

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

УДК 614.455

Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Азаев М.Ш., Филатов П.В.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПРОЯВЛЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗА В АВТОНОМНОМ НАБОРЕ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ОРТОПОКСВИРУСОВ

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 630559, Новосибирская область, Россия, р.п. Кольцово

Цель работы – создание чувствительного, быстрого и простого в применении иммунохимического теста для выявления ортопоксвирусов в формате «у постели больного». **Задачами исследования** являлись: отработка технологии приготовления и применения проявителя конъюгатов коллоидного золота в автономных диагностических системах на основе плоских белковых матриц, а также апробация этой технологии при выявлении вируса осповакцины. Проведена оценка качества доступных сортов реагентов (метола, лимонной кислоты и нитрата серебра) для изготовления проявляющей системы; отобраны наиболее пригодные варианты. Отработана технология приготовления проявителя, включающего сухой компонент в виде таблеток (3,5–4 мг), содержащих метол и лимонную кислоту в соотношении 2:3, и жидкий компонент – 0,4% раствор нитрата серебра. Для повышения контрастности и стабильности оптических сигналов предложено использовать обработку проявленной белковой матрицы щелочным раствором тиоуреа. Применение двухкомпонентного проявителя позволяет проводить выявление вируса осповакцины во внелaborаторных условиях с чувствительностью $5,4 \times 10^4$ БОЕ/мл.

Ключевые слова: ортопоксвирусы; диагностика; дот-иммуноанализ; коллоидное золото; проявление и усиление сигнала.

Для цитирования: Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Азаев М.Ш., Филатов П.В. Оптимизация условий проявления результатов дот-иммуноанализа в автономном наборе для выявления ортопоксвирусов. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2019; 24(2): 77–83. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1560-9529-2019-24-2-77-83>.

Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Azaev M.Sh., Filatov P.V.

OPTIMIZATION OF THE CONDITIONS FOR THE DEVELOPMENT OF THE RESULTS OF THE DOT-IMMUNOASSAY IN AN AUTONOMOUS KIT FOR THE DETECTION OF ORTHOPOXVIRUSES

Federal Budgetary Research Institution - State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», 630559, Kol'tsovo, Novosibirsk region, Russia

The aim of the work is to create a sensitive, fast and easy-to-use immunochemical assay for the detection of orthopoxviruses in the “point of care” format. The objectives of the study included: the fine-tuning of technology of preparation and use of the developer for colloidal gold conjugates in autonomous diagnostic systems based on flat protein matrices, as well as testing of this technology for detecting vaccinia virus. The quality of available reagents (metol, citric acid and silver nitrate) for the manufacture of the developing system was assessed: the most suitable reagents were selected. A technology has been fine-tuned for the preparation of a developer. The developer includes the dry component in the form of tablets (3.5–4 mg) containing metol and citric acid in a ratio of 2:3, and the liquid component — 0.4% silver nitrate solution. To increase the contrast and stability of optical signals, it was proposed to use the processing of the developed protein matrix with an alkaline solution of thiourea. The use of a two-component developer allows the detection of vaccinia virus in non-laboratory conditions with a sensitivity of 5.4×10^4 PFU/ml.

Key words: orthopoxviruses; diagnostics; dot-immunoassay; colloidal gold; optical signal develop and amplification.

For citation: Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Azaev M.Sh., Filatov P.V. Optimization of the conditions for the development of the results of the dot-immunoassay in an autonomous kit for the detection of orthopoxviruses. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni (Epidemiology and Infectious Diseases, Russian journal)*. 2019; 2019; 24(2): 77–83. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1560-9529-2019-24-2-77-83>.

For correspondence: *Mamedyar Azaev*, Dr .Biol., Assoc. Prof., Head of the Department of scientific and methodological training of doctors and biologists to work with pathogens of high-risk viral infections of Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, «State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”», 630559, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation. E-mail: azaev@vector.nsc.ru

Information about authors:

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

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

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

Conflict of interests. The authors declare the absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 30.04.2019

Accepted 15.07.2019

Для корреспонденции: *Азаев Мамедьяр Шакирович*, доцент, доктор биол. наук, зав. отделом ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, E-mail: azaev@vector.nsc.ru

Введение

Исчезновение популяционного иммунитета к вирусу натуральной оспы как следствие отмены оспопрививания населения привело к увеличению заболеваний, вызываемыми другими патогенными для человека ортопоксвирусами, такими как вирус оспы обезьян, не только в естественном ареале их циркуляции, но и в неэндемичных для них регионах. Кроме того, такое положение создает угрозу преднамеренного высвобождения и использования вируса натуральной оспы или его модифицированных вариантов в качестве биологического оружия или агента биотеррора [1, 2]. Быстрая диагностика таких заболеваний имеет большое значение, поскольку от нее зависит скорость принятия решений по предотвращению распространения болезни и, в конечном итоге, эффективность профилактических, лечебных и карантинных мероприятий. Диагноз инфекции может быть подтвержден лабораторными методами, основанными на выявлении ДНК вируса или родоспецифических антигенов. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), в том числе его экспрессные варианты, чрезвычайно чувствительны [3], однако, выполнение ПЦР-анализа требует строго контролируемых лабораторных условий, дорогостоящего оборудования и реагентов [4].

