

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-106-113

УДК 616.912:616-07

А.Г. Полтавченко, А.В. Ерш, П.В. Филатов, Н.Д. Ушкаленко, С.Н. Якубицкий,
Ал.А. Сергеев, Д.Н. Щербаков

УСКОРЕННЫЙ СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ ОРТОПОКСВИРУСОВ

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Российская Федерация

Цель – разработка чувствительного и быстрого иммунохимического теста для выявления ортопоксвирусов (ОПВ) во внелaborаторных условиях. **Материалы и методы.** В культуральных неочищенных и очищенных препаратах вирусов осповакцины, экстремелии, оспы коров и кроликов, а также в крови и суспензиях тканей инфицированных мышей и кроликов выявляли ортопоксвирусный антиген в одностадийном и двустадийном вариантах дот-иммуноанализа на основе плоских белковых матриц с использованием кроличьих поликлональных антител в качестве реагентов захвата и детекции. **Результаты и обсуждение.** Показано, что чувствительность обнаружения ОПВ обратно пропорциональна степени их очистки. Одностадийный (ускоренный) вариант анализа специфичен и позволяет в течение 39 минут выявлять ОПВ в неочищенных культуральных образцах вируса и клинических пробах в диапазоне 10^4 – 10^3 БОЕ/мл. Ускоренный дот-иммуноанализ может использоваться для выявления или исключения присутствия вирусной угрозы в образцах и быть полезен в различных аспектах обеспечения биологической безопасности. Простота выполнения анализа, возможность визуального учета и несложная интерпретация результатов позволяют использовать тест во внелaborаторных условиях.

Ключевые слова: ортопоксвирусы, быстрое выявление, плоские белковые матрицы, дот-иммуноанализ, полевые условия.

Корреспондирующий автор: Полтавченко Александр Георгиевич, e-mail: poltav@vector.nsc.ru.

Для цитирования: Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Филатов П.В., Ушкаленко Н.Д., Якубицкий С.Н., Сергеев Ал.А., Щербаков Д.Н. Ускоренный способ выявления ортопоксвирусов. Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 3:106–113. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-106-113.

Поступила 14.09.2020. Отправлена на доработку 09.12.2021. Принята к публ. 22.01.2021.

A.G. Poltavchenko, A.V. Ersh, P.V. Filatov, N.D. Ushkalenko, S.N. Yakubitsky, Al. A. Sergeev,
D.N. Shcherbakov

Rapid Detection of Orthopoxviruses

State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to develop a sensitive and fast immunochemical test for the detection of orthopoxviruses (OPXV) in the “point of care” format. **Materials and methods.** The analyses were performed in cultured crude and purified preparations of vaccinia virus, cowpoxvirus, rabbitpoxvirus and ectromelia virus, as well as in the blood and tissue suspensions of infected mice and rabbits. OPXV-antigen was detected by one-stage and two-stage protocols of dot-immunoassay based on flat protein arrays using rabbit polyclonal antibodies as capture and detection reagents. **Results and discussion.** The results show that the detection limit of OPXV is inversely related to the degree of their purification. The one-stage (rapid) protocol is specific and allows detecting OPXV in crude culture samples of the virus and in clinical samples in the range of 10^4 – 10^3 PFU/ml within 39 minutes. Rapid dot-immunoassay can be applied to detect or exclude the presence of a viral threat in samples and can be useful in various aspects of biosafety provision. The simplicity of the one-stage protocol, the possibility to visually account the results and easy interpretation of the results allow the rapid test to be used in the “point of care” format.

Key words: orthopoxviruses, rapid detection, flat protein arrays, dot-immunoassay, field condition.

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

Corresponding author: Alexandr G. Poltavchenko, e-mail: poltav@vector.nsc.ru.

Citation: Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Filatov P.V., Ushkalenko N.D., Yakubitsky S.N., Sergeev Al. A., Shcherbakov D.N. Rapid Detection of Orthopoxviruses. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2021; 3: 106–113. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-106–113.

Received 14.09.2021. Revised 09.12.2021. Accepted 22.01.2021.

Poltavchenko A.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2408-5611>
Ersh A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9220-1250>
Filatov P.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7763-3808>

Yakubitsky S.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0496-390X>
Sergeev Al.A., ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8355-5551>
Shcherbakov D.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8023-4453>

Род *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae* объединяет крупные и сложные ДНК-содержащие вирусы, способные инфицировать людей и вызывать у них тяжелые контагиозные заболевания [1]. В связи с успешной ликвидацией оспы массовая вакцинация против нее прекращена в 1980 г. В то же время возможность применения вируса натуральной оспы в террористических или военных целях [2, 3], а также зоонозные инфекции, вызываемые вирусом

оспы обезьян (ВОО), вирусом оспы коров (ВОК) и вирусом осповакцины (ВОВ), представляют угрозу для невакцинированного населения [4]. В последнее время случаи заражения ВОО в Центральной Африке [5–7] и США [8], ВОК в Европе [9] и ВОВ в Бразилии [10, 11] подчеркивают эпидемический потенциал этих вирусов.

Раннее выявление заболеваний, вызываемых ортопоксвирусами (ОПВ), важно для оперативно-

го принятия обоснованных решений относительно изоляции и лечения пациентов, а также определения эпидемиологии заболевания и осуществления мер по его контролю [12]. Быстрое и надежное обнаружение инфекционных агентов при отсутствии хорошо оснащенной лабораторной инфраструктуры является сложной задачей. Идеальная диагностическая система для анализа в полевых условиях должна быть чувствительной и специфичной, достаточно простой в применении с использованием разных типов образцов, быстрой и надежной, не нуждаться в энергообеспечении и сложном оборудовании, обладать компактностью и физической прочностью, быть доступной по стоимости [13, 14].

