DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-154-162

УДК 616.98:578.833.2:616-07

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

Рекомбинантный аналог домена III оболочечного гликопротеина вируса клещевого энцефалита и его применение для дифференциальной диагностики флавивирусных инфекций

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

Клещевой энцефалит – эндемичное для обширных территорий Европы и Азии инфекционное заболевание, вызываемое вирусом клещевого энцефалита из рода *Orthoflavivirus*, передающееся через укус клеща и характеризующееся лихорадочным состоянием с последующим развитием потенциально смертельного энцефалита. Серологическая диагностика клещевого энцефалита осложняется выраженной перекрестной реактивностью с антителами к возбудителям эндемичных и завозных флавивирусных инфекций. **Цель** исследования – получение рекомбинантного аналога домена III поверхностного белка E вируса клещевого энцефалита (EDIII-ВКЭ) и оценка эффективности его применения для выявления антител класса IgG к вирусу клещевого энцефалита и дифференциации их от антител к возбудителям других флавивирусных инфекций. **Материалы и методы.** Проведено сравнительное исследование панелей, содержащих и не содержащих IgG-антитела к вирусу клещевого энцефалита, а также панелей и образцов, содержащих антитела к вирусам желтой лихорадки, денге и Зика, с использованием коммерческих наборов для иммуноферментного анализа антител к вирусу клещевого энцефалита и экспериментальных наборов в форматах иммуноферментного и дот-иммуноанализа на основе EDIII-ВКЭ. **Результаты и обсуждение.** Показано, что использование экспериментальных наборов на основе EDIII-ВКЭ позволяет эффективно выявлять антитела класса IgG к вирусу клещевого энцефалита и, в отличие от коммерческих тестов, дифференцировать их от антител к возбудителям тропических лихорадок денге, желтой и Зика. Рекомбинантный аналог домена III поверхностного белка E вируса клещевого энцефалита может быть полезным реагентом захвата при создании диагностических тест-систем в формате иммуноферментного и дот-иммуноанализа для дифференцированного выявления антител класса IgG к вирусу клещевого энцефалита.

Ключевые слова: гликопротеин E, вирус клещевого энцефалита, рекомбинантные белки, серологические маркеры, иммуноферментный анализ, дот-иммуноанализ.

Корреспондирующий автор: Филатов Павел Владимирович, e-mail: filatov_pv@vector.nsc.ru.

Для цитирования: Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Филатов П.В., Ушкаленко Н.Д., Шаньшин Д.В., Щербаков Д.Н. Рекомбинантный аналог домена III оболочечного гликопротеина вируса клещевого энцефалита и его применение для дифференциальной диагностики флавивирусных инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024; 3:154–162. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-154-162

Поступила 31.05.2023. Отправлена на доработку 22.09.2023. Принята к публ. 23.05.2024.

A.G. Poltavchenko, A.V. Ersh, P.V. Filatov, N.D. Ushkalenko, D.V. Shan'shin, D.N. Shcherbakov

Recombinant Analogue of Envelope Glycoprotein Domain III of the Tick-Borne Encephalitis Virus and its Application for the Differential Diagnosis of Flavivirus Infections

State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Russian Federation

Abstract. Tick-borne encephalitis is a flavivirus disease, endemic to vast areas of Europe and Asia, caused by the tick-borne encephalitis virus from the genus *Orthoflavivirus*, transmitted through the bite of a tick. The course of infection is characterized by fever followed by the development of potentially fatal encephalitis. Serological diagnosis of tick-borne encephalitis is complicated by severe cross-reactivity with antibodies to other endemic and imported flavivirus infections. **The aim** of the study was to obtain a recombinant analogue of domain III of the surface protein E of the tick-borne encephalitis virus (EDIII-TBEV) and assess its ability to detect antibodies to the tick-borne encephalitis virus and differentiate them from antibodies to other flavivirus infections. **Materials and methods.** A comparative study was performed using panels of sera containing and not containing antibodies to the tick-borne encephalitis virus, and panels of samples with antibodies to yellow fever, dengue, and Zika viruses. The study was conducted using commercial tests and experimental kits based on EDIII-TBEV in the ELISA format and in the dot analysis format. **Results and discussion.** It has been shown that the use of experimental kits based on EDIII-TBEV makes it possible to effectively detect IgG antibodies to tick-borne encephalitis virus and, in contrast to commercial tests, to differentiate them from antibodies to the pathogens of dengue, yellow and Zika tropical fevers. A recombinant analogue of domain III of the surface protein E in the tick-borne encephalitis virus can be a useful capture reagent when creating diagnostic test systems in the format of enzyme-linked immunosorbent assay and dot-immunoassay for the differentiated detection of IgG antibodies to the tick-borne encephalitis virus.

Key words: glycoprotein E, tick-borne encephalitis virus, recombinant proteins, serological markers, ELISA, dot immunoassay.

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

Funding: The study was carried out as part of the implementation of the state assignment of the Federal Service for Surveillance on Consumers' Rights Protection and Human Well-being.

Bioethics: The collection and use of blood sera from employees of the State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector” were approved at meetings of the Ethical Committee of the FBIS SSCVB “Vector” of the Rospotrebnadzor (protocol dated 04/18/2023 No. 6 and protocol dated 04/14/2022 No. 4). During the experiments, all the samples were coded.

Corresponding author: Pavel V. Filatov, e-mail: filatov_pv@vector.nsc.ru.

Citation: Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Filatov P.V., Ushkalenko N.D., Shan'shin D.V., Shcherbakov D.N. Recombinant Analogue of Envelope Glycoprotein Domain III of the Tick-Borne Encephalitis Virus and its Application for the Differential Diagnosis of Flavivirus Infections. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; 3:154–162. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-154-162

Received 31.05.2023. Revised 22.09.2023. Accepted 23.05.2024.