Иммунохимические тесты менее чувствительны, чем ПЦР. Обычно они позволяют регистрировать специфические антигены в концентрациях свыше 0,1 нг/мл. Однако даже такая чувствительность может быть достаточна для регистрации возбудителя и постановки диагноза [5]. При этом, низкая чувствительность иммунодиагностики в значительной степени компенсируется оперативностью получения результатов и меньшей, чем ПЦР, прихотливостью к условиям выполнения анализа [6].

Ранее мы сообщали о разработке платформы иммунохимического теста на плоских белковых матрицах. Такие тесты чувствительны, полностью укомплектованы, не требуют энергообеспечения, снабжены встроенными контролями, просты в применении, выполняются оперативно и позволяют проводить визуальный учет результатов [7, 8]. Эти тесты основаны на дот-иммуноанализе с использованием иммунозолей золота и регистрацией результатов с помощью «золото-серебряного» усиления оптического сигнала.

Важную роль в регистрации сигнала играет операция проявления золей золота. Ранее показано, что наилучшие результаты усиления оптического сигнала обеспечивают проявители на основе метола [9]. Однако с широким распространением цифровой фотографии повсеместно резко сократилось производство химреактивов для обработки фотоматериалов на основе серебра и, в частности,

метола. В период 2010 – 2013 гг. метол исчез из каталогов отечественных и зарубежных производителей химикатов. В 2014 г. этот реактив вновь появился на рынке в нескольких модификациях, отличающихся от предлагаемых ранее. В связи с этим возникла необходимость оценки характеристик и выбора реагентов, наиболее подходящих для приготовления проявителя.

Цель работы: во-первых, оценка доступных реагентов для приготовления проявителя, во-вторых, отработка технологии применения проявителя в автономных системах и, в-третьих, апробация этой технологии при использовании набора для экспрессного выявления поксвирусов.

Материалы и методы

Реактивы. В работе использовали реактивы, приобретенные в фирме Sigma-Aldrich, и отечественные реактивы с квалификацией не ниже «чда».

Биокомпоненты. Вирус осповакцины (ВОВ), штамм 14 ЛИВП. Вирус культивировали на перевиваемой культуре клеток почки африканской зеленой мартышки (линия 4647) с использованием ростовой питательной среды ДМЕМ, содержащей 2% телячьей эмбриональной сыворотки. После достижения максимального цитопатического эффекта инфицированные клетки разрушали трехкратным замораживанием – оттаиванием и однократной обработкой ультразвуком. Вирусный материал осаждали центрифугированием при 14 000 об/мин в течение 2 ч при 4 °С. Инфекционный титр вируса определяли безагарозным методом бляшек на культуре клеток 4647. Биологическая активность препарата ВОВ составляла $6,9 \times 10^8$ БОЕ/мл.

At1 – антитела класса IgG из гипериммунной по ВОВ сыворотки кролика и At2 – антитела класса IgG из нормальной сыворотки кролика выделяли осаждением с помощью сульфата аммония [10].

Иммунозоль (конъюгат). Получение золя золота (размер частиц 15 – 17 нм) восстановлением тетрахлорзолотой кислоты цитратом натрия, определение дозы нагрузки золя At1 в коагуляционном тесте и процедуру нагрузки проводили, как описано ранее [11]. Дополнительную стабилизацию золя выполняли добавлением бычьего сывороточного альбумина (БСА) до 1%. Очистку иммунозоля проводили центрифугированием при 15000 g в течение 30 мин при 4 °С. Таким образом получен золь Au-At1.

Белковые матрицы. Подложки белковых матриц вырубали с применением типографского пресса из синтетической бумаги на основе поливинилхлорида (ПВХ) Pentaprint марки PR-M480/09-07/8101-2D8 (Klöckner Pentaplast, Германия). Подложки отмывали дистиллированной водой и высушивали. Иммунореагенты захвата, разведенные

на 5 мМ боратном буферном растворе (рН 6,0) наносили на лицевую сторону [12] каждой подложки аликвотами по 2 мкл. В верхней части белковой матрицы (тестовая зона) наносили специфические антитела Ат1, в средней части (зона отрицательного контроля) – антитела нормальной сыворотки Ат2, а в нижней (зона положительного контроля) – вирусный препарат ВОВ. Рабочие разведения иммунореагентов подбирали эмпирически. Матрицы высушивали в течение 20 ч при 50 °С, блокировали погружением на 2 ч в 0,2% раствор казеина на 0,01 М фосфатном буферном растворе (рН 7,4), тщательно просушивали и использовали в работе.