Диагноз ОПВ-инфекции не может быть поставлен только по клиническим признакам, поскольку сходные симптомы характерны и для ряда других заболеваний. Дифференциальная диагностика может быть проведена лабораторными методами с применением: электронной микроскопии (выявление вирусных частиц), полимеразной цепной реакции (выявление вирусной ДНК) или иммунохимических тестов (выявление вирусных белков). Электронная микроскопия может быть выполнена быстро, но чувствительность ее невелика. Анализы полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (ОТ-ПЦР) позволяют в течение нескольких часов выявлять десятки и даже сотни [15] копий вирусной ДНК и дифференцировать виды ОПВ, однако такой анализ может выполняться в строго контролируемых лабораторных условиях [16]. Иммунохимические методы менее чувствительны, чем ПЦР. Так, лабораторный иммуноферментный анализ (ИФА) с парой тщательно подобранных моноклональных антител позволяет обнаруживать ОПВ при вирусной нагрузке выше $1 \cdot 10^3$ БОЕ/мл [17]. С другой стороны, иммунохимические тесты менее прихотливы к условиям анализа и могут выполняться существенно быстрее ПЦР. Так, известен коммерчески доступный иммунохроматографический (lateral flow immunoassay) тест Orthopox BioThreat® Alert, допускающий выявление ОПВ в концентрациях 10^6 – 10^7 БОЕ/мл в течение 20–25 мин [12]. Другим примером может служить немецкая иммунофильтрационная система ABICAP (Antibody Immuno Column for Analytical Processes), позволяющая в течение 45 мин достоверно выявить ОПВ при их содержании в образце, превышающем 10^4 БОЕ/мл [16]. Оба теста могут выполняться во внелабораторных условиях, однако уступают в чувствительности лабораторному ИФА.

Ранее мы сообщали о разработке быстрого и простого в применении иммунохимического теста на основе плоских белковых матриц, пригодного для выявления вируса осповакцины во внелабораторных условиях, а также позволяющего сократить время анализа и повысить чувствительность определения вируса осповакцины в неочищенных культуральных препаратах [18].

Целью настоящей работы являются лаборатор-

ные испытания теста с использованием более широкого круга ОПВ и клинических образцов.

Материалы и методы

Вирусные препараты: **ВОВ (ЛИВП)** – вирус осповакцины штамм 14 ЛИВП; **ВОВ (ABCNJ)** – рекомбинантный штамм ВОВ; **ВОВ_A34R_[D110N_K151E]** – вирус осповакцины с аминокислотными заменами D110N, K151E в мембранном гликопротеине A34; **ВЭ** – вирус экстремелии штамм К-1; **ВОК** – вирус оспы коров штамм GRI-90; **ВОКр** – вирус оспы кроликов штамм Утрехт.

Культивирование и выделение вирусов. Монослой клеточной культуры линии CV-1, выращенный в культуральных флаконах с ростовой площадью 75 см^2 , инфицировали определенным вирусом, инкубировали в поддерживающей питательной среде (DMEM/F-12 (1:1) с 2 % эмбриональной сыворотки коров, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 МЕ/мл пенициллина) в течение 72 ч при температуре 37°C до полного цитопатического действия. Затем получали криолизат инфицированных клеток (два цикла замораживания-оттаивания), из которого отбирали *образец 1*, остальную часть криолизата обрабатывали на ультразвуковом дезинтеграторе два раза по 10 сек при мощности 20 кГц, из которой отбирали *образец 2*. Оставшуюся часть криолизата делили на две части, одну из которых центрифугировали при 5000 об/мин в течение 15 мин при 4°C , и осадок отбирали как *образец 3*. Другую часть криолизата центрифугировали при 14000 об/мин в течение 2 ч при 4°C с использованием «подушки» из 30 % сахарозы, и очищенный от клеточного дебриса вирус отбирали из нижней части пробирки как *образец 4*. Инфекционный титр вирусов определяли безагарозным методом бляшек на культуре клеток 4647.

Антитела. **a/POX-IgG** – IgG из гипериммунной по ВОВ сыворотки кролика. Гипериммунную сыворотку против общих белков вируса получали путем иммунизации кроликов шиншиллы очищенным штаммом ЛИВП вируса осповакцины. Животных иммунизировали три раза с интервалом 28 дней. Первая иммунизация проводилась в дозе $8,2 \cdot 10^6$ БОЕ/животное внутривенно в двух местах. Вторая иммунизация проводилась в дозе $1,2 \cdot 10^8$ БОЕ/животное с использованием полного адьюванта Фрейнда в соотношении 1:1 подкожно в десять мест. Третья иммунизация проведена аналогично второй, но с использованием неполного адьюванта Фрейнда. Кровь отбирали через 28 дней после третьей иммунизации, и сыворотку отделяли путем образования и ретракции фибринового сгустка. IgG из иммунной сыворотки кролика (a/POX-IgG) выделяли осаждением сульфатом аммония и хранили при -18°C . **IgG НКС** – IgG из нормальной сыворотки кролика, выделенные методом осаждения сульфатом аммония, хранение при -18°C .

Клинические материалы. В качестве клинических материалов использовали образцы крови и

органов кролика, инфицированного интраназально вирусом ВОКр в дозе 10^4 БОЕ, и образцы органов мышей линии BALB/c, интраназально инфицированных ВОВ (ЛИВП)-4 в дозах 10^6 – 10^8 БОЕ/30 мкл/животное. Подробности получения и подготовки проб приведены в тексте. Исследования и манипуляции на животных одобрены комитетом по биоэтике ГНЦ ВБ «Вектор» и выполнялись согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [19].

Отпавшая корочка с места вакцинации пациента получена из МСЧ 163 в виде обезличенного образца.

Контрольные образцы. В качестве гетерогенных контролей использовали антигены вирусов, вызывающих экзантематозные заболевания: **антиген вируса кори**, вирус кори (штамм НовО/96) культивировали на монослое клеток Vero, выделяли и концентрировали центрифугированием в градиенте плотности сахарозы, и инактивировали вирусную активность прогреванием в течение 1 ч при 56°C ; **антиген вируса краснухи** (композиция рекомбинантных белков E1, E2 и C) закупали у фирмы «Капель» (Москва, Россия); **антиген вируса ветряной оспы** (Varicella native antigen кат. № FPZ0039) закупали у фирмы Faron Inc. (Китай). Все гетерогенные контроли использовали в концентрации 1 мкг/мл. Кроме того, в качестве контрольных материалов использовали пробы культуры клеток CV-1, обработанные в соответствии с протоколами подготовки образцов 1, 2 и 3.

Иммунозоль Au-a/POX-IgG. Золь золота (15–20 нм) получали путем восстановления раствора тетрахлорзолотой кислоты цитратом натрия при 100°C . Коагуляционный тест для определения дозы нагрузки золя антителами a/POX-IgG и саму нагрузку проводили, как описано ранее [20]. Дополнительную стабилизацию золя выполняли добавлением БСА до 1 %. Очистку иммунозоля проводили центрифугированием при 14000 g в течение 35 мин при 4°C .

