigen test for mpox in the Democratic Republic of the Congo and Uganda // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2026. – Vol. 26, No. 3. – P. 312-321.
31. Batéjat C., Grassin Q., Feher M., et al. Heat inactivation of monkeypox virus // *Journal of Biosafety and Biosecurity*. – 2022. – Vol. 4, No. 2. – P. 121-123.
32. Brenan J.G., Kalisa R., Steniowski M.V., et al. Human monkeypox, 1970-79 // *Bulletin of the World Health Organization*. – 1980. – Vol. 58, No. 2. – P. 165-182.
33. Cambaza E.M. A Review of the Molecular Understanding of the Mpox Virus (MPXV): Genomics, Immune Evasion, and Therapeutic Targets // *Zoonotic Diseases*. – 2025. – Vol. 5, No. 1. – Art. 3.
34. Cai J.P., Chu W.M., Tam A.R., et al. Determination of seroprevalence and kinetics of humoral response using mpox virus A29 protein // *Communications Medicine*. – 2023. – Vol. 3, No. 1. – P. 168.
35. Centers for Disease Control and Prevention. Smallpox Vaccine ACAM2000 [Электронный ресурс] // CDC Drug Service. – 2025. – URL: <https://www.cdc.gov/infectious-diseases-labs/php/cdc-drug-service/our-formulary.html> (дата обращения: 19.05.2026).

- 36.Chang T.H., Chang S.J., Hsieh F.L., et al. Crystal structure of vaccinia viral A27 protein reveals a novel structure critical for its function and complex formation with A26 protein // PLOS Pathogens. – 2013. – Vol. 9, No. 8. – P. e1003563.
- 37.Chen Y., Zhang X., Wang L., Li J. Comparative evaluation of commercial mpox antigen detection kits // Journal of Clinical Virology. – 2024. – Vol. 173. – P. 105689.
- 38.Chung C.S., Hsiao J.C., Chang Y.S., Chang W. A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate // Journal of Virology. – 1998. – Vol. 72, No. 2. – P. 1577-1585.
- 39.Czerny C.P., Mahnel H. Establishment of an ELISA for the Detection of Orthopox Viruses Based on Neutralizing Monoclonal and Polyclonal Antibodies // Journal of Veterinary Medicine, Series B. – 1989. – Vol. 36, No. 1-10. – P. 537-546.
- 40.Deng Y., Navarro-Forero S., Yang Z., Yount J. Temporal expression classes and functions of vaccinia virus and mpox (monkeypox) virus genes // mBio. – 2025. – Vol. 16, No. 4. – P. e03809-24.
- 41.Di Giulio D.B., Eckburg P.B. Human monkeypox: an emerging zoonosis // The Lancet Infectious Diseases. – 2004. – Vol. 4. – P. 15-25.
- 42.Dai Z., Zhang X., Wang Y., Li J., Chen H., Liu W., Zhao F. A systematic review of mpox outbreaks and public health response strategies // Journal of Medical Virology. – 2025. – Vol. 97, No. 3. – Art. e70234.
- 43.Dutta S., Ghosh R., Dasgupta I., Sikdar P., Santra P., Maity D., Pritam M., Lee S.G. Monkeypox: A comprehensive review on mutation, transmission, pathophysiology, and therapeutics // International Immunopharmacology. – 2025. – Vol. 146. – P. 113813.
- 44.Gigante C.M., Korber B., Seabolt M.H., et al. Multiple lineages of monkeypox virus detected in the United States, 2021–2022 // Science. – 2022. – Vol. 378, No. 6619. – P. 560-565.
- 45.Fishwild D.M., O'Donnell S.L., Bengoechea T., et al. High-affinity human antibodies from XenoMouse mice // Nature Biotechnology. – 1996. – Vol. 14, No. 7. – P. 845-851.

- 46.Forni D., Cagliani R., Pozzoli U., Sironi M. An APOBEC3 mutational signature in the genomes of human-infecting orthopoxviruses // *mSphere*. – 2023. – Vol. 8, No. 2. – P. e00062-23.
- 47.Frdbio. Monkeypox Virus A29L Protein ELISA Kit [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.frdbio.com/products/show26454178.html> (дата обращения: 19.05.2026).
- 48.Gessain A., Nakoune E., Yazdanpanah Y. Monkeypox // *New England Journal of Medicine*. – 2022. – Vol. 387, No. 19. – P. 1783-1793.
- 49.Giorgi F.M., Pozzobon D., Di Meglio A., Mercatelli D. Genomic analysis of the recent monkeypox outbreak // *Vaccine*. – 2024. – Vol. 42, No. 7. – P. 1841-1849.
- 50.Gong S.C., Lai C.F., Esteban M. Vaccinia virus induces cell fusion at acid pH and this activity is mediated by the N-terminus of the 14-kDa virus envelope protein // *Virology*. – 1990. – Vol. 178, No. 1. – P. 81-91.
- 51.Hammarlund E., Lewis M.W., Carter S.V., et al. Multiple diagnostic techniques identify previously vaccinated individuals with protective immunity against monkeypox // *Nature Medicine*. – 2005. – Vol. 11, No. 9. – P. 1005-1011.
- 52.Haselbeck A.H., Im J., Prifti K., et al. Serology as a Tool to Assess Infectious Disease Landscapes and Guide Public Health Policy // *Pathogens*. – 2022. – Vol. 11, No. 7. – P. 732.
- 53.He P., Shi D., Song Y., et al. SPR Sensor-Based Analysis of the Inhibition of Marine Sulfated Glycans on Interactions between Monkeypox Virus Proteins and Glycosaminoglycans // *Marine Drugs*. – 2023. – Vol. 21, No. 5. – P. 264.
- 54.Ho Y., Wang Y.H., Hsiao Y.J., et al. A conserved domain of the vaccinia virus A27 protein is required for its interaction with A17 protein and virus assembly // *Journal of Virology*. – 2014. – Vol. 88, No. 19. – P. 11356-11366.
- 55.Howard A.R., Weisberg A.S., Moss B. The vaccinia virus A27 protein interacts with the A17 protein during virion assembly // *Journal of Virology*. – 2006. – Vol. 80, No. 22. – P. 11226-11233.