Аналитические ванны. Анализ выполняли в полипропиленовых аналитических ваннах, заполненных готовыми растворами, за исключением ячеек одного из рядов, содержащих по одной таблетке (3,5–4,0 мг) сухого компонента физического проявителя (смесь метола и лимонной кислоты в соотношении 2:5). Для отмывок использовали ФСБ-Т (0,02 М натрий-фосфатный буферный раствор с 0,8% NaCl, 0,1% твина 20 и 0,1% азида натрия, рН 7,2) и бидистиллированную воду; для разведения образцов – ФСБ-Т с 0,02% казеина, рН 8,0; для разведения иммунозоль – ФСБ-Т с 0,02% полиэтиленгликоля (20 000 кДа), рН 7,4. При получении проявителя в ячейки ванны с таблетками сухой смеси проявителя добавляли по 250 мкл бидистиллированной воды для растворения таблеток и непосредственно перед проявлением вносили в ячейки по 250 мкл 0,4 % раствора нитрата серебра. Для усиления и стабилизации окраски ис-

пользовали раствор, содержащий 1% тиомочевины и 1% гидроксида натрия в бидистиллированной воде.

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

Готовили серии разведений вирусов на растворе для разведения образцов, смешивали каждое разведение с иммунозоль в соотношении 50:1, вносили их в 1-й ряд ванны и инкубировали матрицы в полученной смеси 25 мин., затем дважды отмывали матрицы ФСБ-Т и дважды дистиллированной водой, проявляли серебряным проявителем, отмывали водой, усиливали оптический сигнал обработкой матрицы щелочным раствором тиомочевины, ополаскивали водой и визуально учитывали результаты. Положительным считали образец, формирующий ясно различимое темное пятно в тестовой зоне белковой матрицы при интенсивном окрашивании зоны положительного контроля и отсутствии или слабой окраски в зоне отрицательного контроля. Схема анализа представлена на рис. 1.

Результаты и обсуждение

Разработанные нами автономные тест-системы включают в себя два основных элемента – это пластиковый гребень, каждый зубец которого представляет собой белковую матрицу с иммобилизованными в виде отдельных пятен иммунореагентами захвата, и многоячеечная аналитическая ванна, заполненная готовыми рабочими растворами [8]. При проведении

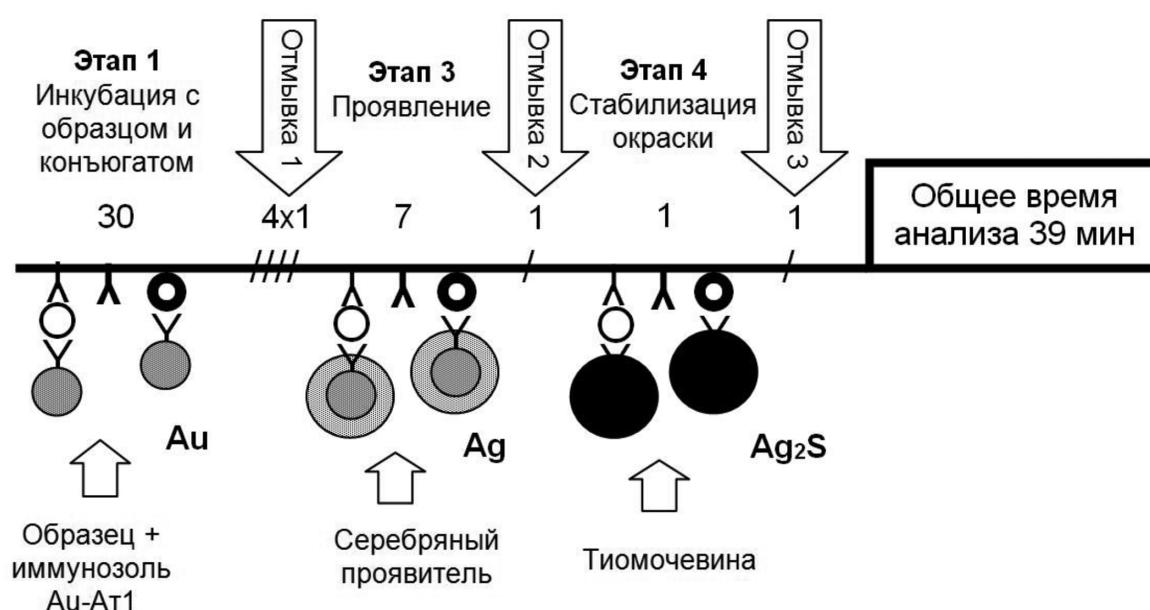


Рис. 1. Принципиальная схема дот-иммуноанализа антигенов ортопокс-вирусов с использованием золь золота, серебряного проявителя и стабилизации оптического сигнала щелочным раствором тиомочевины.