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>

Ushkalenko N.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2171-7444>

Shan'shin D.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9985-1582>

Shcherbakov D.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8023-4453>

Род *Orthoflavivirus* из семейства *Flaviviridae* включает оболочечные вирусы диаметром 40–50 нм со сходной молекулярной организацией, содержащие одноцепочечную РНК положительной полярности длиной от 9 до 11 тыс. нуклеотидных остатков. Представители рода ортофлавириусов (ОФВ) являются возбудителями наиболее распространенных в мире арбовирусных инфекций, многие из которых связывают с путешествиями [1–3]. Передача таких заболеваний обычно осуществляется членистоногими переносчиками – через укусы комаров или клещей. Наиболее значимые для человека ОФВ-инфекции вызываются вирусами денге, Зика, желтой лихорадки, японского энцефалита, Западного Нила и клещевого вирусного энцефалита. Для этих заболеваний характерны лихорадки, в том числе с выраженными геморрагическими проявлениями, менингиты и энцефалиты, сопровождающиеся поражениями центральной нервной системы, печени и других внутренних органов [2, 4]. На территории Российской Федерации наиболее распространенным флавириусом является вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) (около 2 тыс. случаев заболевания в год), регистрируются завозные случаи лихорадки денге [5] и других тропических лихорадок. Поскольку многие инфекционные заболевания, особенно на начальном этапе, могут иметь сходные клинические проявления, для их дифференциации требуются надежные лабораторные методы [3].

Лабораторная диагностика ОФВ-инфекций может быть выполнена с использованием различных подходов, наиболее широко используются молекулярно-биологические и серологические тесты. Надежные результаты при высокой степени чувствительности и специфичности, позволяющие дифференцировать виды и даже штаммы ОФВ, может обеспечить полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), однако реализация этого метода возможна в строго контролируемых лабораторных условиях. Кроме того, ОТ-ПЦР позволяет обнаруживать вирус только на ранней стадии инфекционного процесса (5–7 дней с начала заболевания). При возникновении клинических симптомов и обращении пациентов за медицинской помощью вирус уже может снизиться до неопределяемого уровня, что делает метод ОТ-ПЦР малоэффективным [3, 6]. В таких случаях может быть полезной диагностика, основанная на обнаружении антител класса IgM (со второй недели заболевания) или класса IgG (с третьей неде-

ли болезни) в сыворотках крови пациентов. Для подтверждения активной инфекции исследуют парные сыворотки, отобранные с интервалом в 7–10 дней. Серологические методы проще в исполнении, менее затратны и прихотливы, чем ПЦР. Некоторые форматы методов выявления антител могут выполняться в условиях слабо оснащенных медицинских пунктов, не требуют участия квалифицированных медицинских кадров [3, 6]. Ранее нами создана автономная платформа дот-иммуноанализа на основе белковых матриц, позволяющая проводить одновременное выявление нескольких серологических маркеров инфекционных заболеваний, допускающая визуальный учет результатов и пригодная для использования вне лаборатории [7]. Такой подход может быть полезен для диагностики клещевых инфекций в наиболее уязвимых эндемичных регионах с недостаточно развитой лабораторной инфраструктурой [6, 8].

Для распознавания клещевых инфекций необходим набор, который не только способен дифференцировать возбудителей серокомплекса клещевого энцефалита (КЭ) [9], но и дает возможность отличать их от случаев с другой этиологией. В частности, значительные затруднения могут возникать при дифференциации антител к ВКЭ, вирусу лихорадки денге [10] и другим ОФВ. Ложноположительные результаты, вызванные перекрестной реактивностью ОФВ, создают большие проблемы для эпиднадзора и диагностики. Их частично перекрывающееся географическое распространение и сходные симптомы в сочетании с увеличением количества поездок в эндемичные регионы и антителами, приобретенными в результате вакцинации, увеличивают потребность в быстрых и надежных диагностических тестах в дополнение к используемым в настоящее время методам. Сейчас для серологической диагностики КЭ наиболее широко используется планшетный вариант иммуноферментного анализа (ИФА) с захватом антител на иммуносорбенте, сенсibilизированном суммарными белками ВКЭ или цельным очищенным и инактивированным вирусом [11–14]. Такой подход обеспечивает высокую чувствительность выявления антител, но сопровождается выраженной реактивностью с антителами к другим ОФВ, поскольку аминокислотная гомология белков, кодируемых геномами разных видов ОФВ, достигает 70–90 % [15, 16]. Чтобы преодолеть перекрестную реактивность в серодиагностике ОФВ, предпочтительно использование не цельного вируса, а рекомбинантных анти-

генов [3, 8, 14, 17]. Наиболее часто в тест-системах используются рекомбинантные белки оболочки (E) [9, 18, 19], премембраны (pre M) [17] и неструктурный белок NS1 [3]. Белок E имеет молекулярную массу около 50 кДа (496 а.о.), является основным структурным белком ВКЭ и иммунодоминантным антигеном при выработке нейтрализующих антител. При нейтральном значении рН гликопротеин E представляет собой димер, мономеры которого состоят из трех отдельных доменов [14]. Домены I и II включают кросс-реактивные эпитопы и способны выявлять общие для ОФВ антитела [20], а домен III (EDIII) содержит наибольшее число видоспецифичных эпитопов и перспективен для изготовления дифференцирующих тестов [9, 14, 18, 19].

Цель работы – получение рекомбинантного аналога домена III поверхностного белка E ВКЭ (EDIII-ВКЭ) и предварительная оценка эффективности его применения для серологической дифференциальной диагностики ОФВ-инфекций в формате ИФА и автоматического дот-иммуноанализа.

Материалы и методы

Материалы. В работе использовали химические реактивы и моноклональные антитела мыши против IgG человека (I9388) (Sigma, США), если по тексту не указано другое. Для изготовления подложек белковых матриц применяли синтетическую бумагу Zenofol-Print толщиной 0,5 мм («Зенон», Россия). В качестве контроля качества конъюгата и проявителя в дот-анализе использовали IgG из сыворотки человека (Igg) («Имтек», Россия).