- 56.Hsiao J.C., Chung C.S., Chang W. Vaccinia virus envelope A27 protein is essential for cell binding and fusion but not for virion morphogenesis // Journal of Virology. – 1999. – Vol. 73, No. 10. – P. 8754-8761.
- 57.Hughes L.J., Goldstein J., Pohl J., et al. A highly specific monoclonal antibody against monkeypox virus detects the heparin binding domain of A27 // Virology. – 2014. – Vol. 464-465. – P. 264-273.
- 58.Hutson C.L., Carroll D.S., Self J., et al. Monkeypox virus clade IIb transmission in non-human primates // Emerging Infectious Diseases. – 2023. – Vol. 29, No. 7. – P. 1401-1404.
- 59.International Committee on Taxonomy of Viruses. Genus: Orthopoxvirus [Электронный ресурс] // ICTV Report on Poxviridae. – URL: <https://ictv.global/report/chapter/poxviridae/poxviridae/orthopoxvirus> (дата обращения: 19.05.2026).
- 60.Ishara-Nshombo E., Somasundaran A., Romero-Ramirez A., et al. Diagnostic Accuracy of 3 Mpox Lateral Flow Assays for Antigen Detection, Democratic Republic of the Congo and United Kingdom // Emerging Infectious Diseases. – 2025. – Vol. 31, No. 6. – P. 1140-1148.
- 61.Jeong H., Kim J., Park S., Lee J., Cho B. Development of rapid immunochromatographic test for the detection of mpox virus // Journal of Virological Methods. – 2024. – Vol. 326. – P. 114902.
- 62.Johnston S.C., Johnson J.C., Stonier S.W., et al. Proteomic analysis of the antibody response to mpox virus infection // Journal of Proteome Research. – 2024. – Vol. 23, No. 2. – P. 712-725.
- 63.Kao C., Tsai M., Carillo K.J., et al. Structural and functional analysis of vaccinia viral fusion complex component protein A28 through NMR and molecular dynamic simulations // PLoS Pathogens. – 2023. – Vol. 19, No. 11. – P. e1011500.
- 64.Kao S., Kao C.F., Chang W., Ku C. Widespread distribution and evolution of poxviral entry-fusion complex proteins in giant viruses // Microbiology Spectrum. – 2023. – Vol. 11, No. 2. – P. e04944-22.

- 65.Karem K.L., Reynolds M., Hughes C., et al. Monkeypox virus: a novel orthopoxvirus infection in humans // *Clinical Infectious Diseases*. – 2005. – Vol. 40, No. 12. – P. 1749-1755.
- 66.Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // *Nature*. – 1975. – Vol. 256, No. 5517. – P. 495-497.
- 67.Kraemer M.U.G., Tegally H., Pigott D.M., et al. Tracking the 2022 mpox outbreak in a globalized world // *The Lancet*. – 2022. – Vol. 400, No. 10358. – P. 1101-1103.
- 68.La Frazia S., Garbuglia A.R., Pauciullo S., et al. Genomic variability and immunological aspects involved in response to MPXV infection // *Frontiers in Pharmacology*. – 2025. – Vol. 16. – Art. 1665830.
- 69.Laidlaw S.M., Bilek N., Callaby H., et al. Detection of mpox and other orthopoxviruses using a lateral flow device as a point-of-care diagnostic // *Microbiology Spectrum*. – 2025. – Vol. 13, No. 4. – P. e0245624.
- 70.Lee C.H., Wu C.J., Chiang J.Y., et al. Chicken-Derived Single-Chain Variable Fragments Targeting Monkeypox Virus A29L Protein // *Biotechnology Journal*. – 2025. – Vol. 20, No. 2. – P. e202400634.
- 71.Li H., Zhao Q., Guo X., et al. A sensitive and specific sandwich ELISA for mpox virus detection based on monoclonal antibodies against A29L // *Virology Journal*. – 2024. – Vol. 21, No. 1. – P. 45.
- 72.Li M., Ren Z., Wang Y., et al. Three neutralizing mAbs induced by MPXV A29L protein recognizing different epitopes act synergistically against orthopoxvirus // *Emerging Microbes & Infections*. – 2023. – Vol. 12, No. 2. – P. 2223669.
- 73.Li Y., Olson V.A., Laue T., et al. Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays // *Journal of Clinical Virology*. – 2006. – Vol. 36, No. 3. – P. 194-203.
- 74.Kumar S., Guruparan D., Karuppanan K., Kumar K.J.S. Comprehensive Insights into Monkeypox (mpox): Recent Advances in Epidemiology, Diagnostic Approaches and Therapeutic Strategies // *Pathogens*. – 2025. – Vol. 14, No. 1. – Art. 1.
- 75.Liang C.Y., Chao T.L., Chao C.S., et al. Monkeypox virus A29L protein as the target for specific diagnosis and serological analysis // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2024. – Vol. 108, No. 1. – P. 522.

- 76.Lim C.K., Roberts J., Moso M., et al. Mpox diagnostics: Review of current and emerging technologies // *Journal of Medical Virology*. – 2023. – Vol. 95, No. 1. – P. e28429.
- 77.Mariotti D., Bettini A., De Carluccio C., et al. Effect of chemical and physical agents on monkeypox virus infectivity and downstream research applications // *Virology*. – 2024. – Vol. 592. – P. 109993.
- 78.Matho M.H., Schlossman A., Meng X., et al. Structural and functional characterization of anti-A27 antibodies directed against a conserved linear epitope of vaccinia virus // *Journal of Virology*. – 2012. – Vol. 86, No. 24. – P. 13678-13686.
- 79.Mbala-Kingebeni P., Rimoin A.W., Nkuba-Ndaye A., et al. Epidemiologic and clinical characteristics of mpox in children in the Democratic Republic of the Congo, 2023–2024 // *New England Journal of Medicine*. – 2024. – Vol. 391, No. 6. – P. 521-530.
- 80.Mitjà O., Alemany A., Marks M., et al. Mpox in people with advanced HIV infection: a global case series // *The Lancet*. – 2023. – Vol. 401, No. 10380. – P. 939-949.
- 81.Moss B. Membrane fusion during poxvirus entry // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2016. – Vol. 60. – P. 89-96.
- 82.Moss B. Origin of the poxviral membrane: A 50-year-old riddle // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2018. – Vol. 73. – P. 2-13.
- 83.Moss B. Poxviridae: The viruses and their replication // *Fields Virology* / eds. D.M. Knipe, P.M. Howley. – 6th ed. – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. – Vol. 2. – P. 2129-2159.
- 84.Mucker E.M., Lindquist M.E., Hooper J.W. Particle-specific neutralizing activity of a monoclonal antibody targeting the poxvirus A33 protein reveals differences between cell associated and extracellular enveloped virions // *Virology*. – 2020. – Vol. 544. – P. 42-54.
- 85.Mucker E.M., Wollen-Roberts S.E., Kuehnert M.J., et al. Serological cross-reactivity between orthopoxviruses: implications for mpox diagnostics // *Journal of Clinical Virology*. – 2024. – Vol. 170. – P. 105618.