Цифрами обозначены кратность и длительность операций в минутах.

Y – антитела, ○ – антигены, – кратность отмывки.

анализа белковые матрицы приводят в контакт с исследуемыми образцами, а затем выполняют анализ, последовательно инкубируя и перенося пластиковый гребень по рядам аналитической ванны. В системе используются конъюгаты на основе коллоидного золота и «золото-серебряная» система усиления оптического сигнала. Учет результатов осуществляется по интенсивности окраски сенсibilизированных участков на зубах гребня.

Ранее нами отработана система визуализации золотых конъюгатов физическим проявлением в растворе, содержащем нитрат серебра и восстановитель в кислой среде [9]. В таком растворе происходит каталитическое восстановление серебра на поверхности частиц золота, вследствие чего места их локализации выявляются в виде пятен с темной окраской. Лучшей проявляющей системой для визуализации результатов дот-анализа признан раствор, содержащий 0,2% метола, 0,5% лимонной кислоты и 0,2% нитрата серебра. Время проявления матрицы в свежеприготовленном растворе составляет 7–8 мин, а стабильность такого проявителя зависит от качества и чистоты используемых для его приготовления реагентов.

Оценка качества реактивов для изготовления проявителя

В течение 2017 г. были приобретены 6 препаратов метола (изготовленные, согласно документам, в

2016 г.): 2 образца фирмы Fluka, 2 образца фирмы Aldrich-Sigma и 2 партии (от разных дистрибьюторов) отечественного препарата фирмы «Реахим». Оба образца отечественного препарата по цвету (серо-черный) не соответствовали ГОСТ 25664-83 (видимо хранились длительно или в ненадлежащих условиях) и, хотя и обладали восстанавливающей активностью, не обеспечивали стабильности проявителя свыше 5 мин. Этот препарат был исключен из исследований. Импортные образцы метола разводили от 0,4% до 0,1% в растворах, содержащих 0,75%, 0,5% и 0,25% безводной лимонной кислоты в бидистиллированной воде. Растворимость всех образцов была примерно одинаковой, за исключением Methol (foto), Fluka, Кат. № 69750, который заметно отставал по времени от других препаратов. В приготовленные растворы добавляли 10% раствор AgNO₃ (чда) до концентрации 0,2%, раствор перемешивали и быстро погружали в него матрицы. Перед погружением матрицы замачивали на 10 мин в бидистиллированной воде для удаления остатков буферных растворов с их поверхности. Проявляли матрицы 7 мин при комнатной температуре. Вид проявленных матриц приведен на рис. 2. Цифры под матрицами указывают время до потемнения проявителя в результате диффузного выпадения серебра (стабильность, мин).

Анализ результатов, приведенных на рис. 2, позволяет сделать следующие выводы.