Исследуемые образцы. В экспериментах использовали пул сывороток крови человека, содержащий:

- панель образцов, содержащих и не содержащих антитела к ВКЭ, включающую 40 положительных и 20 отрицательных сывороток крови, предоставленную по договору о сотрудничестве БУЗ Республики Алтай «Центр по профилактике и борьбе со СПИД»;

- панель из 20 образцов сывороток крови сотрудников ГНЦ ВБ «Вектор», привитых против ВКЭ, отбор и использование сывороток крови одобрены на заседании этического комитета ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол от 18.04.2023 № 6);

- панель образцов, включающую 10 сывороток крови, полученных от сотрудников ГНЦ ВБ «Вектор», вакцинированных против желтой лихорадки (ЖЛ), участие в исследовании одобрено на заседании этического комитета ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол от 14.04.2022 № 4), при формировании панели отбирали образцы у пациентов с подтвержденным наличием специфических антител к вирусу ЖЛ [21] и не имевших вакцинации или перенесенного КЭ в анамнезе;

- коммерческую панель из 9 образцов сыворотки крови, содержащих маркеры лихорадки

денге (Dengue Fever Verification panel, KZMC028; ZeptoMetrix®, LLC, США);

- коммерческую контрольную панель, включающую два образца, содержащие IgG и IgM к вирусу Зика, а также негативный контроль (Zika IgM/IgG Control Pack [IgM, IgG & Negative Controls], 0801020; ZeptoMetrix®, LLC, США), предоставленную ООО «Имбиан-Лаб» (Россия);

- панель из 10 образцов больных вирусным гепатитом С (ВГС), предоставленную ООО «Имбиан-Лаб» (Россия) в закодированном виде.

При проведении экспериментов все образцы подвергались кодированию.

Получение рекомбинантного аналога домена III гликопротеина E вируса клещевого энцефалита (EDIII-ВКЭ)

Получение рекомбинантной конструкции EDIII-ВКЭ. Синтез гена, кодирующего фрагмент оболочного белка E вируса клещевого энцефалита с 586–679 а.о., соответствующий домену III (EDIII-ВКЭ) штамма Glubinoe/2004 [GenBank: DQ862460.1], осуществлялся в ООО «ДНК-Синтез» (Россия). Синтезированную нуклеотидную последовательность gEDIII-ВКЭ клонировали в составе экспрессионной плазмиды pET32a по сайтам рестрикции BamHI и SclI в единой рамке считывания с последовательностью, кодирующей белок тиоредоксин (Trx). Рекомбинантной плазмидой pET32-EDIII-ВКЭ трансформировали клетки *Escherichia coli* штамма Stb13 (Thermo Fisher Scientific, США) методом химической трансформации [22]. Клетки *E. coli* высевали на селективную среду, содержащую агар LB и 100 мкг/мл ампициллина. Полученные колонии *E. coli* использовали для наработки плазмидной ДНК. Целостность рамки считывания проверяли с помощью рестрикционного анализа, ПЦР и секвенирования по Сенгеру.

Наработка и очистка рекомбинантных белков. Для экспрессии гена, кодирующего белок EDIII-ВКЭ, плазмидой pET32-EDIII-ВКЭ трансформировали клетки *E. coli* штамма BL21(DE3). Клетки культивировали в среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, до достижения оптической плотности OD=0,6–0,8. В культуру клеток вносили изопропил-β-D-1-тиогактопиранозид (IPTG; Sigma, США) до конечной концентрации 0,5 мМ и инкубировали в термостатируемом шейкере роторного типа в течение 16 ч при температуре 37 °С, 180 об/мин. Биомассу осаждали центрифугированием (6000 g, 15 мин, 4 °С), ресуспендировали в лизирующем буферном растворе (30 мМ NaH₂PO₄, 0,5 М NaCl, 20 мМ имидазол, 8 М Urea, 1 % TritonX100, pH 7,4) и обрабатывали ультразвуком циклами по 2 мин с частотой 100 мHz до достижения оптической плотности OD=0,2. Для удаления клеточного дебриса культуру после обработки ультразвуком центрифугировали (25000 g, 25 мин, 4 °С). Очистку целевого белка из лизата выполняли методом металл-хелатной аффинной хроматографии на сорбенте Ni-IMAC

сефарозы (GE Healthcare, США), объем сорбента в колонке – 5 мл. Элюцию проводили фракциями по 10 мл с контролем целевого белка методом электрофоретического разделения белков в денатурирующих условиях в 15 % полиакриламидном геле по методу Лэммли [23].

Экспериментальный набор для дот-иммуноанализа «Вектор ВКЭ IgG-дот». Для получения белковых матриц на поверхность подложки из синтетической бумаги Zenofol-Print дискретно наносили аликвотами по 3 мкл раствор рекомбинантного белка EDIII-ВКЭ с концентрацией 2,6 мкг/мл в 0,01 М боратном буферном растворе (рН 6,0) – тестовая точка и IgG человека (Sigma, США), с концентрацией 2,5 мкг/мл в том же растворе – контрольная точка. Матрицы блокировали погружением в раствор 0,2 % казеина на 2 ч при комнатной температуре, просушивали, упаковывали в полиэтилен и хранили до использования при температуре 4 °С. Конъюгат коллоидного золота (30 нм), связанного с моноклональными антителами мыши против IgG человека получали так, как описано ранее [24]. Для проявления результатов применяли таблетки сухой смеси,

содержащие 2,5 мг лимонной кислоты и 2 мг метола, а также жидкий компонент в виде 0,4 % раствора нитрата серебра. Дот-анализ выполняли в многоячеечной аналитической ванне, заполненной готовыми к применению растворами (табл. 1).

В первый ряд ячеек ванны вносили по 15 мкл исследуемых образцов сывороток человека (разведение 1/20), а в 9-й ряд – 200 мкл очищенной воды (для растворения сухого компонента проявителя). Белковые матрицы погружали в первый ряд ячеек, инкубировали в течение 30 мин, а затем последовательно перемещали по следующим рядам ячеек согласно алгоритму, представленному в табл. 2. Непосредственно перед внесением матриц в ячейки 9-го ряда в них добавляли по 200 мкл 0,4 % раствора нитрата серебра. После выемки из последнего ряда ячеек матрицы подсушивали на воздухе и визуально учитывали результаты. Положительными считали образцы, дающие отчетливо различимое темное пятно в тестовой точке. Для оценки достоверности субъективного визуального учета результатов дот-анализа изображения матриц оцифровывали с применением планшетного сканера, проводили анализ

Таблица 1 / Table 1

Содержимое ячеек аналитической ванны и алгоритм выполнения анализа
Analytical bath wells content and time of each stage of analysis