86. Mukadi-Bamuleka D., Ariën K.K., et al. Field evaluation of a rapid antigen test for mpox in the Democratic Republic of the Congo and Uganda // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2026. – Vol. 26, Issue 3. – P. 215-217.
87. National Institute of Pathogen Biology, Chinese Academy of Medical Sciences. Development of monoclonal antibody-based methods for detecting mpox virus // *Biosafety and Health*. – 2026. – Vol. 8, Issue 2. – P. 86-95.
88. Nachega J.B., Mohr E.L., Dashraath P., Mbala-Kingebeni P. et al. Mpox in Pregnancy – Risks, Vertical Transmission, Prevention, and Treatment // *New England Journal of Medicine*. – 2024. – Vol. 391, No. 14. – P. 1267–1270.
89. Nachega J.B., Sam-Agudu N.A., et al. The surge of mpox in Africa: a call for action // *The Lancet Global Health*. – 2024. – Vol. 12, No. 7. – P. e1086–e1088.
90. Nachega J.B., Mohr E.L., Dashraath P., et al. Mpox in pregnancy – risks, vertical transmission, prevention, and treatment: a systematic review // *Clinical Infectious Diseases*. – 2024. – Vol. 79, No. 5. – P. 1123–1131.
91. Nash S.G., Hall V., Vusirikala A., et al. Mpox vaccine effectiveness after a single dose in England: a cohort study of 1.6 million individuals // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2024. – Vol. 24, No. 8. – P. 845–853.
92. Ogunbode O.A., Oladimeji A.M., Ogunbode O.O., Ogunbode A. Effectiveness of MVA-BN vaccine against mpox: a systematic review and meta-analysis // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2024. – Vol. 20, No. 1. – Art. 2403163.
93. Onishenko G.G., Kirillov I.A., Borisevich S.V., et al. Analysis of aerobiological studies with orthopoxviruses by U.S. Department of Defense // *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. – 2024. – Vol. 101, No. 3. – P. 399-411.
94. Orkin C., et al. Mpox in people living with HIV and CD4 counts <350 cells/mm³: a global case series [Электронный ресурс] // Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). – Seattle, WA, 2023. – Abstract № 173. –URL: https://www.natap.org/2023/CROI/croi_240.htm (дата обращения: 26.05.2026).
95. Osborn A.R., Moss B. Antigenic relationships among orthopoxviruses // *Virology*. – 1989. – Vol. 171, No. 2. – P. 552-560.

96. Otieno J.R., et al. Genomic characterization of monkeypox virus (MPXV) during the 2022 outbreak // *Virologica Sinica*. – 2024. – Vol. 39, No. 2. – P. 215-225.
97. Pande S., Sharma P.K., Gupta R.K., et al. Hybridoma technology: a versatile platform for monoclonal antibody production // *Antibodies*. – 2023. – Vol. 12, No. 4. – P. 62.
98. Petersen B.W., Damon I.K. Orthopoxvirus diagnostics: current challenges and future directions // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2023. – Vol. 61, No. 3. – P. e01362-22.
99. Rappazzo C.G., et al. Rapid isolation of potent neutralizing antibodies from patients with COVID-19 // *Journal of Experimental Medicine*. – 2021. – Vol. 218, No. 4. – P. e20201989.
100. Resch W., Weisberg A.S., Moss B. Vaccinia virus A27 protein forms a trimeric complex with A17 protein for virion morphogenesis // *Journal of Virology*. – 2005. – Vol. 79, No. 19. – P. 12318-12326.
101. Rimoin A.W., Muyembe J.J., Tamfum J.J., et al. Waning immunity and the resurgence of mpox in the Democratic Republic of the Congo // *New England Journal of Medicine*. – 2024. – Vol. 390, No. 2. – P. 152-161.
102. Sagripanti J.L., Hulse A.M., Roberts E.C., et al. Microbial inactivation for safe and rapid diagnostics of infectious samples // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2011. – Vol. 77, No. 20. – P. 7289-7295.
103. Savinkina A., Kindrachuk J., Bogoch I.I., Rimoin A.W., Hoff N.A., Shaw S.Y., Pitzer V.E., Mbala-Kingebeni P., Gonsalves G.S. Modelling vaccination approaches for mpox containment and mitigation in the Democratic Republic of the Congo // *Lancet Global Health*. – 2024. – Vol. 12, No. 12. – P.
104. Sanderson C.M., Smith G.L. The vaccinia virus A27L protein is required for the formation of mature virions // *Journal of General Virology*. – 1996. – Vol. 77, No. 7. – P. 1485-1494.
105. Schmidt F.I., Bleck C.K., Mercer J. Poxvirus cell entry: a new perspective // *Current Opinion in Virology*. – 2012. – Vol. 2, No. 1. – P. 32-38.

106. SD Biosensor. STANDARD Q Monkeypox Ag Test [Электронный ресурс]. – URL: https://www.sdbiosensor.com/product/product_view?product_no=238 (дата обращения: 19.05.2026).
107. Segeral O., Mbala P., Nkuba D., et al. Tecovirimat for the treatment of mpox (PALM007): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial in the Democratic Republic of the Congo // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2025.
108. Segeral O., Ndimubanzi P., Nkuba D., et al. Tecovirimat at a crossroads: What the PALM007 trial tells us // *Med*. – 2025. – Vol. 6, No. 8. – P. 100779.
109. Shen L., et al. Two long-lasting human monoclonal antibodies cross-react with monkeypox virus A35 antigen // *Cell Discovery*. – 2023. – Vol. 9. – P. 50.
110. Shi D., He P., Song Y., et al. Kinetic and Structural Aspects of Glycosaminoglycan–Monkeypox Virus Protein A29 Interactions Using Surface Plasmon Resonance // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27, No. 18. – P. 5898.
111. Shchelkunov S.N., Totmenin A.V., Babkin I.V., et al. Human monkeypox and smallpox viruses: genomic comparison // *FEBS Letters*. – 2001. – Vol. 509, No. 1. – P. 66-70.
112. Shchelkunov S.N. Orthopoxvirus genes that mediate disease virulence and host tropism // *Advances in Virology*. – 2012. – Vol. 2012. – Art. 524743.
113. Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Pyankov O.V., Agafonov A.P. Development of a fourth-generation smallpox vaccine // *Vaccine*. – 2023. – Vol. 41, No. 12. – P. 1987-1995.
114. Sino Biological. Monkeypox Virus A29L Antibody Pair ELISA Kit. – Beijing: Sino Biological, 2024.
115. Sklenovská N., Van Ranst M. Emergence of Monkeypox as the Most Important Orthopoxvirus Infection in Humans // *Frontiers in Public Health*. – 2018. – Vol. 6. – P. 241.
116. Smith G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface // *Science*. – 1985. – Vol. 228, No. 4705. – P. 1315-1317.