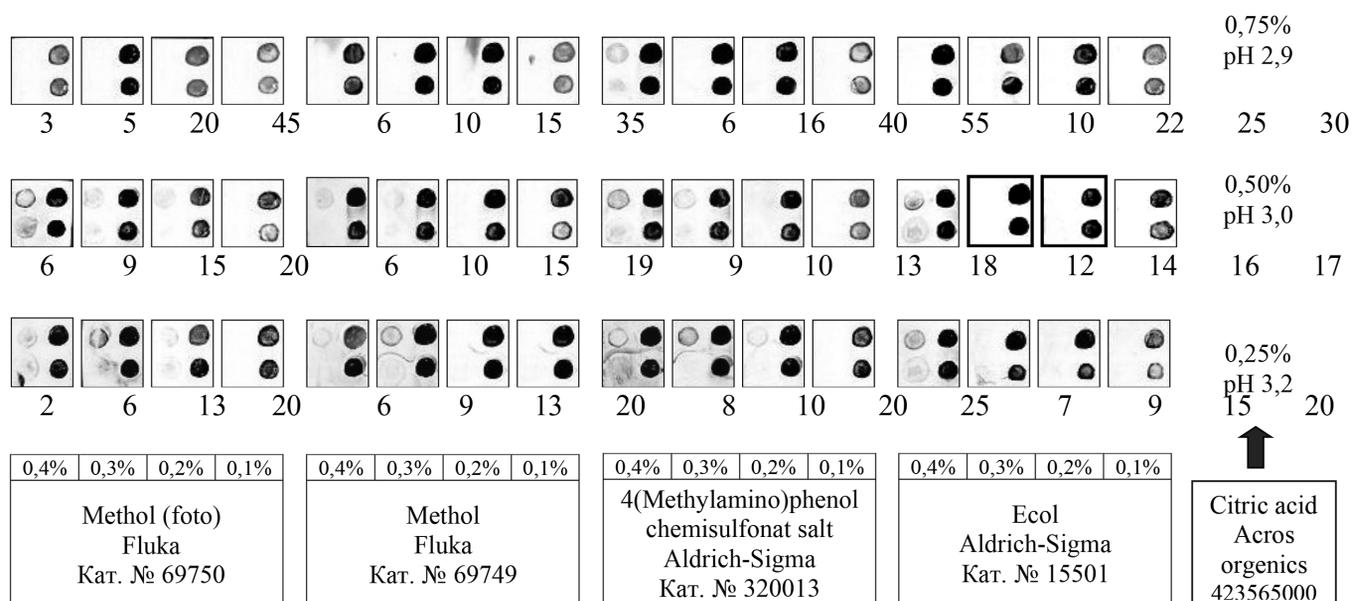


Рис. 2. Результаты сравнительной оценки разных марок метола.

Марки и концентрации метола приведены в табличках в нижней части рисунка. Справа указаны концентрации лимонной кислоты и pH раствора проявителя. Во все растворы вносили нитрат серебра до концентрации 0,2%. Подложки матриц изготовлены из синтетической бумаги Pentaprint PR-M480/09-07/8101-482D8. На подложки аликвотами по 2 мкл нанесены слева: сверху – IgG человека (10 мкг/мл), внизу – IgG кролика (10 мкг/мл); справа: сверху – золь (20 нм) золота (1 мкг/мл); внизу – золь (11 нм) серебра (1 мкг/мл). Время проявления всех матриц 7 мин. Время стабильности проявителя в минутах указано под соответствующей матрицей. Лучшие варианты композиций проявителя выделены жирной рамкой.

Methol foto, Fluka, лот 69750 непригоден для использования в системе, т. к. он плохо растворяется, не обеспечивает достаточную стабильность проявителя и интенсивность оптических сигналов, а также провоцирует спонтанное выпадение серебра на белковые компоненты (проявляет IgG).

Methol Fluka, лот 69749 похож по свойствам на препарат Fluka лот 69750, но работает немного чище и значительно контрастнее. Потенциально может быть использован в системе в концентрации 0,2%.

4-(Methylamino)phenol chemisulfate salt, Aldrich-Sigma, лот 320013 схож по свойствам с препаратом Fluka лот 69750, но обеспечивает более интенсивный оптический сигнал и более склонен к неспецифическому выпадению серебра при концентрациях метола более 0,2% и лимонной кислоты менее 0,5%. Потенциально может быть использован в концентрации 0,2% при pH 3,0 или 0,3% при pH 2,9.

Ecol работает чище, чем другие импортные аналоги, обеспечивает в оптимальных условиях стабильность проявителя до 15 мин, быстро проявляет золото и серебро, не провоцирует ложных сигналов на белковых компонентах и дает достаточно контрастные оптические сигналы. Может использоваться в системе в концентрации 0,2% и 0,3% при pH 3,0.

Таким образом, из оцененных образцов метола лучшим вариантом для применения в тесте является препарат Ecol. Этот реактив в оптимальных условиях работает наиболее чисто, обеспечивает контрастное проявление золота в течение 7 мин. и достаточную стабильность проявителя.

Сравнивали следующие пять марок лимонной кислоты, приобретенных в течение 2017 г.:

- 1) Citric acid, anhydrous, reagent ACS, 99,5 % (Acros organics, #423565000);
- 2) Citric acid, reagent ACS, 99,5 % (Sigma-Aldrich, #251275);
- 3) Citric acid, 99 % (Sigma-Aldrich, # C0759);
- 4) Citric acid monohydrate, reagent ACS, 99,5% (Sigma-Aldrich, #33114);
- 5) Citric acid, farm, 99,9 % (AppliChem, #A-2351).

Заметных различий между ними при приготовлении проявителя не выявлено. Таким образом, для приготовления сухой смеси проявителя можно использовать любой из этих препаратов.

Нитрат серебра фоточувствительный препарат, в кристаллах которого на свету восстанавливаются частицы металлического серебра. Такие препараты не пригодны для визуализации результатов анализа, поскольку частицы восстановленного серебра дестабилизируют проявитель с ослаблением полезного оптического сигнала и интенсивным фоном за счет диффузного выпадения серебра на

поверхность матрицы. В нашем исследовании была проведена сравнительная оценка трех препаратов нитрата серебра:

1) Silver nitrate, ACS reagent, 99,0 %, изготовлен в 2015 г., (Sigma-Aldrich, #209139);

2) Серебро азотнокислородное, чда, 99,9 %, ГОСТ 1277-75, изготовлен в 1991 г. (Реахим, Россия);

3) Серебро азотнокислородное, хч, изготовлен в 2008 г. (ПЗЦМ-Втормет, Россия).