Ряд Row	Состав раствора + реагенты, внесенные в ходе анализа Composition of the working solution and reagents added during the analysis	Объем, мкл Volume, µL	Время стадии, мин Duration of each stage, minutes
1	Раствор для разведения образца – ФСБ-Т с 0,02 % казеина, рН 8,0 + 15 мкл исследуемого образца Solution for sample dilution – (PBS-T with 0.02 % casein, pH 8.0) + 15 µL of the sample	300	30
2	Отмывочный раствор – ФСБ-Т Washing solution PBS-T	350	1
3	Отмывочный раствор – ФСБ-Т Washing solution PBS-T	350	1
4	Рабочее разведение конъюгата Au-a/IgG в ФСБ-Т Working dilution of colloidal gold in PBS-T (20 nm) associated with monoclonal antibodies to human IgG	300	30
5	Отмывочный раствор – ФСБ-Т Washing solution PBS-T	350	1
6	Отмывочный раствор – ФСБ-Т Washing solution PBS-T	350	1
7	Вода очищенная Purified water	400	1
8	Вода очищенная Purified water	400	1
9	Таблетка сухого компонента проявителя + 20 мкл воды очищенной + 200 мкл 0,4 % раствора нитрата серебра Tablet of a dry mixture of citric acid and metol + 20 µL of purified water + 200 µL of 0.4 % silver nitrate solution	4 мг 4 mg	7
10	Вода очищенная Purified water	400	1
11	Стабилизатор окраски – 1 % тиомочевины и 1 % NaOH в воде очищенной Color stabilizer, i.e. 1 % thiourea in 1 % dilution NaOH based on purified water	300	1
12	Вода очищенная Purified water	400	1

Примечание: ФСБ-Т – 0,02 М натрий-фосфатный буферный раствор с 0,8 % NaCl, 0,1 % Твин-20 и 0,1 % азиды натрия, рН 7,2.

Note: PBS-T – 0.02 M sodium phosphate buffer solution with 0.8 % NaCl, 0.1 % Tween-20 and 0.1 % sodium azide, pH 7.2.

сканов с использованием компьютерной программы DOTREADER 2000 [25], регистрировали оптические сигналы (ОС) в относительных единицах и выполняли их статистическую обработку.

Экспериментальный набор для ИФА «Вектор ИФА ВКЭ IgG». 96-луночные высокосорбционные полистироловые планшеты NEST (Nest Biotechnology, Китай) сенсибилизировали рекомбинантным белком EDIII-ВКЭ с концентрацией 1 мкг/мл в 0,01 М карбонатном буферном растворе (рН 9,4) из объема 100 мкл/яч. Планшеты инкубировали 16–18 ч при температуре 4 °С, блокировали в течение 2 ч при комнатной температуре 0,2 % раствором казеина, высушивали, упаковывали в полиэтилен и хранили до использования при 4 °С. Анализ выполняли в объеме 100 мкл с инкубациями по 30 мин с образцами и конъюгатом на основе моноклональных антител к IgG человека, меченных пероксидазой хрена («Имтек», Россия) в термошейкере (Biosan, Латвия) при температуре 37 °С и 600 об/мин. После каждой инкубации планшет 5-кратно вручную промывали фосфатно-солевым буферным раствором с 0,1 % Твин-20 (ФСБ-Т). Проявление результатов субстратом на основе ТМБ (Tetramethylbenzidine liquid substrate system for ELISA, Sigma, США) выполняли в течение 15 мин при комнатной температуре и после внесения стоп-реагента, учитывали результаты с использованием спектрофотометра Tecan Sunrise RC (Tecan Austria GmbH, Австрия) при длине волны 450 нм.

Тесты сравнения. Для сравнения использовали коммерческие наборы для ИФА:

– «ВектоВКЭ-IgG» (D-1156). Набор реагентов для иммуноферментного выявления и количественного определения иммуноглобулинов класса G к вирусу клещевого энцефалита (РУ от 11.04.2017 № РЗН 2017/5605, АО «Вектор-Бест»);

– «БиоСкрин-КЭ (комплект G)» (E-1145). Набор реагентов для выявления антигенов вируса клещевого энцефалита и антител к нему методом иммуноферментного анализа (ТУ 9398-019-10839330-2012, АО БТК «Биосервис»).

Анализ с использованием этих наборов выполняли в соответствии с инструкциями производителей.

Статистическая обработка. Все эксперименты выполняли в пяти повторах. Статистическую обработку полученных данных проводили стандартными методами (оценка среднего, стандартное отклонение, доверительный интервал, коэффициент вариации для вероятности 95 %) с помощью программного продукта Microsoft Excel. Количественные данные представлены в виде $M \pm \epsilon$, где M – среднее значение, ϵ – полуширина доверительного интервала для вероятности 95 % ($p=0,95$, $\alpha=0,05$).

Результаты и обсуждение

Настоящая работа направлена на исследование эффективности применения полученного рекомбинантного аналога белка ВКЭ в качестве реагента

захвата для выявления антител класса IgG в мультиплексном автономном тесте. Основой этого теста служит дот-иммуноанализ на белковых матрицах, выполняющийся в многоячеечных ваннах, заполненных готовыми растворами. Ранее мы использовали аналогичный подход при диагностике лихорадки денге [26]. Такой тест прост в использовании, допускает применение вне лаборатории и может оказаться полезным в отдаленных сельских районах или во время экспедиций в труднодоступные регионы, где вероятность укуса инфицированного клеща высока, а возможности квалифицированного лабораторного обследования ограничены. Одной из основных задач этой работы являлось изыскание иммунореагентов захвата, обеспечивающих высокую селективность выделения на матрицах специфических антител из образца. Известно, что тест-системы, изготовленные с использованием цельных вирионов различных штаммов ВКЭ, значительно различаются по чувствительности, но все обладают высокой перекрестной реактивностью с антителами к другим флавивирусам, что не позволяет дифференцировать специфические антитела к возбудителю [11–13]. Появившиеся в последнее время публикации свидетельствуют о том, что проблема специфичности анализа может быть решена применением рекомбинантных белков, содержащих высокоселективные антигенные детерминанты, в частности фрагментом III поверхностного гликопротеида E [9, 14, 18, 19]. В предыдущих публикациях мы оценивали применение аналогичного белка вируса денге для дифференциации антител к вирусам денге, Зика, желтой лихорадки и ВКЭ и показали высокую селективность такого подхода [26]. В настоящей работе получен рекомбинантный белок (EDIII-ВКЭ) и на его основе изготовлены экспериментальные наборы для ИФА и дот-анализа. Эти тесты сравнивали с двумя коммерчески доступными наборами для ИФА. Сравнение проводили с использованием: панелей сывороток крови от вакцинированных лиц со сроком после вакцинации не менее 2 мес., образцов, содержащих и не содержащих антитела к ВКЭ, и панелей образцов, содержащих серологические маркеры других ОФВ-инфекций. Результаты параллельного исследования приведены в табл. 2. Положительными результатами при инструментальном учете результатов ИФА и дот-анализа считали данные $M \pm \epsilon$, превышающие значения $OP_{крит}$, а при визуальном учете результатов дот-анализа – отчетливо различимое темное пятно в тестовой точке на белковой матрице.