117. Stern D., Olson V.A., Smith S.K., et al. A new ELISA for the detection of antibodies against orthopoxviruses based on a recombinant A29L antigen // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13, No. 6. – P. 1124.
118. Sun H., Miao Y., Yang X., et al. Rapid identification of A29L antibodies based on mRNA immunization and high-throughput single B cell sequencing to detect Monkeypox virus // *Emerging Microbes & Infections*. – 2024. – Vol. 13, No. 1. – P. 2337666.
119. Taha T.Y., Townsend M.B., Pohl J., et al. Design and Optimization of a Monkeypox virus Specific Serological Assay // *Pathogens*. – 2023. – Vol. 12, No. 3. – P. 396.
120. Tarte K., Klein B. FACS-based enrichment of antigen-specific B cells for hybridoma generation // *Journal of Immunological Methods*. – 2023. – Vol. 520. – P. 113550.
121. Therrien C., et al. Development and validation of a highly specific in-house chemiluminescent-based serological assay for the detection of antibodies directed against the human monkeypox virus // *Journal of Virological Methods*. – 2023. – Vol. 322. – P. 114836.
122. Thornhill J.P., Barkati S., Walmsley S., et al. Monkeypox virus infection in humans across 16 countries // *New England Journal of Medicine*. – 2022. – Vol. 387, No. 8. – P. 679-691.
123. United Nations Children's Fund (UNICEF). Monkeypox outbreak response in DRC: situation report [Электронный ресурс]. – New York: UNICEF, 2024. – URL: <https://www.unicef.org/drc> (дата обращения: 18.05.2026).
124. Vakaniaki E.H., Kacita C., Kinganda-Lusamaki E., et al. Sustained human outbreak of a new MPXV clade I lineage in eastern Democratic Republic of the Congo // *Nature Medicine*. – 2024. – Vol. 30. – P. 2791-2795.
125. Van Blerk N., De Baetselier P. Evaluation of ELISA formats for antigen detection // *Journal of Immunological Methods*. – 2023. – Vol. 520. – P. 113545.
126. Vázquez M.I., Esteban M. Identification of a vaccinia virus A27L protein with a role in virus entry // *Virology*. – 1998. – Vol. 242, No. 2. – P. 263-273.

127. Vernuccio R., Guardado-Calvo P. Neutralization determinants on poxviruses // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15, No. 12. – P. 2396.
128. Wang D.R., Wu Y.F., Wu Y.H., et al. Vaccinia viral protein A27 is anchored to the viral membrane via a cooperative interaction with viral membrane protein A17 // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289, No. 10. – P. 6639-6655.
129. Wang L., Shang J., Weng S., et al. Genomic annotation and molecular evolution of monkeypox virus outbreak in 2022 // *Journal of Medical Virology*. – 2023. – Vol. 95, No. 1. – P. e28236.
130. Wang X., Zhang Y., Li T., Liu W. The role of heparan sulfate binding domain in orthopoxvirus attachment // *Journal of Virology*. – 2018. – Vol. 92, No. 15. – P. e00455-18.
131. World Health Organization. Diagnostic testing and testing strategies for mpox: interim guidance, 12 November 2024 [Электронный ресурс] // WHO. – Geneva, 2024. – (WHO reference number: B09166). – 28 p. – URL: <https://www.who.int/publications/i/item/B09166> (дата обращения: 19.05.2026).
132. World Health Organization. Mpox no longer a global public health emergency, WHO declares [Электронный ресурс] // WHO. – Geneva, 2025. – 5 September. – URL: <https://www.who.int/news/item/05-09-2025-mpox-no-longer-a-global-public-health-emergency> (дата обращения: 19.05.2026).
133. World Health Organization. WHO Director-General declares mpox outbreak a public health emergency of international concern [Электронный ресурс] // WHO. – Geneva, 2024. – 14 August. – URL: <https://www.who.int/news/item/14-08-2024-who-director-general-declares-mpox-outbreak-a-public-health-emergency-of-international-concern> (дата обращения: 19.05.2026).
134. Yan H., Yang M., Liu X., et al. A rapid and sensitive fluorescent chromatography with cloud system for MPXV point-of-care diagnosis // *Analytica Chimica Acta*. – 2024. – Vol. 1304. – P. 342514.
135. Yang Y., Niu S., Shen C., et al. Longitudinal viral shedding and antibody response characteristics of men with acute infection of monkeypox virus: a

- prospective cohort study // Nature Communications. – 2024. – Vol. 15, No. 1. – P. 4488.
136. Zhao F., Xu F., Wang X., et al. A field diagnostic method for rapid and sensitive detection of mpox virus using recombinase-aid amplification and lateral flow strip // Journal of Medical Virology. – 2024. – Vol. 96, No. 2. – P. e29485.
137. Zhu W., Zhang M., Zhang M., et al. The Generation and Characterization of Monoclonal Antibodies against the MPXV A29L Protein // Viruses. – 2024. – Vol. 16, No. 8. – P. 1184.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ А

ПАСПОРТ КОЛЛЕКЦИОННОГО ШТАММА МИКРООРГАНИЗМОВ

E. coli BL21(DE3)/PET28B-AGPOX

ФБУН ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И
БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР» РОСПОТРЕБНАДЗОРА

ПАСПОРТ

Коллекционного штамма микроорганизма

Номер штамма: *B-1594*

Дата поступления: *18.08.23*

1. Видовое название культуры: *Escherichia coli*
2. Номер и наименование штамма: *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET28b-AgPOX
3. Родословная штамма: получен рекомбинационным путем из штамма *Escherichia coli* BL21(DE3)
4. Способ получения штамма трансформация плазмидой pET28b-AgPOX реципиентных клеток *Escherichia coli* BL21(DE3)
5. Кто (ФИО) и где (организация и ее адрес) идентифицировал микроорганизм (данные, на основании которых было сделано заключение о родовой/видовой принадлежности должны прилагаться к паспорту: Тюрин Виталий Юрьевич, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
6. Литературная ссылка - Методика трансформации: Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. - М.: Мир, 1984. - С.239-244.
7. Культурально-морфологические особенности штамма: при культивировании на агаризованной среде LB штамм образует полупрозрачные, круглые, с ровным краем колонии, клетки штамма представляют собой подвижные палочки с расположением по 1-2, размером 0.5x1.5-2.5 мкм
8. Область применения штамма: клиническая лабораторная диагностика, продуцент рекомбинантного искусственного мозаичного белка AgPOX для иммунизации животных при получении поликлональных и моноклональных диагностических антител к вирусу оспы обезьян
9. Продукт, синтезируемый штаммом – белок AgPOX
10. Активность (продуктивность) штамма (с указанием условий культивирования) и другие производственные показатели: в рекомбинантном штамме происходит эписомальная репликация плазмиды pET28b-AgPOX, количество копий составляет примерно 25-150 копий на клетку. Штамм обеспечивает продукцию рекомбинантного белка AgPOX в количестве 5-10 мг с 1 гр биомассы (при выделении