Набор для выявления ОПВ включал в себя белковые матрицы, аналитические ванны, перфоратор для вскрытия фольги над ячейками ванны, флаконы с дважды дистиллированной водой и 0,4 % раствором нитрата серебра. Основные элементы набора, приемы изготовления белковых матриц и подготовки аналитических ванн подробно описаны в предыдущей работе [18].

При изготовлении белковых матриц рабочие разведения реагентов захвата на 5 мМ боратном буферном растворе (pH 6,0) аликвотами по 2,5 мкл дискретно наносили на рабочую сторону [21] подложки из синтетической бумаги на основе поливинилхлорида (Pentaprint марки PR-M180/09-07/9400, Klöckner Pentaplast, Германия), высушивали в течение 2 ч при 45°C ; блокировали погружением на 2 ч в 0,01 М фосфатном буферном растворе (pH 7,4), содержащем 0,2 % казеина; тщательно просушивали и использовали в работе.

Аналитическая ванна из полипропилена объединяет 5 модулей из 12 ячеек, каждый из которых предназначен для выполнения одного анализа. Ванна заполнена рабочими растворами, за исключением ячеек девятого ряда, содержащих по таблетке (4 мг) сухого компонента физического проявителя (смесь метола и лимонной кислоты в соотношении 2:5). Заполненные ванны термически герметизированы укрывным материалом Colflex (Al Pak, Словения). До использования ванны хранили при 4°C .

Дот-иммуноанализ выполняли при температуре выше 20°C . Перед анализом вскрывали фольгу над ячейками ванны перфоратором и вносили в ячейки девятого ряда по 200 мкл бидистиллированной воды (для растворения сухого компонента проявителя).

В рутинной (двустадийной) постановке в первый ряд ячеек ванны вносили по 15 мкл исследуемых образцов (рабочее разведение 1:20), погружали в них белковые матрицы и инкубировали 25 мин, а затем с определенными интервалами перемещали по следующим рядам. Непосредственно перед погружением матриц в ячейки девятого ряда в них вносили по 200 мкл 0,4 % раствора нитрата серебра. После выемки из последнего ряда ячеек матрицы подсушивали на воздухе и визуально учитывали результаты. Общее время выполнения рутинного анализа – 66 мин. Положительным считали образец, формирующий ясно различимое темное пятно в тестовой зоне белковой матрицы при интенсивном окрашивании зоны положительного контроля и отсутствии окраски в зоне отрицательного контроля.

В ускоренной (одностадийной) постановке исследуемые образцы (15 мкл) вносили в четвертый ряд ванны, заполненной рабочим раствором конъюгата, инкубировали матрицы 25 мин в полученной смеси и далее выполняли отмывки, проявление и учет результатов так, как описано для рутинного метода. Время выполнения ускоренного анализа – 39 мин. Схемы рутинного и ускоренного анализов представлены в предыдущей работе [18].

Предел обнаружения вирусов рассчитывали как результат умножения исходного титра образца вируса на максимальное разведение, при котором контрольная точка четко определялась визуально. Все эксперименты проводились в нескольких повторях и показали одинаковый предел обнаружения. Поскольку измерения не были количественными, статистическая обработка результатов не проводилась.

Результаты и обсуждение

В предыдущей работе мы сравнивали эффективность выявления ВОВ в рутинном и ускоренном вариантах дот-анализа. Сокращение времени выполнения ускоренного варианта анализа достигается за счет совмещения стадий инкубации белковых матриц в образце и конъюгате и сокращения числа отмывок. В отличие от описанных ранее вариантов

иммунохимического анализа [12, 16, 17], использующих пары моноклональных антител против разных антигенных детерминант ОПВ, наш ускоренный метод основан на применении поликлональных антител против ВОВ как в качестве иммобилизованного на подложке реагента захвата, так и в качестве связанных с частицами коллоидного золота антител детекции. Ранее установлено [18], что лимит определения ВОВ имеет обратную зависимость от степени очистки препаратов от субвирусных структур; а одностадийный вариант дот-иммуноанализа, наряду с сокращением времени анализа, позволяет увеличить чувствительность выявления ВОВ в неочищенных вирусных препаратах. В настоящей работе мы продолжили это исследование с использованием более широкого круга препаратов ортопоксвирусов (в том числе генетически измененных вариантов ВОВ) с разной степенью очистки. Результаты исследования приведены в табл. 1.

Данные табл. 1 подтверждают, что ускоренный вариант дот-анализа со всеми препаратами вирусов обеспечивает чувствительность, как минимум в два раза превышающую чувствительность двустадийного анализа. Как было показано ранее, такой прирост чувствительности может быть объяснен образованием крупных агрегатов частиц иммунозоля на поверхности субвирусных структур, значительно усиливающих оптический сигнал при проявлении результатов анализа [18]. Обработка культуральных вирусов ультразвуком во всех образцах 2 снижает чувствительность выявления, вероятно, вследствие разрушения конформационных эпитопов, расположенных на поверхности субвирусных структур, а также повышения дисперсности клеточного дебриса, ограничивающего диффузию и контакты вирусных антигенов с антителами захвата на подложке.

Оба варианта постановки анализа специфичны и не обнаруживают взаимодействий с препаратами

Таблица 1 / Table 1

Чувствительность выявления препаратов ортопоксвирусов в разных вариантах условий постановки дот-иммуноанализа
Sensitivity of orthopoxvirus detecting under different conditions of dot-immunoassay layout