Видно, что образцы панели, содержащей отрицательные сыворотки доноров крови и положительные образцы от больных или перенесших заболевание КЭ пациентов, адекватно определяются всеми использованными наборами. При этом набор «ВектоВКЭ-IgG» выявляет антитела во всех образцах вакцинированных лиц, в то время как другой коммерческий набор, «БиоСкрин-КЭ», одну сыворотку определяет как отрицательную, а оба экспери-

Таблица 2 / Table 2

Результаты сравнительного определения антител к вирусу клещевого энцефалита коммерческими и экспериментальными наборами для ИФА и дот-иммуноанализа

Results of comparative determination of antibodies to tick-borne encephalitis virus using commercial and experimental kits for ELISA and dot-immunoassay

Панель образцов Sample panel	Результаты ИФА, ОП ₄₅₀ Results of ELISA (OD 450 nm)				Результаты дот-анализа Results of dot-analysis	
	«ВектоВКЭ- IgG» “VectoTBEV- IgG”	«БиоСкрин- КЭ» “BioScreen- TBE”	Экспериментальный набор «Вектор ИФА ВКЭ IgG» Experimental kit “Vector ELISA TBEV-IgG”	Экспериментальный набор «Вектор ВКЭ IgG-дот» Experimental kit “Vector TBEV-IgG-dot”		
				ИУ* IR*	ВУ** VR**	
Содержащих и не содержащих антитела против ВКЭ Containing and not containing antibodies against TBEV	+	40	40	40	40	40
	-	0	0	0	0	0
От пациентов, вакцинированных против КЭ From patients vaccinated against TBE	+	20	19	17	17	17
	-	0	1	3	3	3
От пациентов, вакцинированных против желтой лихорадки From patients vaccinated against yellow fever	+	8	8	0	0	0
	-	2	2	10	10	10
Содержащих маркеры лихорадки денге Containing markers of dengue fever	+	7	7	0	0	0
	-	2	2	9	9	9
Содержащих маркеры лихорадки Зика Containing markers of Zika fever	+	2	2	0	0	0
	-	1	1	3	3	3
От больных гепатитом С From patients with hepatitis C	+	0	0	0	0	0
	-	10	10	10	10	10

Примечания: * данные, полученные с использованием инструментального учета результатов; ** данные, полученные при визуальном учете результатов.

Notes: * data obtained through instrumental registration of results; ** data obtained by visual recording of results.

ментальных набора не выявляют антитела в трех образцах этой панели. Это может быть как следствием применения более избирательных реагентов захвата, так и индивидуальных особенностей иммунной системы пациентов [20, 27] или того факта, что содержание IgG в негативных сыворотках еще не достигло определяемых экспериментальными наборами уровней. Ранее некоторые авторы отмечали значительные отличия при исследовании крови вакцинированных в зависимости от использования гомологичных или гетерологичных антигенов захвата по отношению к вакцине [11, 28].

При исследовании панели образцов, содержащих антитела к вирусу желтой лихорадки, оба коммерческих набора показывают положительные результаты со всеми образцами, за исключением двух сывороток, формирующих, как было показано ранее, самые слабые оптические сигналы в ИФА. В панели образцов, содержащих маркеры лихорадки денге, эти наборы положительно определяют 7 из 9 образцов. Две сыворотки, показавшие отрицательные результаты, как показано в предыдущей работе [26], содержат не IgG к вирусу денге, а другие маркеры (IgM и белок NS1). В панели образцов с антителами к вирусу Зика коммерческие наборы дают позитивный сигнал с сыворотками, содержащими IgG и IgG+IgM антитела, но не реагируют с негативным контролем. Таким образом, использованные коммерческие наборы не обеспечивают дифференциацию

антител к разным видам возбудителей внутри рода *Orthoflavivirus*, однако не реагируют с антителами к вирусу гепатита С – представителю рода *Hepacivirus* семейства *Flaviviridae*.

Оба экспериментальных набора не обнаруживают взаимодействия с образцами гетерогенных панелей, что свидетельствует о высокой специфичности белка EDIII-ВКЭ, позволяющей отличать антитела к ВКЭ от антител к другим представителям рода *Orthoflavivirus*.

Сравнение чувствительности использованных наборов при выявлении антител к ВКЭ приведено в табл. 3 на примере двух позитивных образцов с высоким (образец 1) и низким (образец 2) содержанием специфических антител.

По данным табл. 3 видно, что набор «ВектоВКЭ-IgG» обеспечивает более высокие показатели оптической плотности положительных образцов и более высокую чувствительность по сравнению с другими тестами. Вероятно, это обстоятельство объясняет более эффективное выявление специфических антител в сыворотках от вакцинированных пациентов (см. табл. 2). Оба экспериментальных набора (ИФА и дот-иммуноанализ с инструментальным и визуальным учетом результатов) показывают идентичные результаты выявления IgG к ВКЭ, обеспечивают достаточную чувствительность и высокую специфичность при адекватной воспроизводимости (коэффициент вариации в рабочем диапазоне для того и другого

Таблица 3 / Table 3

Сравнительные результаты чувствительности определения специфических антител коммерческими и экспериментальными наборами для ИФА и дот-иммуноанализа

Comparison of results of specific antibody determination using commercial and experimental kits for ELISA and dot-immunoassay