ПРИЛОЖЕНИЕ А

ПАСПОРТ КОЛЛЕКЦИОННОГО ШТАММА МИКРООРГАНИЗМОВ

E. coli BL21(DE3)/pET28b-AgPOX (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



Рис.3 Электрофореграмма в 1,5%-ном агарозном геле плазмиды pET28b-AgPOX.

MW – маркер молекулярного веса 1Kb (Сибэнзим).

1 дорожка – гидролиз рестриктазами XhoI, XbaI, AgeI, фрагменты 5165, 1216, 353 п.н.

2 дорожка – гидролиз рестриктазами PvuI, MluI, BamHI, фрагменты 3297, 2547, 890 п.н.

«__»____ 2023 г.	Должность и место работы (организация, отдел) депозитора: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Подпись /Ф.И.О./
Авторы штамма.	Тюрин В.Ю. Максютов А.З. Пьянков С.А. Шульгина И.С. Тишин А.Е. Иматдинов И.Р.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

ПАСПОРТ КОЛЛЕКЦИОННОГО ШТАММА МИКРООРГАНИЗМОВ

E. COLI ROSETTA2/pET-32(a)-A29L

ФБУН ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И
БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР» РОСПОТРЕБНАДЗОРА

ПАСПОРТ Коллекционного штамма микроорганизма

Номер штамма: *6-1593*

Дата поступления: *20.04.2023*

1. Видовое название культуры: *Escherichia coli*
2. Номер и наименование штамма: *Escherichia coli Rosetta2/pET-32(a)-A29L*
3. Родословная штамма: получен рекомбинационным путем из штамма *Escherichia coli Rosetta2*.
4. Способ получения штамма трансформация плазмидой pET-32(a)-A29L реципиентных клеток *Escherichia coli* МН1
5. Кто (ФИО) и где (организация и ее адрес) идентифицировал микроорганизм (данные, на основании которых было сделано заключение о родовой/видовой принадлежности должны прилагаться к паспорту: Бауэр Татьяна Валерьевна, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
6. Литературная ссылка - Методика трансформации: Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. - М.: Мир, 1984. - С.239-244.
7. Культурально-морфологические особенности штамма: при культивировании на агаризованной среде LB штамм образует полупрозрачные, круглые, с ровным краем колонии, клетки штамма представляют собой подвижные палочки с расположением по 1-2, размером 0.5x1.5-2.5 мкм
8. Область применения штамма: клиническая лабораторная диагностика, продуцент белка Tgх-A29 для иммунизации животных при получении поликлональных и моноклональных диагностических антител к вирусу оспы обезьян
9. Продукт, синтезируемый штаммом – белок Tgх-A29
10. Активность (продуктивность) штамма (с указанием условий культивирования) и другие производственные показатели: в рекомбинантном штамме происходит репликация плазмиды pET-32(a)-A29L, количество копий составляет примерно 200 копий на клетку. Штамм обеспечивает продукцию плазмиды pET-32(a)-A29L в количестве 5 мг с 1 гр биомассы (при выделении методом аффинной хроматографии). При индукции синтеза белка Tgх-A29 с использованием ИПТГ с 100 мл биомассы выход белка составляет 732 нг/мкл при элюции в 2 мкл буфера.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

ПАСПОРТ КОЛЛЕКЦИОННОГО ШТАММА МИКРООРГАНИЗМОВ

E. COLI ROSETTA2/pET-32(A)-A29L (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

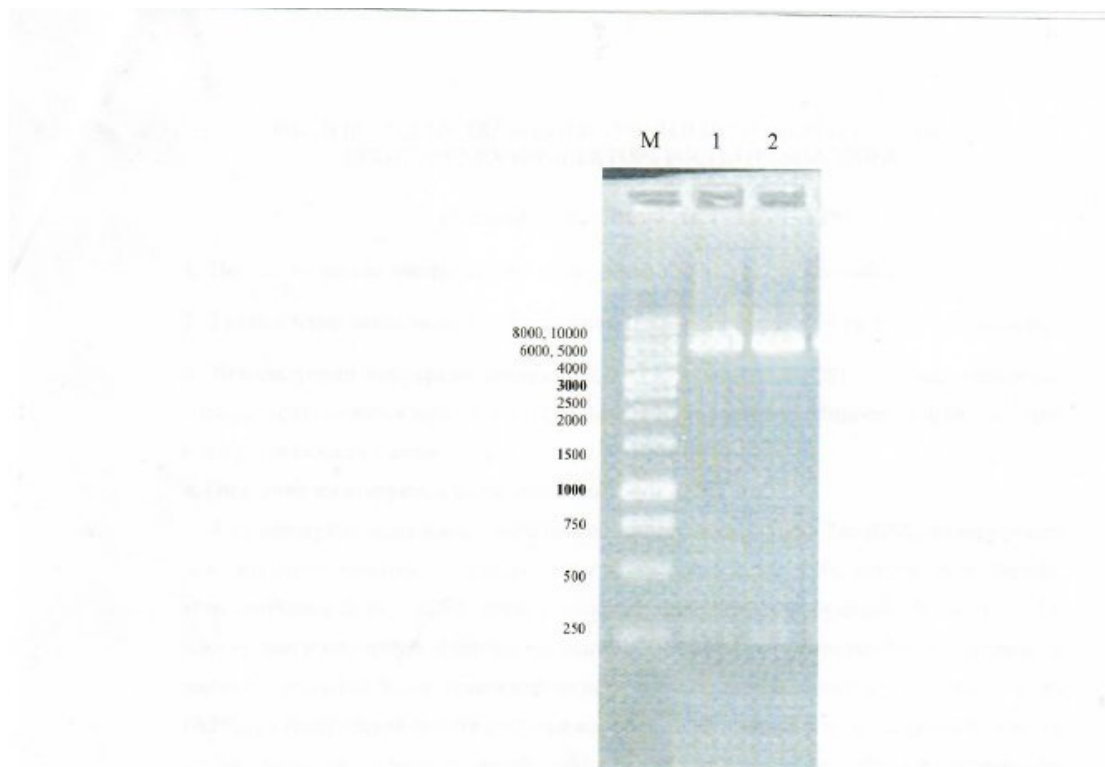


Рис. 3. Результат электрофоретического разделения в 1,2 % агарозном геле продуктов гидролиза рекомбинантной плазмиды pET-32(a)-A29L эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI, *Hind*III.