Образец (штамм) Sample (strain)	Тип образца Type of sample	Исходный титр, БОЕ/мл Initial titer, PFU/ml	Лимит определения в дот-иммуноанализе Detection threshold in dot-immunoassay			
			рутинный анализ routine analysis		ускоренный анализ rapid analysis	
			развед. dilution	титр, БОЕ/мл titer, PFU/ml	развед. dilution	титр, БОЕ/мл titer, PFU/ml
BOB (ABCNJ) Vaccinia virus (ABCNJ)	3	6,9·10 ⁸	1/1600	4,3·10 ⁵	1/6400	1,1·10 ⁵
	4	4,0·10 ⁸	1/800	5,0·10 ⁵	1/3200	1,2·10 ⁵
BOB (A34R [D110N K151E]) Vaccinia virus (A34R [D110N K151E])	1	1,1·10 ⁶	1/800	1,4·10 ³	1/800	1,4·10 ³
BOB (ЛИВП) Vaccinia virus (LIVP)	1	1,1·10 ⁷	1/1600	7,2·10 ³	1/3200	3,6·10 ³
	2	3,6·10 ⁷	1/1600	2,2·10 ⁴	1/3200	1,1·10 ⁴
	3	8,5·10 ⁶	1/3200	2,6·10 ³	1/12800	6,6·10 ²
	4	3,0·10 ⁸	1/800	6,2·10 ⁵	1/1600	1,9·10 ⁵
ВЭ (К-1) ectromelia virus(K-1)	1	2,3·10 ⁶	1/200	1,1·10 ⁴	1/800	2,8·10 ³
	2	1,9·10 ⁷	1/100	1,9·10 ⁵	1/400	4,8·10 ⁴
	3	8,5·10 ⁶	1/100	8,4·10 ⁴	1/400	2,1·10 ⁴
	4	2,2·10 ⁸	1/400	5,5·10 ⁵	1/800	2,8·10 ⁵
ВОК (GRI-90) Cowpox virus (GRI-90)	1	9,8·10 ⁶	1/200	4,8·10 ⁴	1/800	1,2·10 ⁴
	2	3,0·10 ⁷	1/200	1,5·10 ⁵	1/800	3,8·10 ⁴
	3	1,3·10 ⁷	1/200	6,4·10 ⁴	1/800	1,6·10 ⁴
	4	4,0·10 ⁸	1/800	5,0·10 ⁵	1/1600	2,5·10 ⁵
ВОКр (Утрехт) Rabbit poxvirus (Utrecht)	1	1,0·10 ⁶	1/800	1,2·10 ³	1/1600	6,2·10 ²
Контроль клеточной культуры* Cell culture control*	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
Гетерогенный контроль** Heterogenic control**	Ветряная оспа Chicken-pox	0	0	0	0	0
	Корь Measles	0	0	0	0	0
	Краснуха Rubella	0	0	0	0	0

Примечание: типы образцов: 1 – криолизат инфицированных клеток (два цикла замораживания – оттаивания); 2 – образец 1, обработанный ультразвуком (2 раза по 10 с при 20 кГц); 3 – супернатант после центрифугирования образца 2 (5000 об/мин, 15 мин, 4 °C); 4 – нижняя фракция после центрифугирования образца 3 с сахарозной подушкой (14000 об/мин, 2 ч, 4 °C). * Для контроля использованы неинфицированные клетки, обработанные как образцы 1–3. ** Гетерогенные контроли описаны в «Материалах и методах».

Note: types of samples: 1 – cryolysate of infected cells (two cycles of freezing – thawing); 2 – sample 1, treated with ultrasound (2 times for 10 s at 20 kHz); 3 – supernatant after centrifugation of sample 2 (5000 rpm, 15 min, 4 °C); 4 – lower fraction after centrifugation of sample 3 with a sucrose pad (14000 rpm, 2 h, 4 °C). * Uninfected cells treated as samples 1–3 were used for control. ** Heterogeneous controls are described in the “Materials and Methods”, section.

незараженной клеточной культуры, обработанной в соответствии с протоколами подготовки вирусных образцов 1–3, и с гетерогенными контролями возбудителей экзантематозных инфекций (корь, краснуха, ветряная оспа). С учетом возможных погрешностей в титровании вируса и постановке дот-анализа чувствительность ускоренного варианта выявления ортопоксвирусов в неочищенных препаратах можно обозначить диапазоном 10^3 – 10^4 БОЕ/мл.

Для оценки выявления ортопоксвирусов в клинических материалах использовали 6-месячного кролика породы шиншилла массой 2,0–2,5 кг, полученного из питомника лабораторных животных ГНЦ ВБ «Вектор» и интраназально инфицированного вирусом ВОКр в дозе 10^4 БОЕ. Наблюдение за инфицированным кроликом осуществляли в течение семи суток с момента заражения до гибели животного. Наблюдаемые клинические признаки заболевания приведены в табл. 2.

В течение всего инфекционного периода ежедневно из ушной вены отбирали по 3 мл крови и после образования сгустка разделяли каждую пробу на сыворотку и форменные элементы. Из сгустка форменных элементов готовили 10 % суспензию на физиологическом растворе. Полученные образцы исследовали ускоренным дот-анализом. После гибели кролика его вскрывали и отбирали образцы массой 0,1–0,2 г из разных участков почек, печени, легких и селезенки, а также кусочков ($0,5 \text{ см}^2$) кожи из зоны с видимыми высыпаниями. Отбор образцов и получение из них суспензий проводили в соответствии с методическими указаниями «Лабораторная диагностика натуральной оспы. Методические указания МУ 1.3.2970–11» (М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012). Полученные гомогенаты в объеме 30 мкл вносили в ячейки четвертого ряда аналитической ванны и выполняли ускоренный дот-анализ. Результаты исследований приведены на рис. 1.

На рис. 1, Б видно, что в сыворотке крови инфицированного животного вирус обнаруживается

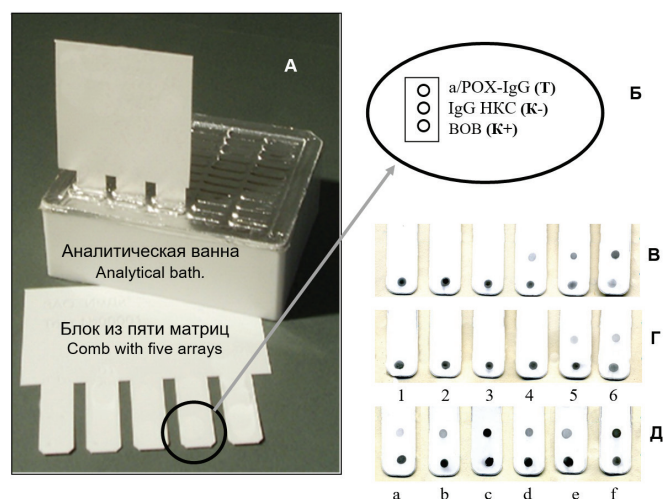


Рис. 1. Результаты ускоренного анализа образцов от инфицированного кролика:

А – схема размещения реагентов захвата на матрице (Т – тестовая зона, К– и К+ – зоны отрицательного и положительного контроля соответственно). Вид белковых матриц после исследования: Б – сыворотки крови; В – форменные элементы крови (цифрами под матрицами обозначены дни с момента заражения); Г – гомогенаты образцов: почки (а), селезенки (б), легкого (в), печени (г), участков кожи с папулезными высыпаниями (д, е)

Fig. 1. Results of the rapid analysis of samples from an infected rabbit:

А – layout of capture reagents on the array (Т – test zone, К– and К+ – zones of negative and positive control, respectively). Type of protein matrices after investigation: Б – blood sera; В – formed elements of blood (the numbers under the matrices indicate the days from the moment of infection); Д – homogenates of samples: kidney (а), spleen (б), lung (с), liver (д), areas of skin with papular eruptions (е, f)

с четвертого дня после заражения, что совпадает с повышением температуры тела (см. табл. 2), и содержание его резко возрастает в последующие дни до гибели кролика. На очень высокие титры вируса в крови на пятые и шестые сутки указывает снижение интенсивности окраски зоны К+ на матрице (так называемый хук-эффект), свидетельствующее о том, что конъюгат в процессе анализа в основном связывается с вирусами в жидкой фазе, что приводит к дефициту иммунозоля, реагирующего с антигеном в контрольной точке на поверхности матрицы. Ранее мы отмечали такой эффект при анализе ВОВ с титром, превышающим 10^5 БОЕ/мл (неопубликованные данные). В форменных элементах крови антигены вируса выявляются на сутки позднее (см. рис. 1, В).

На рис. 1, Г видно, что вирус обнаруживается во всех исследованных органах погибшего животного. По результатам анализа распределение концентрации ВОКр в органах кролика по убыванию (легкие, печень, селезенка, почка), хотя такой эффект может быть вызван разной способностью тканей к экстракции вируса, а реальное распределение может быть иным. В кожных высыпаниях (папулах) содержатся высокие концентрации вируса (образцы д и е). Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными [22].

Другим источником клинических материалов служили органы мышей линии BALB/с с массой тела 13–16 г, интраназально инфицированных ВОВ

Таблица 2 / Table 2

Клинические признаки заболевания кролика после интраназального заражения ВОКр

Clinical signs of the disease in rabbits after intranasal inoculation with rabbit poxvirus

Сутки после заражения 24 hours after inoculation	Внешние клинические признаки заболевания External clinical signs of the disease	Температура тела, °С Body temperature, °C
0	Нет/No	39,2
1	Нет/No	39,4
2	Нет/No	39,3
3	Нет/No	39,4
4	Нет/No	39,7
5	Нет/No	40,2
6	Тремор, ринит Tremor, rhinitis	40,6
7	Папулы на коже, гибель Skin papules, death	–

Таблица 3 / Table 3

Характеристики исследованных клинических образцов от мышей
Characteristics of the investigated clinical samples from mice

№ образца Sample No	Инфицирующая доза Infective Dose	Орган Organ	Титр, БОЕ/мл Titer, PFU/ml
1	10 ⁸ БОЕ/животное 10 ⁸ PFU/animal	Носовая перегородка со слизистой / Nasal septum with mucous membrane	1,8·10 ⁷
2		Легкие / Lungs	1,8·10 ⁶
3		Головной мозг / Brain	9,1·10 ⁴
4	10 ⁶ БОЕ/животное 10 ⁶ PFU/animal	Носовая перегородка со слизистой / Nasal septum with mucous membrane	4,0·10 ³
5		Печень / Liver	10
6		Селезенка / Spleen	80
7	0	Селезенка / Spleen	0
8		Головной мозг / Brain	0
9		Легкие / Lungs	0

(ЛИВП)-4 в дозах 10⁶ и 10⁸ БОЕ/животное. Контролем служили органы здоровых мышей. Забор проб органов осуществляли на седьмые сутки после инфицирования, после процедуры эвтаназии с помощью цервикальной дислокации. Для исследования из проб готовили 10 % суспензии путем механической дезинтеграции с помощью стальных шаров и гомогенизатора с последующим добавлением питательной среды ДМЕМ. После нескольких актов замораживания-оттаивания полученных тканевых гомогенатов в них определяли титры вирусов методом бляшек на культуре клеток CV-1. Характеристики предоставленных образцов приведены в табл. 3, а результаты их ускоренного дот-анализа – на рис. 2.

На рис. 2 видно, что вирусы надежно определяются в органах мыши, зараженной высокой дозой вируса. При низкой дозе инфицирования вирус на пределе чувствительности выявляется в слизистой носа. Таким образом, надежное тестирование вируса в гомогенатах органов возможно при их содержании около 10⁴ БОЕ/мл.

Из клинических материалов человека исследователи располагали корочкой с пустулы на месте вакцинации (массой 0,2 г), отпавшей на 29-е сутки после введения осповакцины. Корочка была полу-

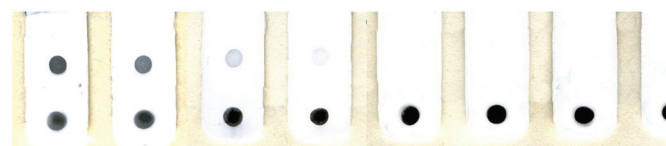


Рис. 2. Вид белковых матриц после ускоренного анализа гомогенатов проб органов мыши. Характеристики образцов приведены в табл. 3

Fig. 2. View of protein arrays after rapid analysis of homogenates of mouse organ samples. The characteristics of the samples are given in table 3

чена из МСЧ 163 в виде обезличенного образца. Высушенную корочку растирали в фарфоровой ступке и суспендировали в 1 мл физиологического раствора. Ориентировочную оценку концентрации ВОВ в суспензии из корочки выполняли путем параллельного титрования этой суспензии и препарата ВОВ (ЛИВП)-3. Из суспензии корочки и препарата ВОВ (ЛИВП)-3 с известным биологическим титром (8,5·10⁶ БОЕ/мл) готовили серии двукратных разведений на РБРК и выполняли с ними ускоренный дот-анализ. Результаты оценки приведены на рис. 3.

Видно, что по интенсивности окраски пятен в тестовой зоне и по максимальному разведению, в котором образцы дают положительный оптический сигнал, препарат из корочки на порядок отстает от вирусного материала. Следовательно, концентрация вируса в суспензии из корочки ориентировочно в 10 раз меньше, чем в исходном препарате ВОВ (ЛИВП)-3 и составляет около 10⁶ БОЕ/мл, а лимит выявления, соответственно, около 5·10³ БОЕ/мл.