Образец Sample	Разведение Dilution	Результаты ИФА, ОП ₄₅₀ Results of ELISA, OD 450 nm (M±ε)			Результаты дот-анализа Results of dot-analysis	
		«ВектоВКЭ-IgG» “VectoTBEV-IgG”	«БиоСкрин-КЭ» “BioScreen-TBE”	Экспериментальный набор «Вектор ИФА ВКЭ IgG» Experimental kit “Vector ELISA TBEV-IgG”	Экспериментальный набор «Вектор ВКЭ IgG-дот» Experimental kit “Vector TBEV-IgG-dot”	
					ИУ* (усл. ед., [M±ε]) IR* (condit. unit, [M±ε])	ВУ** VR**
1	1:10	2,501±0,142	1,888±0,147	1,719±0,104	1341±69	+
	1:20	1,965±0,212	1,479±0,121	1,209±0,160	1140±58	+
	1:40	1,505±0,145	1,184±0,119	1,103±0,190	773±77	+
	1:80	0,945±0,069	0,749±0,084	0,669±0,109	542±82	+
	1:160	0,596±0,072	0,443±0,051	0,381±0,042	336±27	+
	1:320	0,398±0,023	0,209±0,016	0,225±0,041	172±27	–
	1:640	0,078±0,017	0,162±0,044	0,106±0,035	124±12	–
2	1:10	0,631±0,074	0,498±0,100	0,362±0,028	311±38	+
	1:20	0,339±0,009	0,250±0,053	0,233±0,015	191±30	–
	1:40	0,152±0,013	0,178±0,014	0,104±0,023	155±27	–
ОП _{крит} / OD _{critical}		0,300	0,300	0,280	250	

Примечания: жирным шрифтом выделены положительные результаты анализа; * данные, полученные с использованием инструментального учета результатов; ** данные, полученные при визуальном учете результатов; + положительный результат, – отрицательный результат.

Notes: positive test results are indicated in bold lettering; * data obtained by instrumental registration of results; ** data obtained by visual recording of results; + positive result, – negative result.

набора не превышает 7 %). Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными по сравнению эффективности выявления антител наборами, изготовленными с использованием полных вирусных частиц, крупных вирусных субъединиц и рекомбинантного белка в качестве реагентов захвата [8]. Авторы делают вывод, что с уменьшением количества сайтов связывания на используемом антигене захвата чувствительность непрямого ИФА снижается, что мы и видим при исследовании панели вакцинированных. С другой стороны, ограничение сайтов связывания специфичными антигенными детерминантами, присутствующими на рекомбинантном белке EDIII-ВКЭ, обеспечивает высокую селективность детекции антител к ВКЭ.

Полученные данные позволяют сделать выводы о перспективности использования рекомбинантного белка EDIII-ВКЭ в диагностических наборах для дифференциальной диагностики КЭ на поздних стадиях заболевания, ретроспективной диагностики при эпидемиологических исследованиях и оценки иммунного статуса пациента после вакцинации. Кроме того, эти результаты открывают возможность использования белка EDIII-ВКЭ при разработке автономных наборов на основе дот-анализа для одновременного дифференциального определения антител к нескольким возбудителям клещевых инфекций или нескольких маркеров (IgG, IgM и ранних белков) клещевого энцефалита, что позволит сделать диагностику клещевых инфекций более информативной и доступной.

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

Финансирование. Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Биоэтика. Отбор и использование сывороток крови сотрудников ГНЦ ВБ «Вектор» одобрены на заседаниях этического комитета ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол от 18.04.2023 № 6 и от 14.04.2022 № 4). При проведении экспериментов все образцы подвергались кодированию.

Список литературы

1. Wilson M.E., Weld L.H., Boggild A., Keystone J.S., Kain K.C., von Sonnenburg F., Schwartz E.; GeoSentinel Surveillance Network. Fever in returned travelers: results from the GeoSentinel Surveillance Network. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 44(12):1560–8. DOI: 10.1086/518173.
2. Cleton N., Koopmans M., Reimerink J., Godeke G.-J., Reusken C. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. *J. Clin. Virol.* 2012; 55(3):191–203. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.07.004.
3. Cleton N.B., Godeke G.-J., Reimerink J., Beersma M.F., van Doorn H.R., Franco L., Goeijenbier M., Jiménez-Clavero M.A., Johnson B.W., Niedrig M., Papa A., Sambri V., Tami A., Velasco-Salas Z.I., Koopmans M.P., Reusken C.B. Spot the difference: development of a syndrome based protein microarray for specific serological detection of multiple flavivirus infections in travelers. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(3):e0003580. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003580.
4. Sips G.J., Wilschut J., Smit J.M. Neuroinvasive flavivirus infections. *Rev. Med. Virol.* 2012; 22(2):69–87. DOI: 10.1002/rmv.712.
5. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 году:

- Государственный доклад. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/594/sqyww14tg5arqff6xv15dss017vuuank/Gosudarstvennyy-doklad.-O-sostoyanii-sanitarno-epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-Rossiyskoy-Federatsii-v-2021-godu.pdf> (дата обращения 21.04.2023).
- Darwish N., Alias Y., Khor S. An introduction to dengue-disease diagnostics. *Trends in Analytical Chemistry*. 2015; 67:45–55. DOI: 10.1016/j.trac.2015.01.005.
 - 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. Methods*. 2016; 236:231–6. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.08.003.
 - Guzmán M.G., Kourí G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int. J. Infect. Dis.* 2004; 8(2):69–80. DOI: 10.1016/j.ijid.2003.03.003.
 - Holbrook M.R., Shope R.E., Barrett A.D.T. Use of recombinant E protein domain III-based enzyme-linked immunosorbent assays for differentiation of tick-borne encephalitis serocomplex flaviviruses from mosquito-borne flaviviruses. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(9):4101–10. DOI: 10.1128/JCM.42.9.4101-4110.2004.
 - Терновой В.А., Плясунова И.В., Семенцова А.О., Карташов М.Ю., Швалов А.Н., Чаусов Е.В., Еремеева Л.И., Протопопова Е.В., Чуб Е.В., Баяндин Р.Б., Пьянков О.В., Локтев В.Б., Агафонов А.П., Максютов Р.А. Выявление маркеров лихорадки денге у пациентов после посещения эндемичных по денге стран. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2019; 37(3):140–8. DOI: 10.17116/molgen201937031140.
 - Niedrig M., Vaisviliene D., Teichmann A., Klockmann U., Biel S.S. Comparison of six different commercial IgG-ELISA kits for the detection of TBEV-antibodies. *J. Clin. Virol.* 2001; 20(3):179–82. DOI: 10.1016/s1386-6532(00)00178-5.
 - Weissbach F.H., Hirsch H.H. Comparison of two commercial tick-borne encephalitis virus igg enzyme-linked immunosorbent assays. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015; 22(7):754–60. DOI: 10.1128/CVI.00096-15.
 - Ackermann-Gäumann R., Tritten M.L., Hassan M., Lienhard R. Comparison of three commercial IgG and IgM ELISA kits for the detection of tick-borne encephalitis virus antibodies. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018; 9(4):956–62. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.03.031.
 - Барышникова В.С., Турченко Ю.В., Шишова А.А., Климентов А.С., Тучинская К.К., Карганова Г.Г. Рекомбинантный гликопротеин E вируса клещевого энцефалита для создания дифференцирующей тест-системы. *Биотехнология*. 2022; 38(6):72–83. DOI: 10.56304/S0234275822060023.
 - Heinz F.X., Stiasny K. Flaviviruses and their antigenic structure. *J. Clin. Virol.* 2012; 55(4):289–95. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.08.024.
 - Pulkkinen L.I.A., Barrass S.V., Domanska A., Överby A.K., Anastasina M., Butcher S.J. Molecular organisation of tick-borne encephalitis virus. *Viruses*. 2022; 14(4):792. DOI: 10.3390/v14040792.
 - Inagaki E., Sakai M., Hirano M., Muto M., Kobayashi S., Kariwa H., Yoshii K. Development of a serodiagnostic multi-species ELISA against tick-borne encephalitis virus using subviral particles. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016; 7(5):723–9. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2016.03.002.
 - Ludolfs D., Reinholz M., Schmitz H. Highly specific detection of antibodies to tick-borne encephalitis (TBE) virus in humans using a domadewsin III antigen and a sensitive immune complex (IC) ELISA. *J. Clin. Virol.* 2009; 45(2):125–8. DOI: 10.1016/j.jcv.2009.03.016.
 - Sanina N., Chopenko N., Mazeika A., Davydova L., Leonova G., Stenkova A., Üversky V.N., Kostetsky E. Immunogenicity and protective activity of a chimeric protein based on the domain III of the tick-borne encephalitis virus E protein and the OmpF porin of *Yersinia pseudotuberculosis* incorporated into the TI-complex. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(10):2988. DOI: 10.3390/ijms19102988.
 - Jarmer J., Zlatkovic J., Tsouchnikas G., Vratskikh O., Strauß J., Aberle J.H., Chmelik V., Kundi M., Stiasny K., Heinz F.X. Variation of the specificity of the human antibody responses after tick-borne encephalitis virus infection and vaccination. *J. Virol.* 2014; 88(23):13845–57. DOI: 10.1128/JVI.02086-14.
 - Кривошеина Е.И., Карташов М.Ю., Найденова Е.В., Ушкаленко Н.Д., Пьянков С.А., Терновой В.А., Локтев В.Б. Разработка способа выявления специфических антител к белку E вируса жёлтой лихорадки (Flaviviridae: *Flavivirus*) методом иммуноферментного анализа. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(4):341–50. DOI: 10.36233/0507-4088-123.
 - Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир; 1984. 479 с.
 - Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.
 - Poltavchenko A., Zaitsev B., Ersh A., Korneev D., Taranov O., Filatov P., Nechitaylo O. 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.
 - Кунгурцев К.С., Гунгер А.К., Филатов П.В. Программа для инструментального учета результатов дот-иммуноанализа «DOTREADER 2000». Программа для ЭВМ. Свидетельство РФ № 2020611545, опублик. 04.02.2020. Бюл. № 2.
 - Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Филатов П.В., Баяндин Р.Б., Ушкаленко Н.Д. Разработка метода одновременного выявления серологических маркеров лихорадки денге. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2023; 12(1):75–83. DOI: 10.33029/2305-3496-2023-12-1-75-83.
 - Lindblom P., Wilhelmsson P., Fryland L., Matussek A., Haglund M., Sjöwall J., Vene S., Nyman D., Forsberg P., Lindgren P.-E. Factors determining immunological response to vaccination against tick-borne encephalitis virus in older individuals. *PLoS One*. 2014; 9(6):e100860. DOI: 10.1371/journal.pone.0100860.
 - Kuno G. Serodiagnosis of flaviviral infections and vaccinations in humans. *Adv. Virus Res.* 2003; 61:3–65. DOI: 10.1016/s0065-3527(03)61001-8.

References

- Wilson M.E., Weld L.H., Boggild A., Keystone J.S., Kain K.C., von Sonnenburg F., Schwartz E.; GeoSentinel Surveillance Network. Fever in returned travelers: results from the GeoSentinel Surveillance Network. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 44(12):1560–8. DOI: 10.1086/518173.
- Cleton N., Koopmans M., Reimerink J., Godeke G.-J., Reusken C. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. *J. Clin. Virol.* 2012; 55(3):191–203. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.07.004.
- Cleton N.B., Godeke G.-J., Reimerink J., Beersma M.F., van Doorn H.R., Franco L., Goeijenbier M., Jiménez-Clavero M.A., Johnson B.W., Niedrig M., Papa A., Sambri V., Tami A., Velasco-Salas Z.I., Koopmans M.P., Reusken C.B. Spot the difference: development of a syndrome based protein microarray for specific serological detection of multiple flavivirus infections in travelers. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(3):e0003580. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003580.
- Sips G.J., Wilschut J., Smit J.M. Neuroinvasive flavivirus infections. *Rev. Med. Virol.* 2012; 22(2):69–87. DOI: 10.1002/rmv.712.
- [On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2021. State report]. (Cited 21 Apr 2023). [Internet]. Available from: <https://www.rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/594/sqyww14tg5arqff6xv15dss017vuuank/Gosudarstvennyy-doklad.-O-sostoyanii-sanitarno-epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-Rossiyskoy-Federatsii-v-2021-godu.pdf>.
- Darwish N., Alias Y., Khor S. An introduction to dengue-disease diagnostics. *Trends in Analytical Chemistry*. 2015; 67:45–55. DOI: 10.1016/j.trac.2015.01.005.
- 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. Methods*. 2016; 236:231–6. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.08.003.
- Guzmán M.G., Kourí G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int. J. Infect. Dis.* 2004; 8(2):69–80. DOI: 10.1016/j.ijid.2003.03.003.
- Holbrook M.R., Shope R.E., Barrett A.D.T. Use of recombinant E protein domain III-based enzyme-linked immunosorbent assays for differentiation of tick-borne encephalitis serocomplex flaviviruses from mosquito-borne flaviviruses. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(9):4101–10. DOI: 10.1128/JCM.42.9.4101-4110.2004.
- Ternovoi V.A., Plyasunova I.V., Sementsova A.O., Kartashov M.Yu., Shvalov A.N., Chaurov E.V., Eremeeva L.I., Protopyova E.V., Chub E.V., Bayandin R.B., P'yankov O.V., Loktev V.B., Agafonov A.P., Maksyutov R.A. [Identification of dengue infection markers in patients after visiting dengue endemic countries]. *Молекулярная Генетика, Микробиология и Вирусология [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2019; 37(3):140–8. DOI: 10.17116/molgen201937031140.
- Niedrig M., Vaisviliene D., Teichmann A., Klockmann U., Biel S.S. Comparison of six different commercial IgG-ELISA kits for the detection of TBEV-antibodies. *J. Clin. Virol.* 2001; 20(3):179–82. DOI: 10.1016/s1386-6532(00)00178-5.
- Weissbach F.H., Hirsch H.H. Comparison of two commercial tick-borne encephalitis virus igg enzyme-linked immunosorbent assays. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015; 22(7):754–60. DOI: 10.1128/CVI.00096-15.
- Ackermann-Gäumann R., Tritten M.L., Hassan M., Lienhard R. Comparison of three commercial IgG and IgM ELISA kits for the detection of tick-borne encephalitis virus antibodies. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018; 9(4):956–62. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.03.031.
- Baryshnikova V.S., Turchenko Yu.V., Shishova A.A., Klimentov A.S., Tuchynskaya K.K., Karganova G.G. [Recombinant

glycoprotein E of tick-borne encephalitis virus for developing a differentiating test system]. *Biotekhnologiya [Biotechnology]*. 2022; 38(6):72–83. DOI: 10.56304/S0234275822060023.

15. Heinz F.X., Stiasny K. Flaviviruses and their antigenic structure. *J. Clin. Virol.* 2012; 55(4):289–95. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.08.024.

16. Pulkkinen L.I.A., Barrass S.V., Domanska A., Överby A.K., Anastasina M., Butcher S.J. Molecular organisation of tick-borne encephalitis virus. *Viruses*. 2022; 14(4):792. DOI: 10.3390/v14040792.

17. Inagaki E., Sakai M., Hirano M., Muto M., Kobayashi S., Kariwa H., Yoshii K. Development of a serodiagnostic multi-species ELISA against tick-borne encephalitis virus using subviral particles. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016; 7(5):723–9. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2016.03.002.

18. Ludolfs D., Reinholz M., Schmitz H. Highly specific detection of antibodies to tick-borne encephalitis (TBE) virus in humans using a domadewsin III antigen and a sensitive immune complex (IC) ELISA. *J. Clin. Virol.* 2009; 45(2):125–8. DOI: 10.1016/j.jcv.2009.03.016.

19. Sanina N., Chopenko N., Mazeika A., Davydova L., Leonova G., Stenkova A., Uversky V.N., Kostetsky E. Immunogenicity and protective activity of a chimeric protein based on the domain III of the tick-borne encephalitis virus E protein and the OmpF porin of *Yersinia pseudotuberculosis* incorporated into the TI-complex. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(10):2988. DOI: 10.3390/ijms19102988.

20. Jarmer J., Zlatkovic J., Tsouchnikas G., Vratskikh O., Strauß J., Aberle J.H., Chmelik V., Kundi M., Stiasny K., Heinz F.X. Variation of the specificity of the human antibody responses after tick-borne encephalitis virus infection and vaccination. *J. Virol.* 2014; 88(23):13845–57. DOI: 10.1128/JVI.02086-14.

21. Krivosheina E.I., Kartashov M.Yu., Naidenova E.V., Ushkalenko N.D., Pyankov S.A., Ternovoi V.A., Loktev V.B. [Development of a method for detection of specific antibodies to E protein of yellow fever virus (Flaviviridae: *Flavivirus*) by enzyme immunoassay]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2022; 67(4):341–50. DOI: 10.36233/0507-4088-123.

22. Maniatis T., Frisch E.E., Sambrook J. [Molecular Cloning. A Laboratory Manual]. Moscow: “Mir” Publ.; 1984. 479 p.

23. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.

24. Poltavchenko A., Zaitsev B., Ersh A., Korneev D., Taranov O., Filatov P., Nechitaylo O. 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.

25. Kungurtsev K.S., Gunger A.K., Filatov P.V. [Program for instrumental recording of the results of dot-immunoassay “DOTREADER 2000”. The computer program]. RF Certificate No. 2020611545, publ. April 02, 2020. Bull. No. 2.

26. Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Filatov P.V., Bayandin R.B., Ushkalenko N.D. [Development of the method for simultaneous detection of serological markers of dengue fever]. *Infektsionnye Bolezni: Novosti, Mneniya, Obuchenie [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]*. 2023; 12(1):75–83. DOI: 10.33029/2305-3496-2023-12-1-75-83.

27. Lindblom P., Wilhelmsson P., Fryland L., Matussek A., Haglund M., Sjöwall J., Vene S., Nyman D., Forsberg P., Lindgren P.-E. Factors determining immunological response to vaccination against tick-borne encephalitis virus in older individuals. *PLoS One*. 2014; 9(6):e100860. DOI: 10.1371/journal.pone.0100860.

28. Kuno G. Serodiagnosis of flaviviral infections and vaccinations in humans. *Adv. Virus Res.* 2003; 61:3–65. DOI: 10.1016/s0065-3527(03)61001-8.

Authors:

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

Об авторах:

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