М: маркер длин ДНК 1 Кб («СибЭнзим», Россия);

1-2: плазида pET-32(a)-A29L, гидролизованная по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI, *Hind*III (270 п.н., 5857 п.н.).

«__» _____ 2023 г.	Должность и место работы (организация, отдел) депозитора: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Подпись /Ф.И.О./
Авторы штамма.	Бауэр Т.В. <i>[Signature]</i> Трегубчик Т.В. <i>[Signature]</i> Пьянков С.А. <i>[Signature]</i> Драчкова И.А. <i>[Signature]</i>

ПРИЛОЖЕНИЕ В

АКТ ТЕХНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ *IN VITRO*

Общество с ограниченной ответственностью «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
125367, г. Москва, ул. Полесский проезд, д. 2, корп. 1
Тел.: (495) 942-53-39.

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



Варнавичус П.К.

«06» ноября 2025 г.

М.П.

АКТ ОЦЕНКИ РЕЗУЛЬТАТОВ ТЕХНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO*

№ ВМ-10-27/25 от 06.11.2025 г.

Набор реагентов для иммуноферментной диагностики оспы обезьян по специфическому антигену белка А29L вируса оспы обезьян «Вектор ИФА ВОО-А29L АГ» по ТУ 20.59.52-117-05664012-2025.

Составлен сотрудниками испытательной лаборатории общества с ограниченной ответственностью «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР», 125367, Россия, г. Москва, Полесский проезд, д.2, корп. 1, пом. 3. Тел.: +7(495) 942-53-39.

Место проведения испытаний:

Технические испытания проведены по адресу: Испытательная лаборатория ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР», 125367, г. Москва, Полесский проезд, д. 2, корп. 1, помещение 3 (аттестат аккредитации испытательной лаборатории: RA.RU.21АД23);

Полномочия на проведение испытаний, аккредитация на техническую компетентность и независимость для проведения работ по испытаниям: аттестат аккредитации испытательной лаборатории ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР» № RA.RU.21АД23, выдан 27.01.2016 г., без указания срока действия. Область аккредитации приведена на соответствующих интернет-ресурсах Федеральной Службы по аккредитации.

1. В период с «24» октября 2025 г. по «06» ноября 2025 г. сотрудниками испытательной лаборатории ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР» проведены технические испытания МИ для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для иммуноферментной диагностики оспы обезьян по специфическому антигену белка А29L вируса оспы обезьян «Вектор ИФА ВОО-А29L АГ» по ТУ 20.59.52-117-05664012-2025, производства ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, в соответствии с ТУ 20.59.52-117-05664012-2025, на соответствие требованиям ТУ 20.59.52-117-05664012-2025 и требованиям ГОСТ Р 51352-2013, ГОСТ Р 51088-2013, ГОСТ Р ИСО 23640-2024, ГОСТ Р ИСО 18113-1-2024*, ГОСТ Р ИСО 18113-2-2024, Постановления Правительства Российской Федерации от 30 ноября 2024 г. № 1684 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий», Постановления Правительства России от 01.04.2022 г. №552 «Об утверждении особенностей обращения, включая особенности государственной регистрации, медицинских изделий в случае их дефектуры или риска возникновения дефектуры в связи с

Акт № ВМ-10-27/25 от 06.11.2025 г.

Лист 1

Всего листов 5

Не допускается частичная или полная перепечатка настоящего акта и приложений к нему без разрешения испытательной лаборатории

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Экз. № 1

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия
человека

Код ОКПД2 20.59.52.195

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора



А.П. Агафонов

«24» июня 2025 г.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Набор реагентов для иммуноферментной диагностики оспы обезьян по специфическому
антигену белка A29L вируса оспы обезьян
«Вектор ИФА ВОО-A29L АГ»

Технические условия
ТУ 20.59.52-117-05664012-2025

Вводятся впервые

Дата введения в действие —
«24» июня 2025 г.
Без ограничения срока
действия

2025 г.

Подпись и дата	Имя, № дубл.	Взамен ив. №	Подпись и дата	Имя, № подл.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

ПЕРВАЯ СТРАНИЦА УТВЕРЖДЕННОЙ ИНСТРУКЦИИ

ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

«ВЕКТОР ИФА ВОО-A29L АГ»

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"

Роспотребнадзора



А.П. Агафонов

«_____» _____ 2025 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментной
диагностики оспы обезьян по специфическому антигену белка A29L
вируса оспы обезьян «Вектор ИФА ВОО-A29L АГ»
по ТУ 20.59.52-117-05664012-2025»

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

ПАТЕНТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
№ 2854854

Моноклональное антитело A29L-7 и тест-система для выявления антигена вируса оспы обезьян с его использованием

Патентообладатель: *Федеральное бюджетное учреждение науки "Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора) (RU)*

Авторы: *Агафонов Александр Петрович (RU), Бауэр Татьяна Валерьевна (RU), Боднев Сергей Александрович (RU), Драчкова Ирина Альбертовна (RU), Колосова Ирина Валерьевна (RU), Максютков Амир Закиевич (RU), Овчинникова Алена Сергеевна (RU), Одношевский Дмитрий Александрович (RU), Пьянков Олег Викторович (RU), Пьянков Степан Александрович (RU), Рыбель Анна Вячеславовна (RU), Трегубчик Татьяна Владимировна (RU), Тюрин Виталий Юрьевич (RU), Шульгина Ирина Сергеевна (RU)*

Заявка № **2024132376**

Приоритет изобретения **28 октября 2024 г.**

Дата государственной регистрации

в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **21 января 2026 г.**

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает **28 октября 2044 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Ю.С. Зубов



ПРИЛОЖЕНИЕ И

АКТ ПЕРЕДАЧИ ОБРАЗЦОВ НА ТЕРРИТОРИИ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

А К Т ПЕРЕДАЧИ ПАТОГЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ I - II ГРУПП ВНУТРИ ПОДРАЗДЕЛЕНИЯ И ПБА III - IV ГРУПП (КУЛЬТУР, ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ И ВИРУСОВ) ВНУТРИ ОРГАНИЗАЦИИ