Таким образом, ускоренный вариант дот-иммуноанализа позволяет обнаруживать ОПВ в неочищенных вирусных образцах и клинических пробах в диапазоне 10³–10⁴ БОЕ/мл в течение 39 минут. Эта чувствительность немного ниже лимита обнаружения для ИФА с использованием тщательно подобранных пар моноклональных антител [17], но превышает чувствительность известных систем для внелабораторной (point of care) детекции ОПВ [12, 16]. Существенным преимуществом описанного выше теста является то, что он изготовлен с использованием одного вида поликлональных антител и в качестве реагента захвата, и в качестве реагента

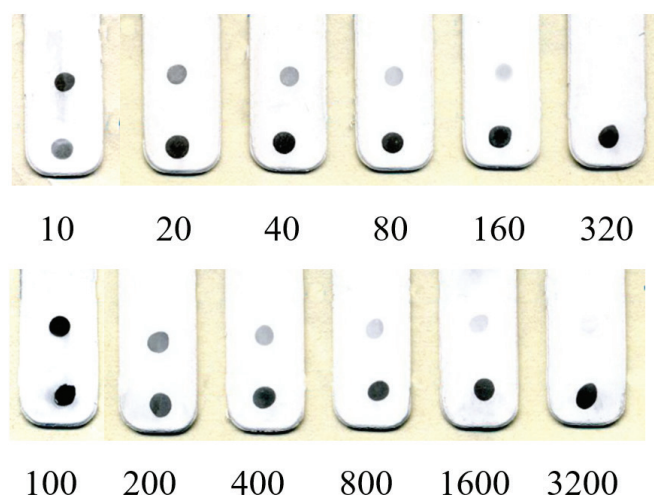


Рис. 3. Сравнительный анализ серий разведений суспензии из корочки с пустулы на месте вакцинации, отпавшей на 29-е сутки после введения осповакцины (верхний ряд) и препарата ВОВ (ЛИВП)-3 (нижний ряд). Цифрами под матрицами указана кратность разведений

Fig. 3. Comparative analysis of dilution series of suspension from a crust from a pustule at the site of vaccination, which fell away on day 29 after the administration of vaccinia (upper row) and vaccinia virus (LIVP)-3 (lower row). The numbers under the matrices indicate the multiplicity of dilutions

детекции, что значительно упрощает и снижает стоимость производства диагностической системы [23]. Хотя в настоящем исследовании протестированы только несколько штаммов ОПВ, известно, что они обладают широкой перекрестной антигенной реактивностью [24], и результаты должны быть сходными для всех ОПВ, в том числе и высокопатогенных для человека.

Описанный выше ускоренный дот-иммуноанализ является чувствительным, специфичным, относительно быстрым, простым в исполнении и недорогим тестом, позволяющим выявлять ОПВ в вирусных и клинических материалах. Результаты теста считываются визуально без необходимости дополнительного оборудования и просты для интерпретации, что важно при выполнении анализов в соответствии с протоколами биоконтроля BSL 3 или BSL 4. Этот способ анализа применим во внелабораторных условиях и может быть полезен при обнаружении вирусной угрозы в различных приложениях биологической защиты.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

- Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses Pathogenic for Humans. New York: Springer; 2005. 425 p.
- Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12):e1003756. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003756.
- Whitley R.J. Smallpox: a potential agent of bioterrorism. *Antiviral Res.* 2003; 57(1–2):7–12. DOI: 10.1016/s0166-3542(02)00195-x.
- Wallin A., Luksiene Z., Zagminas K., Surkiene G. Public health and bioterrorism: renewed threat of anthrax and smallpox. *Medicina (Kaunas)*. 2007; 43(4):278–84.
- Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Smith J.O., Kitalu N.K., Kinkela T.L., Blumberg S., Thomassen H.A., Pike B.L., Fair J.N., Wolfe N.D., Shongo R.L., Graham B.S., Formenty P., Okitolonda E., Hensley L.E., Meyer H., Wright L.L., Muyembe J.J. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010; 107(37):16262–7. DOI: 10.1073/pnas.1005769107.
- Rimoin A., Graham B. Whither monkeypox vaccination. *Vaccine*. 2011; 29Suppl4(Suppl4):D60–4. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.09.004.
- McCollum A.M., Damon I.K. Human monkeypox. *Clin. Infect. Dis.* 2014; 58(2):260–7. DOI: 10.1093/cid/cit703.
- Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of monkeypox. Illinois, Indiana and Wisconsin: JAMA; 2003. P. 30–31.
- Wiacek K., Cwynar J., Bursa D., Horban A., Telega G., Mazur A. A case of cowpox virus infection in a 15-year-old boy and literature overview. *Pediatrica polska*. 2017; 92:778–80. DOI: 10.1016/j.pepo.2017.07.004.
- Vorou R.M., Papavassiliou V.G., Pierrotsakos I.N. Cowpox virus infection: an emerging health threat. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008; 21(2):153–6. DOI: 10.1097/QCO.0b013e3282f44c74.
- Trindade G.S., Lobato Z.I., Drumond B.P., Leite J.A., Trigueiro R.C., Guedes M.I., da Fonseca F.G., dos Santos J.R., Bonjardim C.A., Ferreira P.C., Kroon E.G. Short report: isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 75(3):486–90.
- Townsend M.B., MacNeil A., Reynolds M.G., Hughes C.M., Olson V.A., Damon I.K., Karem K.L. Evaluation of the Tetracore Orthopox BioThreat® antigen detection assay using laboratory grown orthopoxviruses and rash illness clinical specimens. *J. Virol. Meth.* 2013; 187(1):37–42. DOI: 10.1016/j.jviromet.2012.08.023.
- Mabey D., Peeling R.W., Ustianowski A., Perkins M.D. Diagnostics for the developing world. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2:231–40. DOI: 10.1038/nrmicro841.
- Petersen K., McMillan W. IVD systems in bioterrorism response. *IVD Technol.* 2002; 3:12–9.
- Gavrilova E., Shcherbakov D., Maksyutov R., Shchelkunov S. Development of real-time PCR assay for specific detection of cowpox virus. *J. Clin. Virol.* 2010; 49(1):37–40. DOI: 10.1016/j.jcv.2010.06.003.
- Stern D., Olson V., Smith S., Pietraszczyk M., Miller L., Mieth P., Dorner B., Nitsche A. Rapid and sensitive point-of-care detection of orthopoxviruses by ABICAP immunofiltration. *Virol. J.* 2016; 13(1):207. DOI: 10.1186/s12985-016-0665-5.
- Stern D., Pauly D., Zydek M., Miller L., Piesker J., Laue M., Lisdat F., Dorner M.B., Dorner B.G., Nitsche A. Development of a genus-specific antigen capture ELISA for orthopoxviruses – target selection and optimized screening. *PLoS ONE*. 2016; 11(3):e0150110. DOI: 10.1371/journal.pone.0150110.
- Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Таранов О.С., Якубицкий С.Н., Филатов П.В. Быстрый иммунохимический метод выявления ортопоксвирусов (*Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*). *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(6):291–7. DOI: 10.36233/0507-4088-2019-64-6-291-297.
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington: National Academies Press; 1996. 154 p.
- Полтавченко А.Г., Зайтцев Б.Н., Ерш А.В., Корнеев Д.В., Таранов О.С., Филатов П.В., Нечитайло О.В. The selection and optimization of the detection system for self-contained multiplexed dot-immunoassay. *J. Immunoassay Immunochem.* 2016; 37(5):540–54. DOI: 10.1080/15321819.2016.1174134.
- Полтавченко А., Зайтцев Б., Ерш А., Таранов О., Корнеев Д., Никонov А. Selection of Substrate Material for Protein Arrays. *Prot. Met. Phys. Chem. Surf.* 2016; 52(2):301–7. DOI: 10.1134/S2070205116020234.
- Сергеев Ал.А., Булычев Л.Е., Пьянков О.В., Сергеев Ар.А., Боднев С.А., Кабанов А.С., Туманов Ю.В., Юганова И.А., Шишкина Л.Н., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Чувствительность различных видов животных к вирусу оспы обезьян. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012; 111(1):88–91. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-1(111)-88-91.
- Czerny C.P., Meyer H., Mahnel H. Establishment of an ELISA for the detection of orthopox viruses based on neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Zentralbl. Veterinarmed B.* 1989; 36(7):537–46. DOI: 10.1111/j.1439-0450.1989.tb00641.x.
- Gilchuk I., Gilchuk P., Sapparapu G., Lampley R., Singh V., Kose N., Blum D., Hughes L., Satheshkumar P., Townsend M., Kondas A., Reed Z., Weiner N., Olson V., Hammarlund E., Raue H., Slifka M., Slaughter J., Graham B., Edwards K., Eisenberg R., Cohen G., Joyce S., Crowe J. Cross-Neutralizing and Protective Human Antibody Specificities to Poxvirus Infections. *Cell*. 2016; 167(3):684–94. DOI:10.1016/j.cell.2016.09.049.