В результате оценки установлено, что два первых указанных препаратов серебра могут быть использованы для изготовления набора, а отечественный препарат производства ПЗЦМ-Втормет, несмотря на более высокую квалификацию (хч) и меньший срок хранения, вызывает дестабилизацию проявителя.

Отработка способа приготовления и применения проявителя

В оптимальных условиях раствор проявителя стабилен только в течение 10–20 мин и должен быть приготовлен непосредственно перед применением. При обеспечении высокой чистоты приготовления раствор нитрата серебра стабилен и может храниться в темной склянке более одного года. Раствор метола существенно менее устойчив и может эффективно использоваться только в течение 1–2 сут. Очевидно, что тест-система не может укомплектовываться таким запасным раствором и метол должен входить в ее состав в сухом виде. Для укомплектования автономного диагностического набора предложено использовать двухкомпонентный проявитель – таблетированную смесь метола и лимонной кислоты (сухой компонент) в соотношении 2:5 (мас./мас.), а также 0,4% раствор азотнокислого серебра (жидкий компонент). Экспериментально установлено, что метол в виде сухой смеси с лимонной кислотой в темной упаковке может храниться более 2 лет (срок наблюдения) при комнатной температуре без потери активности. Проблема комплектации в таком случае заключается в крайне малой дозировке порций этих компонентов. Для проявления одной матрицы необходимо 0,5 мл проявителя. Доза на 0,5 мл проявителя составляет для метола – 1,0 мг, а для лимонной кислоты – 2,5 мг. Массовая или объемная дозировка таких порций сопряжена с высокой погрешностью, способной негативно отражаться на результатах анализа (при этом наиболее сильное влияние на эффективность проявления оказывает изменение соотношения концентраций метола и лимонной кислоты в смеси (см. рис. 2), тогда как небольшие погрешности дозировки сбалансированной смеси в проявителе не оказывают заметного влияния на результаты анализа и интенсивность оптических сигналов).

Наиболее просто дозирование сухих компонентов проявителя может быть осуществлено путем

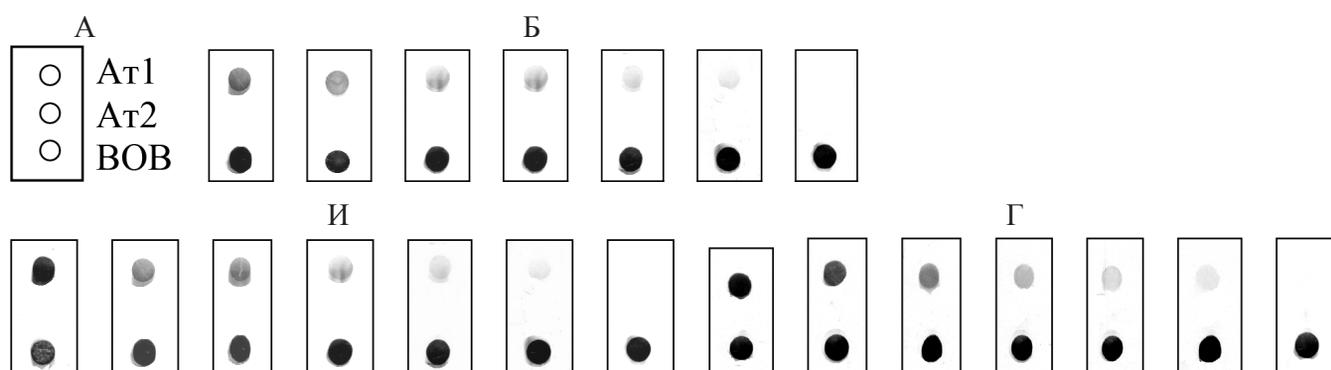


Рис. 3. Схема нанесения реагентов захвата на белковой матрице (А).

Вид белковых матриц после выявления вируса осповакцины в одностадийной постановке дот-иммуноанализа при использовании вариантов проявителя: из запасных растворов (Б), двухкомпонентного (В) и двухкомпонентного с усилением оптического сигнала тиомочевинной (Г). Кратность разведения вирусного материала приведена под изображениями матриц. Аббревиатуры реагентов захвата приведены в разделе «Материалы и методы».