Наименование ведомства - Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Российская Федерация); НИИ прикладной биологии Гвинеи (IRBAG), п. Киндия, Республика Гвинея
Наименование учреждения – Научный клинико-диагностический центр эпидемиологии и микробиологии (C.R.E.M.S.) в Гвинейской Республике; Лабораторный комплекс Российско-Гвинейского научно-исследовательского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней, п. Киндия, Республика Гвинея

1	Наименование подразделения (отдела, отделения, лаборатории, временного формирования), передающего ПБА	Комната № 13а (боксированное помещение), для первичной пробоподготовки
2	Наименование подразделения (отдела, отделения, лаборатории, временного формирования), получающего ПБА	Комната №10, для проведения ИФА-диагностики
3	Дата передачи ПБА	06.04.26
4	Передаваемый ПБА	<i>Orthopoxvirus</i> Вирус оспы обезьян штамм –неизвестен 121 пробирка, обеззаражены термической обработкой (кипячение при 98-99°C, 30 минут)
5	Должность, фамилия, имя, отчество (последнее при наличии), подпись лица, передавшего ПБА	В.н.с. ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Карташов Михаил Юрьевич
6	Должность, фамилия, имя, отчество (последнее при наличии), подпись лица, получившего ПБА	М.н.с. ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Шульгина Ирина Сергеевна
7	Руководитель подразделения, передавшего ПБА, фамилия, имя, отчество (последнее при наличии), подпись	Начальник смены ФКУН НИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора Скаленко Сергей Юрьевич

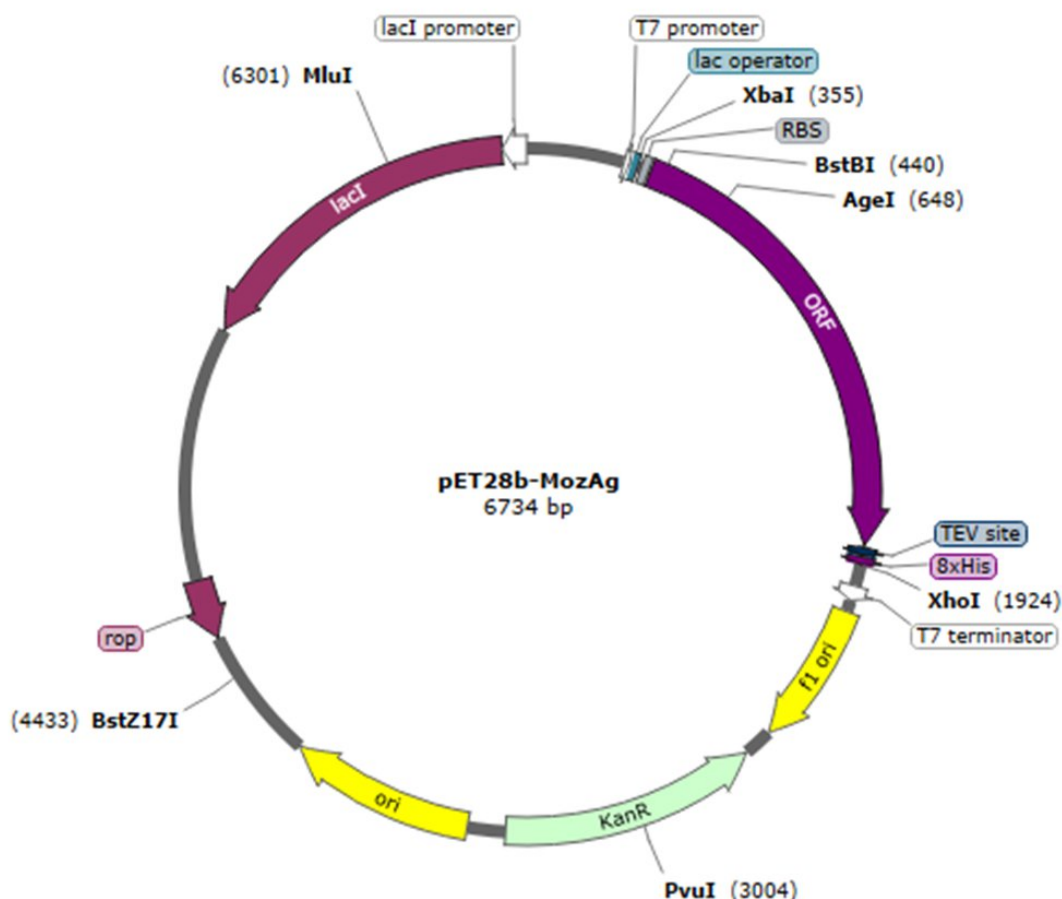
Проведено в присутствии:
М.н.с. отдела биобезопасности
ФКУН НИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора



Антонова Т.С.

ПРИЛОЖЕНИЕ К

ПЛАЗМИДНАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ pET28b-MozAg, ОБЕСПЕЧИВАЮЩАЯ ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКА AGROX КЛЕТКАМИ ШТАММА- ПРОДУЦЕНТА *ESCHERICHIA COLI* BL21(DE3)/pET28b-AGROX