References

- Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses Pathogenic for Humans. New York: Springer; 2005. 425 p.
- Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12):e1003756. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003756.
- Whitley R.J. Smallpox: a potential agent of bioterrorism. *Antiviral Res.* 2003; 57(1–2):7–12. DOI: 10.1016/s0166-3542(02)00195-x.
- Wallin A., Luksiene Z., Zagminas K., Surkiene G. Public health and bioterrorism: renewed threat of anthrax and smallpox. *Medicina (Kaunas)*. 2007; 43(4):278–84.
- Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Smith J.O., Kitalu N.K., Kinkela T.L., Blumberg S., Thomassen H.A., Pike B.L., Fair J.N., Wolfe N.D., Shongo R.L., Graham B.S., Formenty P., Okitolonda E., Hensley L.E., Meyer H., Wright L.L., Muyembe J.J. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010; 107(37):16262–7. DOI: 10.1073/pnas.1005769107.
- Rimoin A., Graham B. Whither monkeypox vaccination. *Vaccine*. 2011; 29Suppl4(Suppl4):D60–4. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.09.004.
- McCollum A.M., Damon I.K. Human monkeypox. *Clin. Infect. Dis.* 2014; 58(2):260–7. DOI: 10.1093/cid/cit703.
- Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of monkeypox. Illinois, Indiana and Wisconsin: JAMA; 2003. P. 30–31.
- Wiacek K., Cwynar J., Bursa D., Horban A., Telega G., Mazur A. A case of cowpox virus infection in a 15-year-old boy and literature overview. *Pediatrica polska*. 2017; 92:778–80. DOI: 10.1016/j.pepo.2017.07.004.
- Vorou R.M., Papavassiliou V.G., Pierrotsakos I.N. Cowpox virus infection: an emerging health threat. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008; 21(2):153–6. DOI: 10.1097/QCO.0b013e3282f44c74.
- Trindade G.S., Lobato Z.I., Drumond B.P., Leite J.A., Trigueiro R.C., Guedes M.I., da Fonseca F.G., dos Santos J.R., Bonjardim C.A., Ferreira P.C., Kroon E.G. Short report: isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 75(3):486–90.
- Townsend M.B., MacNeil A., Reynolds M.G., Hughes C.M., Olson V.A., Damon I.K., Karem K.L. Evaluation of the Tetracore Orthopox BioThreat® antigen detection assay using laboratory grown orthopoxviruses and rash illness clinical specimens. *J. Virol. Meth.* 2013; 187(1):37–42. DOI: 10.1016/j.jviromet.2012.08.023.
- Mabey D., Peeling R.W., Ustianowski A., Perkins M.D. Diagnostics for the developing world. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2:231–40. DOI: 10.1038/nrmicro841.
- Petersen K., McMillan W. IVD systems in bioterrorism response. *IVD Technol.* 2002; 3:12–9.
- Gavrilova E., Shcherbakov D., Maksyutov R., Shchelkunov S. Development of real-time PCR assay for specific detection of cowpox virus. *J. Clin. Virol.* 2010; 49(1):37–40. DOI: 10.1016/j.jcv.2010.06.003.
- Stern D., Olson V., Smith S., Pietraszczyk M., Miller L., Mieth P., Dorner B., Nitsche A. Rapid and sensitive point-of-care detection of orthopoxviruses by ABICAP immunofiltration. *Virol. J.* 2016; 13(1):207. DOI: 10.1186/s12985-016-0665-5.
- Stern D., Pauly D., Zydek M., Miller L., Piesker J., Laue M., Lisdat F., Dorner M.B., Dorner B.G., Nitsche A. Development of a genus-specific antigen capture ELISA for orthopoxviruses – target selection and optimized screening. *PLoS ONE*. 2016; 11(3):e0150110. DOI: 10.1371/journal.pone.0150110.
- Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Таранов О.С., Якубицкий С.Н., Филатов П.В. Быстрый иммунохимический метод выявления ортопоксвирусов (*Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*). *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(6):291–7. DOI: 10.36233/0507-4088-2019-64-6-291-297.
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington: National Academies Press; 1996. 154 p.
- Полтавченко А.Г., Зайтцев Б.Н., Ерш А.В., Корнеев Д.В., Таранов О.С., Филатов П.В., Нечитайло О.В. The selection and optimization of the detection system for self-contained multiplexed dot-immunoassay. *J. Immunoassay Immunochem.* 2016; 37(5):540–54. DOI: 10.1080/15321819.2016.1174134.
- Полтавченко А., Зайтцев Б., Ерш А., Таранов О., Корнеев Д., Никонov А. Selection of Substrate Material for Protein Arrays. *Prot. Met. Phys. Chem. Surf.* 2016; 52(2):301–7. DOI: 10.1134/S2070205116020234.
- Сергеев Ал.А., Булычев Л.Е., Пьянков О.В., Сергеев Ар.А., Боднев С.А., Кабанов А.С., Туманов Ю.В., Юганова И.А., Шишкина Л.Н., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Чувствительность различных видов животных к вирусу оспы обезьян. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012; 111(1):88–91. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-1(111)-88-91.
- Czerny C.P., Meyer H., Mahnel H. Establishment of an ELISA for the detection of orthopox viruses based on neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Zentralbl. Veterinarmed B.* 1989; 36(7):537–46. DOI: 10.1111/j.1439-0450.1989.tb00641.x.
- Gilchuk I., Gilchuk P., Sapparapu G., Lampley R., Singh V., Kose N., Blum D., Hughes L., Satheshkumar P., Townsend M., Kondas A., Reed Z., Weiner N., Olson V., Hammarlund E., Raue H., Slifka M., Slaughter J., Graham B., Edwards K., Eisenberg R., Cohen G., Joyce S., Crowe J. Cross-Neutralizing and Protective Human Antibody Specificities to Poxvirus Infections. *Cell*. 2016; 167(3):684–94. DOI:10.1016/j.cell.2016.09.049.