изготовления тритурационных таблеток [13]. Для изготовления таблеток массой 3,5–4 мг готовили гомогенную смесь с необходимыми пропорциями лимонной кислоты и метола (эти ингредиенты имеют разную дисперсность и должны быть тщательно измельчены и перемешаны). Необходимый объем полученной пудры помещали в стеклянную чашку Петри и увлажняли 80% этанолом до образования густой пасты. Этой пастой заполняли ячейки диаметром 1,8 мм силиконовой матрицы толщиной 1 мм и высушивали. При подборе режимов сушки смеси в матрице установлено, что первоначальная сушка при температуре выше 40 °С приводила к вытеканию смеси из ячеек вследствие повышения растворимости. Сушка при повышенных температурах на поздних стадиях имела следствием снижение скорости растворения таблеток. Первоначальная сушка под вакуумом приводила к вскипанию смеси, что делало таблетки рыхлыми, ломкими и трудно извлекаемыми из матрицы. Оптимальным признан режим сушки в течение 2 ч при комнатной температуре, а затем в течение 4 ч под вакуумом. Досушивание смеси под вакуумом повышало скорость растворения таблеток в стационарном режиме по сравнению с таблетками, высушенными при нормальном давлении. Сушку таблеток необходимо проводить без доступа прямого света, а при их хранении избегать света и влаги. В таких условиях сухой компонент сохраняет свои свойства более 2 лет. Вариабельность массы таблеток в диапазоне от 3,5 до 4 мг не сказывалась заметно на результатах проявления.

Жидкий компонент проявителя представляет 0,4% раствор нитрата серебра в бидистиллированной воде, расфасованный во флаконы из темного стекла. При его приготовлении необходимо избегать попадания прямого света, а также тщательно следить за качеством воды и чистотой посуды.

В наборе таблетки сухой смеси помещаются в пустых ячейках одного из рядов аналитической

ванны. При выполнении анализа за 10–15 мин до проявления в ячейки с сухой смесью вносится по 250 мкл бидистиллированной воды, а непосредственно перед проявлением – такой же объем 0,4% раствора нитрата серебра (введение равного объема жидкого компонента позволяет равномерно перемешать растворы). Время проявления 7–8 мин при температуре 20 °С.

При проявлении серебро может образовывать отложения разной плотности с различной окраской (от коричневой до черной), что затрудняет учёт результатов. Чтобы устранить эту проблему, в схему анализа введён дополнительный этап стабилизации окраски. На этом этапе проявленную матрицу обрабатывали щелочным раствором тиомочевины, который переводит серебро в его сульфид, имеющий интенсивную и стойкую чёрную окраску.

Апробация проявителя в дот-иммуноанализе для выявления ортопоксвирусов

Для экспрессного выявления ортопоксвирусов отработан одностадийный вариант дот-анализа с использованием поликлональных антител. В отличие от процедуры дот-иммуноанализа, описанной в предыдущих публикациях [7, 8], где матрицу сначала инкубировали с исследуемым образцом, а затем обрабатывали иммунозолом, в экспрессном варианте инкубация с образцом и конъюгатом выполняется в одну стадию (рис. 1). За счет такого совмещения и уменьшения числа отмывок время анализа сокращается с 70 до 40 мин.

Для оценки эффективности применения в анализе, описанного в предыдущем разделе двухкомпонентного проявителя, параллельно выполняли одностадийный дот-анализ серии разведений вирусного материала с использованием:

- классической прописи физического проявителя, приготовленного из запасных растворов (рис. 3, Б),

- двухкомпонентного проявителя (рис. 3, В)
 - двухкомпонентного проявителя с последующей стабилизацией оптического сигнала в щелочном растворе тиомочевина (см. рис. 3Г).

Видно, что двухкомпонентный и классический проявители обеспечивают идентичные результаты, а применение стабилизатора окраски повышает контрастность проявленных пятен. Погрешности в массе таблеток в диапазоне 3,5-4,0 мг не оказывают заметного влияния на результаты проявления. Чувствительность метода во всех вариантах проявления составляет $5,4 \times 10^4$ БОЕ/мл.

Заключение

В автономных наборах для эффективного проявления результатов иммуноанализа с применением конъюгатов на основе коллоидного золота может использоваться двухкомпонентный проявитель, включающий таблетку сухой смеси, содержащей метол и лимонную кислоту в соотношении 2:3, и жидкий компонент – 0,4% раствор нитрата серебра. Необходим контроль качества реактивов, предназначенных для изготовления проявителя. Таблетки сухой смеси проявителя могут быть изготовлены путем формования увлажненной этанолом смеси метола и лимонной кислоты в ячейках силиконовой матрицы с последующей сушкой, при этом погрешности в массе таблеток в диапазоне 3,5-4,0 мг не оказывают заметного влияния на результаты проявления. Повышение контрастности и стабильности оптических сигналов может быть достигнуто путем обработки проявленной белковой матрицы щелочным раствором тиомочевина.

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 4-6, 8, 11-13 см. REFERENCES)

- Бондарев В.П., Терентьев А.И., Мельников С.А., Бондарева Т.А. Внедрение таблетированной оспенной вакцины «ТЭО-ВАК» в серийное производство для обеспечения биологической безопасности населения Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2010; вып. 104, с. 66-8.
- Максютов Р.А. Комплексный подход к видоспецифичной детекции вируса оспы коров. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016, вып. 4, с. 60-3.
- Ерш А.В., Полтавченко А.Г., Пьянков С.А., Агафонов А.П., Кривенчук Н.А., Буторин Д.В. Метод комплексной оценки гуморального иммунитета к детским вакциноуправляемым вирусным инфекциям. *Вопросы вирусологии*. 2015, 60(1): 45-9.
- Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Крупницкая Ю.А. Выбор системы детекции для мультиплексного дот-иммуноанализа антител. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016, 61(4): 229-33.
- Скоупс Р. *Методы очистки белков*. Пер с англ. М.; Мир, 1985.

REFERENCES

- Rimoina W., Graham B.S. Whither monkeypox vaccination. *Vaccine*. 2011; v. 295, p. 60–4. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.004>
- Bondarev V.P., Terent'ev A.I., Melnicov S.A., Bondareva T.A. Introduction of the Pelleted Smallpox Vaccine "TEOVak" into Serial Production to Provide Biosafety of the Population of the Russian Federation. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsiy*. 2010; 104: 66–8. (In Russian)
- Maksyutov R.A. Complex Approach to Species-Specific Detection of Cowpox Virus/ *Problemy Osobo Opasnykh Infektsiy*. 2016; 4: 60–3. (In Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-60-63>.
- Pulford D., Meyer H., Brightwell G., Damon I., Kline R., Ulaeto D. Amplification refractory mutation system PCR assays for the detection of variola and Orthopoxvirus/ *J. Virol. Meth.* 2004. v. 117: 81–90. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.01.001>
- Probst A., Besse A., Favry E., Imbert G., Tanchou V., Castelli F.A., Maillere B. Human CD4 T cell epitopes selective for Vaccinia versus Variola virus. *Mol. Immunol.* 2013, v. 53: p. 453–9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2012.10.011>
- Chen L., Wang H., Guo T., Xiao C., Liu L. et al. A rapid point-of-care test for dengue virus-1 based on a lateral flow assay with a near-infrared fluorescent dye. *J. Immunol. Meth.* 2018, v. 456: p. 23–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.02.005>
- Ersh A.V., Poltavchenko A.G., Pyankov S.A., Agafonov A.P., Krivenchuk N.A., Butorin D.V. The multiplex method of estimation of humoral immunity to vaccine regulated childhood infections. *Voprosy virusologii*. 2015, 60(1): 45–9. (In Russian)
- Poltavchenko A.G., Nechitaylo O.V., Filatov P.V., Ersh A.V., Gureyev V.N. Multiplex method for initial complex testing of antibodies to blood transmitted diseases agents. *J. Virol. Meth.* 2016; vol. 236: 231–6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.08.003>
- Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Krupnitskaya Yu.A. The selection of system of detection for multiplex dot-immune analysis of antibodies. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2016; 61(4): 229–33. (In Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-4-229-233>.
- Scopes R. *Protein purification*. Springer-Verlag New York Inc., 1982.
- Poltavchenko A.G., Zaytzev B.N., Ersh A.V., Korneev D.V., Taranov O.S., Filatov P.V., Nechitaylo O.V. The selection and optimization of the detection system for self-contained multiplexed dot-immunoassay. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2016; 37(5): 540–54. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/15321819.2016.1174134>
- Poltavchenko A.G., Zaitsev B.N., Ersh A.V., Taranov O.S., Korneev D.V., Nikonov A.M. Selection of Substrate Material for Protein Matrices. *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*. 2016; 52(2): 301–7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1134/S2070205116020234>
- Keblor L.F. The Tablet Industry – Its Evolution and Present Status: The Composition of Tablets and Methods of Analysis. *Journal of the American Pharmaceutical Association*. Cambridge, MA: Elsevier, 1914; 3(6): 820–48. DOI: 10.1002/jps.3080030614.

Поступила 30.04.2019

Принята в печать 15.07.2019

Сведения об авторах:

Полтавченко Александр Георгиевич, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. отдела разработки и производства средств диагностики вирусных заболеваний ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора; **Ерш Анна Васильевна**, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. иммунохимической диагностики ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора; **Азаев Мамедьяр Шакирович**, доцент, доктор биол. наук, зав. отделом научно-методической подготовки персонала по работе с возбудителями особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. E-mail: azaev@vector.nsc.ru; **Филатов Павел Владимирович**, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. иммунохимической диагностики ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.