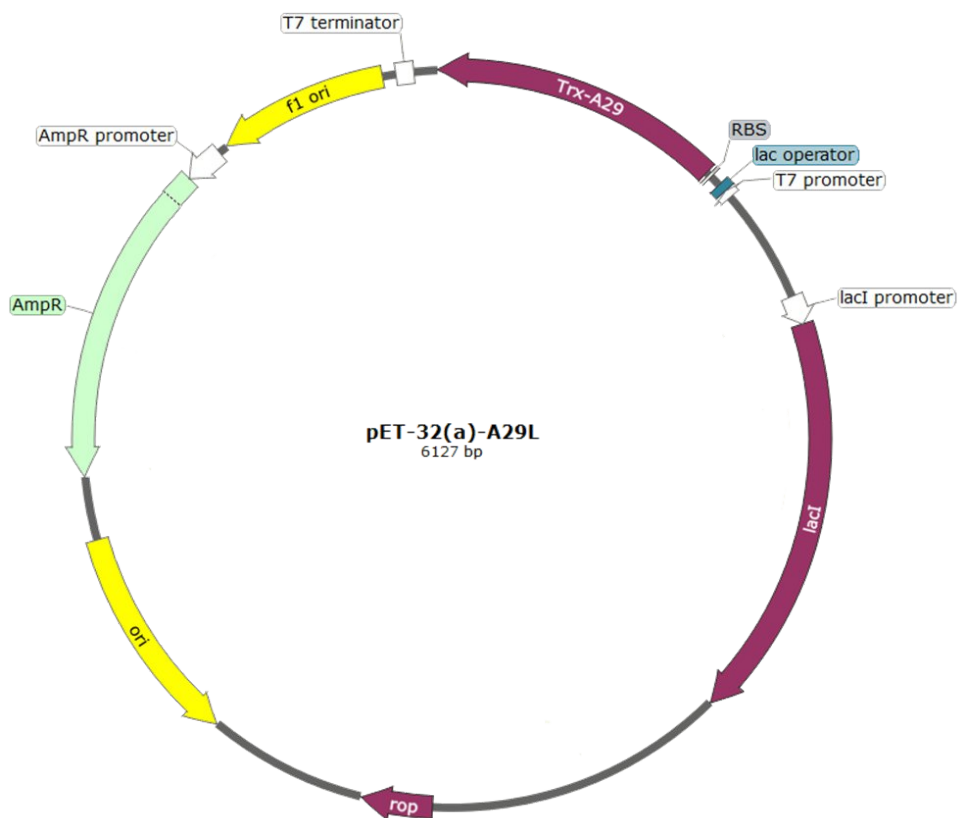


Примечание: – T7 promoter с координатами 309 – 327 п.н., нуклеотидная последовательность промотора бактериофага T7, необходимая для *in vitro* транскрипции целевого гена; lac operator, с координатами 328 – 352 п.н., лактозный оператор, обратима связывающий белок-репрессор и ингибирующий транскрипцию целевого гена; RBS, сайт связывания рибосомы гена 10 бактериофага T7, имеющий координаты 367 – 389 п.н., повышающий эффективность трансляции целевого гена; ORF, открытая рамка считывания гена MozAg, имеющая координаты 397 – 1920 п.н. и включающая в себя: нуклеотидную последовательность, кодирующую белок MozAg с координатами 397 – 1857 п.н., поли-линкер GSC с координатами 1858 – 1866

п.н., сайт отщепления TEV протеазы с координатами 1867 – 1887 п.н. и 8xHis метку с координатами 1894 – 1917 п.н.; T7 terminator бактериофага с координатами 1987 – 2034 п.н., нуклеотидная последовательность которого необходима для *in vitro* транскрипции; *f1 ori*, точка начала репликации фага *f1* с координатами 2071 – 2526 п.н.; KanR – нуклеотидная последовательность, кодирующая аминогликозид 3'-фосфотрансфераза, обеспечивающая устойчивость к антибиотику канамицину и имеющая координаты с 2619 по 3434 п.н.; *ori* – точка начала репликации высококопийной плазмиды pET28b, имеющая координаты с 3556 по 4144 п.н.; *rop* – нуклеотидная последовательность, кодирующая белок Rop, поддерживающий низкое количество копий плазмид и имеющая координаты с 4574 по 4765 п.н.; *lacI*, последовательность, кодирующая лактозный белок-репрессор, и имеющая координаты с 5574 по 6665 п.н. и находящаяся под контролем промотора *lacI promoter* с координатами с 6657 по 6734 п.н.

ПРИЛОЖЕНИЕ Л

ПЛАЗМИДНАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ pET-32(A)-A29L, ОБЕСПЕЧИВАЮЩАЯ ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКА TRX-A29 КЛЕТКАМИ ШТАММА- ПРОДУЦЕНТА *ESCHERICHIA COLI* ROSETTA2/pET-32(A)-A29L



ПРИЛОЖЕНИЕ М

АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ БЕЛКА AGPOX

```

MKHHHHHHHHHSGGENLYTQSGS
I_____A36R(107-130)_____I_____J9R(142-166)_____I
GSAYILHSDYKSFEDAKANCAAESGPGLSGSTPETISEKPEDIDNSNCSS
I_____A29L(24-43)_____I_____A4L(93-108)_____I
GPGAAKNPETKKREAIVKAYGDDNGPGLPSSTAPVLKPRQQTNGPG
I_____F8L(11-31)_____I_____I3L(38-61)_____I
ETKKAISDTRLKTLDHIYNESGPGVKDNEVMQEKRDVVIVNDDPDHYK
I_____I3L(104-122)_____I_____P4a(210-234)_____I
GPGALWDSKFFIELENKNVEYVGPGVRQYITAQDQPRFDITYNITDAARH
I_____P4a(259-287)_____I
GPGIMYEQYFVNDYDRVPIYYNGNRVIYNDEIGPG
I_____M137R(122-145)_____I_____A36R(110-130)_____I
ELLISYDKACACIKLNLYKVAILPGPGYILHSDYKSFEDAKANCAAES
I_____A4L(93-108)_____I_____I3L(104-122)_____I
GPGLPSTAPVLKPRQQTNGPGALWDSKFFIELENKNVEYVGPG
I_____M137R(124-145)_____I_____J9R(143-163)_____I
LISYDKACACIKLNLYKVAILPGPGSGSTPETISEKPEDIDNSNGPG
I_____F8L(13-29)_____I_____P4a(212-231)_____I
KKAISDTRLKTLDHIYNGPGQYITAQDQPRFDITYNITDAGPG
I_____A29L(24-43)_____I_____I3L(40-59)_____I
AAKNPETKKREAIVKAYGDDNGPGDNEVMQEKRDVVIVNDDPDHGPG
I_____P4a(259-287)_____I
IMYEQYFVNDYDRVPIYYNGNRVIYNDEIGPG

```

Примечание – Розовым цветом обозначена аффинная 8xHis-метка; зеленым цветом – сайт распознавания TEV-протеазы; серым цветом – полилинкерная последовательность. Синие буквы – уникальные аминокислотные остатки антигенов ВОО

ПРИЛОЖЕНИЕ Н

АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ БЕЛКА TRX-A29

MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIA
DEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVG
ALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMMMMSSGLVPRGSGMKETAA
AKFERQHMDSPDLGTDDDDKAMADIGSDGTLFPGDDDLAIPATEFF
STKAAKNPETKREAIVKAYGDDNEETLKQRLTNLEKKITNITTKFEQ
IEKCCRNDVFLFRLEKLAAALENNNNNN

Примечание – Не окрашена последовательность белка Trx. Голубым цветом обозначен сигнальный пептид; зеленым цветом – гепарин-связывающий домен (HBD); сине-зеленым цветом – линкер; желтым цветом – спирально-спиральный домен (CCD). Фиолетовым цветом обозначена 6xHis метка. Серым цветом обозначен сайт распознавания эндонуклеазы рестрикции HindIII. Красным цветом выделены аминокислотные остатки, уникальные для ВОО. Подчеркнута последовательность, имеющаяся в составе белка AgPOX