- Bonjardim C.A., Ferreira P.C., Kroon E.G. Short report: isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 75(3):486–90.
12. Townsend M.B., MacNeil A., Reynolds M.G., Hughes C.M., Olson V.A., Damon I.K., Karem K.L. Evaluation of the Tetracore Orthopox BioThreat® antigen detection assay using laboratory grown orthopoxviruses and rash illness clinical specimens. *J. Virol. Meth.* 2013; 187(1):37–42. DOI: 10.1016/j.jviromet.2012.08.023.
13. Mabey D., Peeling R.W., Ustianowski A., Perkins M.D. Diagnostics for the developing world. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2:231–40. DOI: 10.1038/nrmicro841.
14. Petersen K., McMillan W. IVD systems in bioterrorism response. *IVD Technol.* 2002; 3:12–9.
15. Gavrilova E., Shcherbakov D., Maksyutov R., Shchelkunov S. Development of real-time PCR assay for specific detection of cowpox virus. *J. Clin. Virol.* 2010; 49(1):37–40. DOI: 10.1016/j.jcv.2010.06.003.
16. Stern D., Olson V., Smith S., Pietraszczyk M., Miller L., Miethe P., Dorner B., Nitsche A. Rapid and sensitive point-of-care detection of orthopoxviruses by ABICAP immunofiltration. *Virol. J.* 2016; 13(1):207. DOI: 10.1186/s12985-016-0665-5.
17. Stern D., Pauly D., Zydek M., Miller L., Piesker J., Laue M., Lisdat F., Dorner M.B., Dorner B.G., Nitsche A. Development of a genus-specific antigen capture ELISA for orthopoxviruses – target selection and optimized screening. *PLoS ONE.* 2016; 11(3):e0150110. DOI: 10.1371/journal.pone.0150110.
18. Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Taranov O.S., Yakubitskiy S.N., Filatov P.V. Rapid immunochemical method for the detection of orthopoxviruses (*Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*). *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2019; 64(6):291–7. DOI: 10.36233/0507-4088-2019-64-6-291-297.
19. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington: National Academies Press; 1996. 154 p.
20. 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. *J. Immunoassay Immunochem.* 2016; 37(5):540–54. DOI: 10.1080/15321819.2016.1174134.
21. Poltavchenko A., Zaitsev B., Ersh A., Taranov O., Korneev D., Nikonov A. Selection of Substrate Material for Protein Arrays. *Prot. Met. Phys. Chem. Surf.* 2016; 52(2):301–7. DOI: 10.1134/S2070205116020234.
22. Sergeev A.A., Bulychev L.E., P'yankov O.V., Sergeev A.A., Bodnev S.A., Kabanov A.S., Tumanov Yu.V., Yurganova I.A., Shishkina L.N., Agafonov A.P., Sergeev A.N. Sensitivity of different animal species to monkeypox virus. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii. [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2012; 11(1):88–91. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-1(11)-88-91.
23. Czerny C.P., Meyer H., Mahnel H. Establishment of an ELISA for the detection of orthopox viruses based on neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Zentralbl. Veterinarmed B.* 1989; 36(7):537–46. DOI: 10.1111/j.1439-0450.1989.tb00641.x.
24. Gilchuk I., Gilchuk P., Sapparapu G., Lampley R., Singh V., Kose N., Blum D., Hughes L., Satheshkumar P., Townsend M., Kondas A., Reed Z., Weiner Z., Olson V., Hammarlund E., Raue H., Slifka M., Slaughter J., Graham B., Edwards K., Eisenberg R., Cohen G., Joyce S., Crowe J. Cross-Neutralizing and Protective Human Antibody Specificities to Poxvirus Infections. *Cell.* 2016; 167(3):684–94. DOI:10.1016/j.cell.2016.09.049.

Authors:

Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Filatov P.V., Ushkalenko N.D., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., Shcherbakov D.N. State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector”. Kol'tsovo, Novosibirsk region, Russian Federation, 630559. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Об авторах:

Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Филатов П.В., Ушкаленко Н.Д., Якубицкий С.Н., Сергеев А.А., Щербakov Д.Н. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., р.п. Колыцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru.