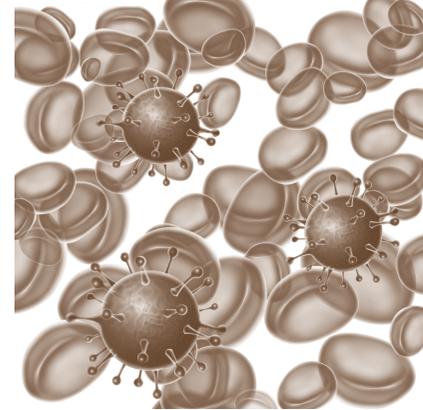


Разработка метода одновременного выявления серологических маркеров лихорадки денге



Полтавченко А.Г.,
Ерш А.В.,
Филатов П.В.,
Баяндин Р.Б.,
Ушкаленко Н.Д.

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

Цель исследования – разработка метода одновременного выявления антигена NS1, антител иммуноглобулинов класса М (IgM) и G (IgG) к возбудителю лихорадки денге.

Материал и методы. Выявление специфических маркеров лихорадки денге в образцах коммерческих верификационных панелей проводили методами с визуальным учетом результата (дот-иммуноанализ, иммунохроматографические тесты) и разработанным методом.

Результаты и обсуждение. Разработан способ одновременного обнаружения специфических маркеров лихорадки денге на основе метода дот-иммуноанализа на плоских белковых матрицах с дискретно иммобилизованными реагентами захвата с использованием конъюгатов детекторных белков с наночастицами коллоидного золота, двухкомпонентной системы проявления (раствор нитрата серебра, смесь метола и лимонной кислоты) и усилением оптического сигнала щелочным раствором тиомочевины. Метод позволяет одновременно выявлять белок NS1 вируса денге и/или специфические IgM и IgG в образцах сыворотки (плазмы) крови у пациентов на всех стадиях заболевания. Анализ проводится в течение 62 мин при температуре 20–30 °С и обеспечен встроенными контролями.

Заключение. Созданный на основе этого метода диагностический набор может служить инструментом как для скрининга, так и для индивидуального диагностического тестирования. Оценка достоверности различий результатов определения положительных и отрицательных образцов экспериментальным набором и коммерческими тестами сравнения показала, что расчетные величины χ^2 составляли 0,705–0,047, а это не позволяет опровергнуть нулевую гипотезу об отсутствии различий между сравниваемыми тест-системами. Метод не требует энергообеспечения, дополнительного оборудования и высокой квалификации исполнителя, поэтому анализы можно проводить вне специально оборудованных лабораторий.

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

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

Вклад авторов. Концептуализация, методология, написание текста, администрирование проекта – Полтавченко А.Г.; методология, исследование, валидация – Ерш А.В.; исследование, формальный анализ, редактирование – Филатов П.В.; ресурсы, методология, исследование – Баяндин Р.Б.; ресурсы, методология, исследование, редактирование, обработка и хранение данных – Ушкаленко Н.Д.

Для цитирования: 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. Т. 12, № 1. С. 75–83. DOI: <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2023-12-1-75-83>

Статья поступила в редакцию 13.10.2022. Принята в печать 26.12.2022.

Ключевые слова: лихорадка денге; серологические маркеры; одновременное выявление; мультиплексный дот-иммуноанализ; белковые матрицы; коллоидное золото

Method for simultaneous detection of serological dengue fever markers

Poltavchenko A.G., Ersh A.V.,
Filatov P.V., Bayandin R.B.,
Ushkalenko N.D.

State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, Federal Inspection Agency for Consumer and Human Welfare Protection, 630559, Kol'tsovo, Russian Federation

The aim of the work was to develop and test a method for the simultaneous detection of dengue fever markers (virus-specific IgM, IgG antibodies and NS1 antigen) in blood samples.

Material and methods. Detection of specific markers of dengue fever in samples of commercial verification panels was performed by dot-immunoassay, immune chromatography commercial test and the developed method.

Results and discussion. A method of dot-immunoassay on flat protein array was developed. The method included two components to obtain the signal: Gold nanoparticle–protein conjugate and a two-component development system (silver nitrate solution and a mixture of metol and citric acid) with enhancement of optical signal with an thiourea alkaline solution. This technique simultaneously detects the NS1 protein of dengue virus and specific IgM and IgG in blood samples. The analysis takes for 62 minutes at a temperature of 20–30 °C. An experimental kit was created based on the method.

Conclusion. The developed kit can be used for individual analysis and for mass screening of clinical samples. Evaluation of the method on a samples of verification panels showed that the results were consistent with commercial tests, χ^2 0.705–0.047. The method can be used for analysis of clinical samples, both in the laboratory and out of it.

Funding. The study was carried out as part of the fulfilment of the state assignment of the Federal Service for the Protection of Consumer Rights and Human Welfare.

Conflict of interest. The authors confirm that there is no conflict of financial/non-financial interests related to the writing of the article.

Contribution. Conceptualization, methodology, writing, project administration – Poltavchenko A.G.; methodology, investigation, validation – Ersh A.V.; investigation, formal analysis, editing, data curation – Filatov P.V.; resources, methodology, investigation – Bayandin R.B.; resources, methodology, investigation, editing – Ushkalenko N.D.

For citation: Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Filatov P.V., Bayandin R.B., Ushkalenko N.D. Method development for simultaneous detection of serological dengue fever markers. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie* [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]. 2023; 12 (1): 75–83. DOI: <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2023-12-1-75-83> (in Russian)

Received 13.10.2022. **Accepted** 26.12.2022.

Keywords:
dengue fever;
serological markers,
simultaneous
detection,
multiplex dot
immunoassay,
protein matrices,
colloidal gold

Лихорадка денге (ЛД) – острая зооантропонозная арбовирусная инфекционная болезнь с трансмиссивным механизмом передачи возбудителя, которая распространена в тропическом и субтропическом поясах земного шара. Возбудитель – вирус денге (ВД) из семейства *Togaviridae* рода *Flavivirus*, передается преимущественно комарами рода *Aedes* [1]. Заболевание эндемично более чем в 125 странах мира, главным образом в Азии, Америке и Африке. По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно регистрируют от 100 до 400 млн случаев заражения ЛД, а риску заражения подвергаются от 2,5 до 3,9 млрд человек в 128 странах мира [2]. Большинство случаев ЛД протекает бессимптомно или в форме легкого лихорадочного заболевания с неспецифическими гриппоподобными симптомами, однако нередко может развиваться тяжелая лихорадка, иногда со смертельным исходом. Тяжелые формы ЛД являются ведущей причиной госпитализации и смерти детей, нанося большой экономический и социальный ущерб в эндемичных регионах [3].

В последние десятилетия ареал распространения ВД значительно расширился вследствие климатических изменений, увеличения миграционных процессов и расширения международной торговли. В связи с этим ЛД включена в перечень болезней, способных вызвать чрезвычайные ситуации международного значения [4]. Из эндемичных районов ЛД может распространяться в другие регионы мира, например в результате ее завоза путешественниками [5, 6].

По данным Роспотребнадзора, имеется тенденция к росту общего количества завозных случаев этого заболева-

ния на территории РФ. За 2019–2021 гг. зарегистрированы 545 случаев ЛД в 49 субъектах РФ, большинство из которых завезены из Таиланда [7]. Несколько видов комаров – переносчиков арбовирусов встречаются и в регионах Черноморского побережья Кавказа [8]. Несмотря на то что на большей части территории РФ климатические условия препятствуют распространению ЛД, наличие комаров-переносчиков наряду со значительным числом инфицированных граждан, прибывающих из-за рубежа, может способствовать формированию местных локальных очагов тропических лихорадок в южных регионах РФ [8].

Геном ВД представляет собой одноцепочечную молекулу рибонуклеиновой кислоты (РНК) положительной полярности, окруженную икосаэдрическим нуклеокапсидом. Полная величина генома составляет около 11 000 нуклеотидов, которые кодируют полипептидную цепь длиной 3,4 тыс. аминокислотных остатков. Геном вируса кодирует 3 структурных (капсидный белок С, мембранный белок М, поверхностный белок оболочки Е) и 7 неструктурных белков (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B и NS5) [9]. Структурные белки определяют серотипы вирусов (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) и обеспечивают прикрепление и проникновение вируса в клетки-мишени. Неструктурные белки NS1–NS5 и вирусная РНК-полимераза участвуют в репликации вируса [10].

Обычно заболевание протекает без патогномичных симптомов, и для проведения дифференциальной диагностики необходимы лабораторные исследования [4, 11]. Существует несколько типов диагностических тестов. Наи-

более надежные результаты при высокой степени чувствительности и специфичности теста, позволяющие дифференцировать ЛД от других арбовирусных инфекций, может обеспечить полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), однако с ее помощью можно обнаружить вирус только на ранней стадии инфекционного процесса (5–7 дней с начала заболевания) [12, 13].

При диагностике ЛД используют иммунохимические методы выявления в сыворотке крови антител IgM и IgG, а также антигена NS1. Поскольку эти маркеры в течение заболевания сменяют друг друга (NS1 и IgM характерны для ранней стадии, а IgG для поздней стадии заболевания, повторной или ранее перенесенной инфекции), такой подход позволяет диагностировать ЛД на всех этапах инфекционного процесса. Серологические методы проще в выполнении, менее затратны и могут проводиться в условиях недостаточно развитой лабораторной инфраструктуры и квалифицированных медицинских кадров, что важно для наиболее уязвимых слаборазвитых стран эндемичных регионов [11]. В России зарегистрированы несколько зарубежных тест-систем для иммуноферментного (ИФА), иммунохроматографического (ИХА) и дот-иммуноанализа, позволяющих выявлять маркеры ЛД. Сертифицированных отечественных тестов для иммунодиагностики ЛД нет [14].

Цель исследования – разработка метода одновременного выявления антигена NS1, антител IgM и IgG к возбудителю ЛД.

В статье описаны основные этапы создания и лабораторных испытаний экспериментального набора, позволяющего проводить серологическую диагностику на всех стадиях заболевания в условиях недостаточно развитой лабораторной инфраструктуры.

Материал и методы

Материал и реактивы. В работе использовали азид натрия, казеин, бычий сывороточный альбумин (БСА), лимонную кислоту, нитрат серебра, сахарозу, твин-20 и тетрахлорзолотую кислоту (Sigma-Aldrich, США); химические реактивы отечественного производства с квалификацией не ниже «чистого для анализа». Для изготовления подложки иммуночипов применяли синтетическую бумагу на основе поливинилхлорида Pentaprint марки PR-M480/09-07/8101-2D8 («Форда», Новосибирск, Россия).

Иммунореагенты. Моноклональные антитела мыши к белку NS1 ВД: а/NS101, а/NS103, а/NS104 и а/NS105, рекомбинантный антиген ВД NS1 (NS1), моноклональные антитела к IgM человека (а/IgM₁) и моноклональные антитела к IgG человека (а/IgG₁) фирмы Fapen (Китай); Anti-Human IgM antibody produced in rabbit (а/IgM₂) и Monoclonal Anti-Human IgG₂ (Clone 6001) antibody produced in mouse (а/IgG₂) фирмы Sigma-Aldrich (США); IgG из сыворотки человека (IgG) ЗАО «ИмТек» (Россия).

Рекомбинантные белки ВД типов I–IV (AgD1, AgD2, AgD3, AgD4) получали с использованием иммунодоминантной области 3-го домена гликопротеина E. ПЦР-фрагменты гена белка оболочки 3-го домена каждого из 4 серотипов

Таблица 1. Праймеры, используемые для получения ПЦР-фрагментов длиной 303 п.о.

Нуклеотидная последовательность	Обозначение праймера
AAAGGGATGTCATATGTGATGTG	FD1
AAGGGGATGAGCTATGCAATGTG	FD3
AAAGGAATGTCATACTCTATGTG	FD2
AAGGGAATGTCATACACGATGTG	FD4
TTATTTCTTAAACCAGCTTAGTTTC	RD1
TTACTTCTTGACCAGTTGATTTTC	RD3
TTACTTCTTGAACCAATTGAGTTTC	RD2
TTATTTCTTGAACCAATGGAGTGT	RD4

(табл. 1) были клонированы в экспрессирующий вектор pET100 TOPO согласно протоколу производителя (Thermo Fisher Scientific, США).

Трансформацию плазмиды и экспрессию рекомбинантных белков проводили с использованием штамма *E. coli* BL21 (DE3) согласно протоколу производителя (Thermo Fisher Scientific, США). Размер гликопротеина E для генотипов ВД 1, 2, 4 составил 1485 п.н. (495 аминокислотных остатков), для генотипа 3 – 1479 п.н. (493 аминокислотных остатка). Все E-белки содержали на N-конце полигистидиновый тракт. Рекомбинантные белки очищали с помощью аффинной хроматографии с использованием Ni-NTA смолы (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрация рекомбинантных белков ED III была не ниже 1,5 мг/мл.

Конъюгаты на основе коллоидного золота. Получение золей золота (15–20 нм) восстановлением тетрахлорзолотой кислоты цитратом натрия, определение дозы нагрузки золя иммунореагентами в коагуляционном тесте и процедуру нагрузки проводили, как описано ранее [15]. Золи дополнительно стабилизировали добавлением БСА до 1%. Иммунозоли очищали центрифугированием при 15 000 g в течение 30 мин при 4 °C. Таким образом были получены: конъюгат, состоящий из равных концентраций золей, связанных с антигенами ВД I–IV типов (Au-SAgD1-4); конъюгаты с антителами к белку NS1 (Au-a/NS101, Au-a/NS103, Au-a/NS104 и Au-a/NS105) и с антителами к IgG человека (Au-a/IgG₁ и Au-a/IgG₂).

Исследуемые образцы. В качестве положительных по маркерам ЛД верификационных образцов (панель ЛД) использовали образцы коммерческой панели SeroDetect Dengue Fever Verification Panel (9 X 0.5 mL) (KZMC028) производства ZeptoMetrix Corporation (США), дополненные отдельными положительными образцами: Dengue IgG Positive Plasma (DIgG) и Dengue IgM Positive Plasma (DIgM) производства фирмы SeroDetect (США).

В качестве гетерогенных контролей использовали образцы: Yellow Fever IgG Positive Serum (YFIgG) и Yellow Fever IgM Positive Serum (YFIgM), положительные по маркерам желтой лихорадки; Zika IgG Positive Plasma (ZIGG) и Zika IgM Positive Plasma (ZIGM), положительные по маркерам лихорадки Зика, производства фирмы SeroDetect (США); панель из 20 контрольных образцов сыворотки крови, содержащих антитела к антигенам вируса клещевого энцефалита (панель КЭ) и панель из 20 образцов сывороток крови человека, содержащих антитела к цитомегало-

Таблица 2. Последовательность этапов анализа

Ряд	Содержимое ячеек	Объем, мкл
1	Раствор для разведения образца ФСБ-Т с 0,02% казеина, pH 8,0	300
2	Отмывочный раствор ФСБ-Т	350
3	Отмывочный раствор ФСБ-Т	350
4	Рабочее разведение конъюгата Au-a/IgG ₂ в ФСБ-Т	300
5	Отмывочный раствор ФСБ-Т	350
6	Отмывочный раствор ФСБ-Т	350
7	Вода очищенная	400
8	Вода очищенная	400
9	Таблетка сухого компонента проявителя	4 мг
10	Вода очищенная	400
11	Стабилизатор окраски – 1% тиомочевины и 1% NaOH в воде очищенной	300
12	Вода очищенная	400

Примечание. ФСБ-Т – 0,02 М натрий-фосфатный буферный раствор с 0,8% NaCl; 0,1% твин-20 и 0,1% азида натрия, pH 7,2. В экспериментах по подбору реагентов 4-й ряд содержал необходимые конъюгаты.

вирусу (панель ЦМВ). Последние панели предоставлены в закодированном виде ООО «ИМБИАН-ЛАБ» (Россия).

Экспериментальный набор для дот-иммуноанализа маркеров ЛД рассчитан на 20 анализов. Включает 4 блока белковых матриц, 4 аналитические ванны, флаконы с водой очищенной и жидкий компонент проявляющей системы (0,4% раствор нитрата серебра в воде очищенной). Вид основных компонентов комплекта приведен в предыдущей публикации [16].

На подложки белковых матриц, изготовленных из синтетической бумаги в виде блоков (гребней) по 5 штук в блоке, наносили капли (2, 5 мкл) реагентов захвата, разведенных в 0,005 М боратном буферном растворе (pH 6,0) до концентрации 10 мкг/мл. Матрицы сушили при температуре 4 °С в течение 12 ч и в течение 2 ч при 37 °С, а затем блокировали 1 ч в 0,2% растворе казеина, сушили, упаковывали в полиэтиленовые пакеты и хранили при 4 °С. В экспериментах по подбору реагентов матрицы изготавливали сходным образом. Полипропиленовая аналитическая ванна рассчитана на 5 анализов и объединяет 12 рядов по 5 ячеек в каждом. Ванна заполнена рабочими растворами, примеры которых приведены в табл. 2, и термически герметизирована упаковочным материалом.

Дот-иммуноанализ проводили при температуре 20–25 °С, для чего вскрывали покрытие перфоратором и вносили в 1-й ряд ячеек по 15 мкл образца, погружали в них матрицы и инкубировали в течение 25 мин, а затем последовательно перемещали матрицы по следующим рядам ванны с периодами инкубации в отмывочных растворах и воде по 0,5 мин; в конъюгате (4-й ряд) – 20 мин, проявителе (9-й ряд) – 7 мин и стабилизаторе (11-й ряд) – 1 мин. Отмывание очищенной водой необходимо для удаления остатков буфера перед проявлением. Для приготовления проявителя на начальном этапе анализа в ячейки 9-го ряда добавляли по 200 мкл воды, а перед погружением матрицы – по 200 мкл жидкого компонента физического проявителя. После окончания анализа матрицы высушивали и визуально оценивали результаты по наличию или отсутствию темной окраски в местах нанесения реагентов захвата. Положительным результатом считали отчетливо различимое темное пятно в месте нанесения соответствующего реагента.

Тесты сравнения. В сравнительных экспериментах определяли специфические маркеры методом ИХА с примене-

нием набора Dengue NS1Ag + Ab Combo system, Standard Diagnostics Inc. (Корея) и методом дот-анализа с использованием набора ImmunoComb® II Dengue IgM/IgG BiSpot, Orgenics Ltd. (Израиль).

Статистическая обработка. Все эксперименты выполняли в трех повторах, результаты в которых качественно совпадали. В ряде случаев наблюдали небольшие изменения интенсивности окраски пятен в отдельных повторах, которые не влияли на качественную оценку результатов. Диагностические чувствительность и специфичность теста оценивали по ГОСТ Р 53022.3-2008. Чувствительность оценивали как долю (%) истинно положительно классифицированных образцов, деленных на сумму истинно положительно и ложноотрицательно классифицированных образцов. Специфичность – как долю (%) истинно отрицательно классифицированных образцов, деленных на сумму истинно отрицательно и ложноположительно классифицированных образцов. Достоверность различий результатов, полученных с применением экспериментального теста и тестов сравнения, оценивали путем расчета критерия χ^2 по методике Макнемара с использованием онлайн-ресурса <https://medstatistic.ru/index.php>. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Задача исследования – подбор оптимальных условий одновременного выявления маркеров ЛД (антигена NS1, а также антител типов IgM и IgG) в сыворотке крови пациентов без дифференциации типа ВД. Это возможно за счет выделения маркеров из образца на соответствующих реагентах захвата, дискретно иммобилизованных на подложке матрицы, с последующим обнаружением выделенных маркеров реагентами детекции, связанными с коллоидным золотом, способным каталитически восстанавливать на своих частицах серебро из растворов так называемого физического проявителя. В результате выделенные из образца маркеры проявляются в виде пятен, имеющих темную окраску, которая может быть дополнительно контрастирована и стабилизирована обработкой матрицы в щелочном растворе тиомочевины за счет перевода серебра в его сульфид.

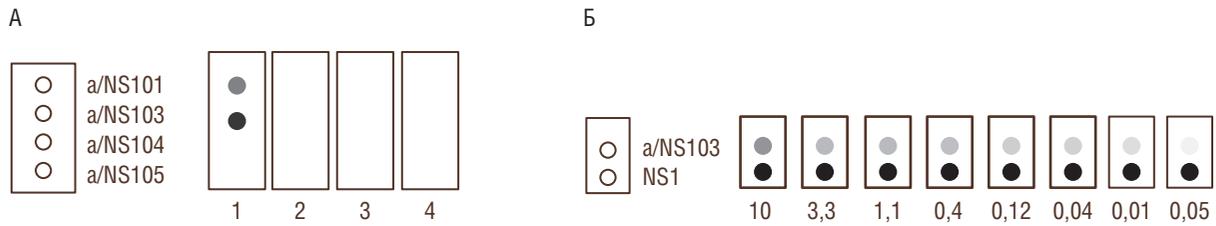


Рис. 1. Определение чувствительности обнаружения белка NS1

А – подбор компонентов для выявления NS1 (слева схема нанесения иммобилизационных антител на массив, справа вид массивов после обработки конъюгатами: 1 – Au-анти/NS101, 2 – Au-анти/NS103, 3 – Au-анти/NS104, 4 – Au-анти/NS105); Б – результаты определения чувствительности детекции белка NS1: слева схема нанесения реагентов захвата на матрицу, справа вид матриц после анализа образцов с разной концентрацией рекомбинантного белка NS1 (концентрации, мкг/мл, указаны под соответствующими матрицами). Жирными рамками выделены матрицы, инкубированные с максимальным разведением белка, позволяющим надежно фиксировать положительный результат, – отчетливо различимое темное пятно в верхней точке.

Фактором, определяющим успешность такой системы, является подбор специфичных иммунореагентов и эффективной схемы их применения. Если схема обнаружения белка NS1 с помощью наиболее подходящей пары моноклональных антител не вызывает сомнений, то алгоритм одновременного дифференциального выявления IgM и IgG требует выбора рационального подхода.

Известен подход (например, он используется в наборе ImmunoComb® II Dengue IgM&IgG BiSpot), в котором для одновременного определения IgM и IgG к ЛД на пластмассовую подложку нанесены антитела к IgM и IgG человека, а выявление специфических антител осуществляется за счет связывания меченых антигенов ВД. В период острой инфекции преобладают IgM-антитела к возбудителю. В то же время специфические IgG составляют ничтожную долю от суммарных IgG, приобретенных ранее в результате перенесенных заболеваний или вакцинации, и для их обнаружения необходимы длительные инкубации и дополнительные каскады усиления оптического сигнала, что значительно увеличивает время анализа и негативно влияет на его стоимость. Другой подход, использующий в качестве реагента захвата антигены возбудителя, не предоставляет возможности дифференциации IgM и IgG в одном анализе.

Рациональным вариантом одновременного дифференциального определения специфических IgG и IgM может быть схема, при которой для выделения IgM используются а/IgM-антитела и для детекции – меченые антигены ВД, а для

выделения IgG применяются антигены ВД и для детекции – меченые антитела к IgG человека. Таким образом, белковая матрица для дифференциального выявления маркеров ЛД должна содержать следующие реагенты захвата: суммарный антиген ВД всех типов (выявление IgG), антитела к иммуноглобулинам класса М человека (выявление IgM) и антитела к белку NS1 (выявление NS1 ВД), а также контроль работоспособности теста – IgG человека и белок NS1 ВД.

Подбор реагентов для обнаружения NS1. Для выбора пары антител, наиболее эффективно выявляющих белок NS1 подложки с иммобилизованными моноклональными антителами а/NS101, а/NS103, а/NS104 и а/NS105 (в один ряд сверху вниз), инкубировали 25 мин в разведении 1/60 в РБРС препарата рекомбинантного белка NS1; затем обрабатывали иммунозолями Au-а/NS101, Au-а/NS103, Au-а/NS104, Au-а/NS105 в течение 30 мин и проявляли. Результаты оценки приведены на рис. 1А. Видно, что на подложке белок NS1 связывается с антителами а/NS101, а/NS103 и выявляется только антителами а/NS101, связанными с коллоидным золотом. Наиболее интенсивный оптический сигнал на подложке формируется при сочетании антител а/NS103 на подложке и а/NS101 в конъюгате.

Чувствительность обнаружения белка NS1 определяли на белковых матрицах с антителами а/NS103, иммобилизованными в верхней точке. В нижнюю часть матрицы наносили рекомбинантный белок NS1 в концентрации 20 мкг/мл отдельной каплей объемом 3 мкл. Эту точку использовали

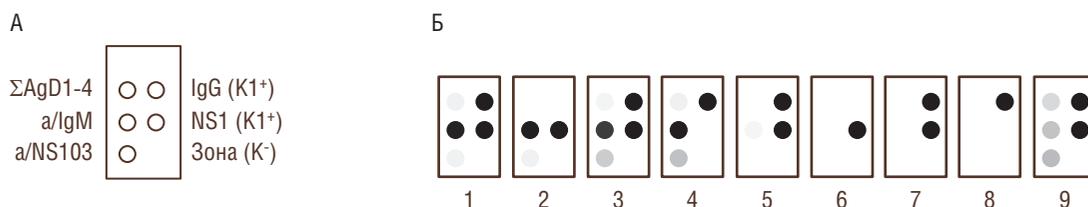


Рис. 2. Оценка прямого взаимодействия иммунореагентов на подложке и в конъюгате

А – схема нанесения реагентов захвата на белковой матрице (1–4 – а/IgM = а/IgM₁; 5–9 – а/IgM = а/IgM₂); Б – вид белковых матриц после обработки конъюгатами: 1 – Au-а/IgG₁ + SAu-AgD1-4 + Au-а/NS101; 2 – Au- AgD1-4 + Au-а/NS101; 3 – Au-а/IgG₁ + Au-а/NS101; 4 – Au-а/IgG₁ + SAu-AgD1-4; 5 – Au-а/IgG₂ + SAu-AgD1-4 + Au-а/NS101; 6 – SAu-AgD1-4 + Au-а/NS101; 7 – Au-а/IgG₂ + Au-а/NS101; 8 – Au-а/IgG₂ + SAu-AgD1-4; 9 – Au-а/IgG₂ + SAu-AgD1-4 + Au-а/NS101 после обработки матрицы сывороткой, содержащей все маркеры ЛД. Расшифровка аббревиатур приведена в разделе «Материал и методы». SAuD1-4 – смесь равных концентраций антигенов ВД типов 1–4.

Таблица 3. Результаты сравнительного исследования образцов верификационных панелей с использованием экспериментального набора «Денге-спектр» и коммерческих экспресс-тестов

Панель	Маркер	Экспериментальный набор «Денге-спектр» (ГНЦ ВБ «Вектор», Россия)	Dengue NS1Ag + Ab Combo system (Standard Diagnostics, Inc, Корея)	ImmunoComb® II Dengue IgM/IgG Bispot (Orgenics, Израиль)*
Панель ЛД	NS1	+	7	6
		-	4	5
	IgM	+	10	8
		-	1	3
	IgG	+	9	9
		-	2	2
Всего образцов	+	11	11	
	-	0	0	
Гетерогенные контроли	YFIgG,	+	0	0
	YFIgM	-	2	2
	ZIgG, ZIgM	+	0	0
		-	2	2
	Панель КЭ	+	2	3
		-	18	17
	Панель ЦМВ	+	1	1
		-	19	19
	Всего образцов	+	3	4
		-	41	40
			37	

Примечание. * – тест-система не предназначена для определения NS1; полужирным шрифтом выделены данные, использованные при расчетах критерия χ^2 .

в качестве положительного контроля. Матрицы инкубировали в течение 25 мин в серии 3-кратных разведений белка NS1, начиная с концентрации 10 мкг/мл, в растворе для разведения образца [фактические концентрации NS1 (мкг/мл) в разведениях приведены на рис. 1Б под соответствующими матрицами]. После промывки матрицы обрабатывали в течение 20 мин конъюгатом Au-анти/NS101, проявляли, высушивали и визуально учитывали результат как концентрацию белка в максимальном разведении, обеспечивающем ясно различимое темное пятно в верхней точке. Результаты, представленные на рис. 1Б, свидетельствуют о том, что в таких условиях предел надежного определения рекомбинантного аналога белка NS1 составляет 40 нг/мл.

Подбор реагентов для обнаружения IgG и IgM. Для подбора реагентов, наиболее эффективно выявляющих IgM и IgG, использовали белковые массивы с реагентами захвата: смесь антигенов ВД типов 1–4 (SAgD1–4), антитела к IgM человека (а/IgM₁ или а/IgM₂) и к белку NS1 (а/NS103), а также положительные контроли – IgG человека (К₁⁺) и белок NS1 (К₂⁺), иммобилизованные в соответствии со схемой, приведенной на рис. 2А. Зона (К⁻), свободная от белков захвата, служила для оценки фоновых явлений. Матрицы без инкубации с образцом обрабатывали разными смесями конъюгатов и отмечали неспецифические оптические сигналы, вызванные прямым взаимодействием иммунореагентов на подложке и в конъюгате. Результаты приведены на рис. 2Б.

Использованные в качестве реагента захвата антитела а/IgM₁ генерируют отчетливые оптические сигналы при прямом взаимодействии со всеми используемыми конъюгатами (см. рис. 2Б, 1–4), а конъюгат Au-а/IgG₁ напрямую взаимодействует с антителами а/NS103 и антигеном SAg1–4 на подложке (см. рис. 2Б, 1, 3, 4). Использование в качестве

реагента захвата а/IgM₂ и реагента детекции в конъюгате а/IgG₂ устраняет перекрестные реакции (см. рис. 2Б, 5–8) и обеспечивает эффективное выявление всех маркеров ЛД в исследуемом образце (см. рис. 2Б, 9).

Таким образом, экспериментальный набор для выявления маркеров ЛД должен включать белковые матрицы с иммобилизованными реагентами захвата: суммарным антигеном ВД всех типов – AgD1–4, антителами к IgM человека – а/IgM₂, антителами к белку NS1 – а/NS103, а также двумя контролями работоспособности теста – IgG человека (К₁⁺) и белком NS1 ВД (К₂⁺). Нижний правый сегмент матрицы свободен от белков захвата и служит для контроля фоновых явлений (зона К⁻). Схема нанесения реагентов захвата на подложку матрицы приведена на рис. 3А. Используемый в наборе конъюгат представлен смесью равных концентраций иммунозолей: Au-SAg D1–4, Au-а/NS101 и Au-а/IgG₂.

Испытания экспериментального набора «Денге-спектр». Результаты оценки эксплуатационных характеристик набора с использованием панелей, описанных выше, приведены на рис. 3. Эксперименты выполнены в 3 повторах, результаты в которых качественно полностью совпадали.

Из данных рис. 3 следует, что набор «Денге-спектр» определяет все образцы панели ЛД, в том числе и те, что не выявляли положительных сигналов в наборах для определения IgG. Образцы № 2 и 7 содержат только белок NS1 в сочетании с IgM, что указывает на ранний период заболевания. Из 11 образцов панели 7 выявляли совместное присутствие маркеров NS1 и IgM, что повышает специфичность диагностики болезни денге [17]. 5 образцов этой панели содержали все 3 маркера ЛД. Таким образом, диагностическая чувствительность набора по панели ЛД составляет 100%. В гетерогенных панелях набор в 3 случаях дает слабый поло-

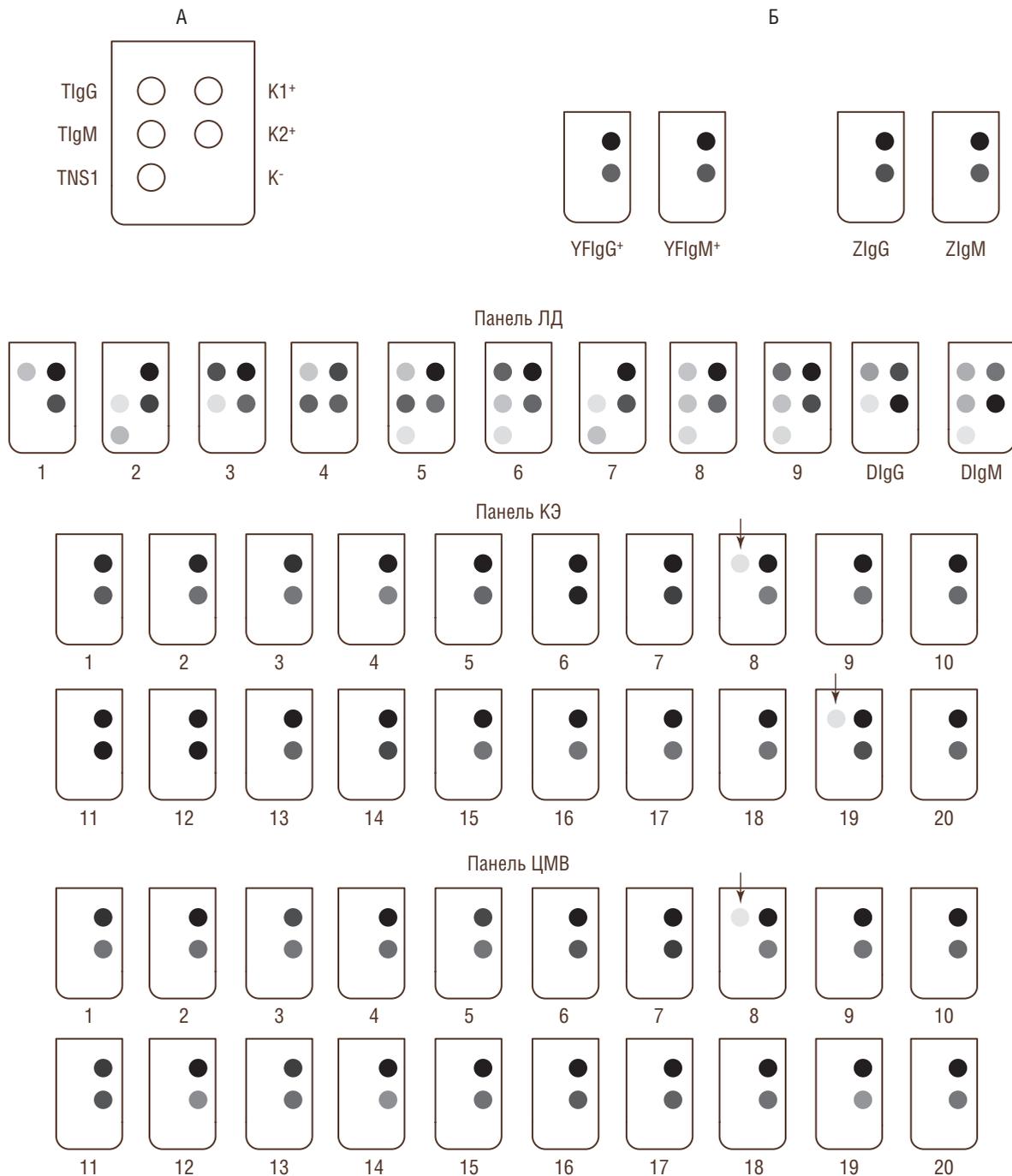


Рис. 3. Результаты дот-иммуноанализа верификационных панелей

А – схема размещения на подложке матрицы реагентов захвата: TlgG – зона тестирования IgG (SAgD1–4), TlgM – зона тестирования IgM (a/IgM₂), TNS1 – зона тестирования белка NS1 (a/NS1), K1⁺ – зона контроля выявления IgG (IgG человека), K2⁺ – зона контроля выявления NS1 (NS1), K⁻ – зона матрицы без иммунореагентов; Б – сканы белковых матриц из набора для выявления маркеров лихорадки денге после дот-анализа образцов верификационных панелей и образцов (стрелками обозначены маркеры, выявленные в гетерогенных контролях).

жительный сигнал в тестовой зоне определения IgG (панель КЭ – 2 и панель ЦМВ – 1), суммарно 3 (6,8%) из 44 гетерогенных сывороток. Следовательно, диагностическая специфичность набора по использованным панелям составляет 93,2%. Во всех случаях ложноположительные сигналы получены в зоне выявления IgG, что согласуется с данными литературы о меньшей специфичности тестов для определения IgG-антител к ВД по сравнению с выявлением IgM-антител [18].

Результаты параллельного исследования образцов верификационных панелей и образцов с использованием разработанного экспериментального набора и коммерческих экспресс-тестов приведены в табл. 3.

Из данных табл. 3 следует, что оценка разработанного экспериментального набора «Денге-спектр» в сравнении с коммерческими экспресс-тестами не выявила статистически значимых различий в результатах исследования

образцов верификационных панелей. Все наборы правильно квалифицируют образцы панели ЛД как положительные. При этом экспериментальный набор определяет IgM в большем количестве образцов (90,9%), чем коммерческие тесты (72,7 и 81,8% соответственно), вероятно, вследствие наличия в экспериментальном наборе дополнительного усиления оптического сигнала за счет золото-серебряного проявления, обеспечивающего в соответствии с ранее полученными данными большую чувствительность системы детекции по сравнению с системами с золотом без проявления или со щелочной фосфатазой [19]. Оценка достоверности различий результатов определения положительных и отрицательных образцов экспериментальным набором и коммерческими тестами сравнения показала, что расчетные величины χ^2 составляли 0,705–0,047. При степени свободы, равной 1, и α ошибки 0,05 (5%) критическое значение критерия χ^2 составляет 3,841. Фактические значения χ^2 меньше теоретического уровня, что не позволяет опровергнуть нулевую гипотезу об отсутствии различий между сравниваемыми тест-системами.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что экспериментальный набор «Денге-спектр» может быть успешно использован при диагностике ЛД на всех стадиях заболевания.

Заключение

Разработанный метод дот-иммуноанализа для одновременного определения маркеров ЛД в образцах сыворотки крови позволяет выявлять специфические антитела к ВД и/или антиген NS1 на всех стадиях заболевания. Анализ обеспечен встроенными контролями и проводится в течение 65 мин при температуре 20–25 °С. Созданный на основе этого метода диагностический набор может служить инструментом как для скрининга, так и для индивидуального диагностического тестирования. Сравнительные испытания набора на верификационных панелях показали совпадение с результатами анализа с использованием импортных коммерческих тестов. Метод не требует дополнительного оборудования и электропитания, поэтому анализы можно проводить вне оборудованных лабораторий.

Этика. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов исследования.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Российская Федерация:

Полтавченко Александр Георгиевич (Alexander G. Poltavchenko) – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник

E-mail: poltav@vector.nsc.ru

<https://orcid.org/0000-0003-2408-5611>

Ерш Анна Васильевна (Anna V. Ersh) – кандидат биологических наук, научный сотрудник

E-mail: ersh_av@vector.nsc.ru

<https://orcid.org/0000-0002-9220-1250>

Филатов Павел Владимирович (Pavel V. Filatov)* – кандидат биологических наук, научный сотрудник

E-mail: filatov_pv@vector.nsc.ru

<https://orcid.org/0000-0001-7763-3808>

Баяндин Роман Борисович (Roman V. Bayandin) – кандидат биологических наук, научный сотрудник

E-mail: bayandin_rb@vector.nsc.ru

<http://orcid.org/0000-0002-6460-0828>

Ушкаленко Никита Дмитриевич (Nikita D. Ushkalenko) – аспирант, младший научный сотрудник

E-mail: ushkalenko_nd@vector.nsc.ru

<https://orcid.org/0000-0002-2171-7444>

ЛИТЕРАТУРА

- Owino E. Aedes spp mosquitoes and emerging neglected diseases of Kenya // Int. J. Mosq. Res. 2018. Vol. 5. P. 1–11.
- Dengue and severe dengue. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> (date of access December 26, 2022).
- St John A.L., Gubler D.J. Dengue Viruses (Flaviviridae) // Encyclopedia of Virology. 4th ed. / eds D.H. Bamford, M. Zuckerman. Oxford : Academic Press, 2021. P. 218–231. ISBN 978-0-12-814516-6.
- World Health Assembly 58. Revision of the International Health Regulations. World Health Organization, 2005. URL: https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA58/WHA58_3-en.pdf (date of access December 26, 2022).
- Терновой В.А. и др. Выявление маркеров лихорадки денге у пациентов после посещения эндемичных по денге стран // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2019; Т. 37, № 3. С. 140. DOI: <https://doi.org/10.17116/molgen201937031140>
- Нечаев В.В. и др. Клинико-эпидемиологическая характеристика завозной тропической лихорадки денге // Журнал инфектологии. 2021. Т. 13, № 1. С. 78–85. DOI: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2021-13-1-78-85>
- О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 году: Государственный доклад. Москва : Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2022. 340 с. URL: https://rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=21796 (дата обращения: 26.12.2022)
- Ganushkina L.A. et al. Detection of Aedes aegypti, Aedes albopictus, and Aedes koreicus in the Area of Sochi, Russia // Vector Borne Zoonotic Dis. 2016. Vol. 16, N 1. P. 58–60. DOI: <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1761>
- Knipe D.M., Howley P. Fields Virology. 6th ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2013. 2664 p. ISBN 978-1-4698-3066-7.

* Автор для корреспонденции.

10. Kuhn R.J. et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion // *Cell*. 2002. Vol. 108, N 5. P. 717–725. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00660-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00660-8)
11. Darwish N., Alias Y., Khor S. An introduction to dengue-disease diagnostics // *Trends Anal. Chem.* 2015. Vol. 67. P. 45–55. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.01.005>
12. Hue K.D.T. et al. Validation of an internally controlled one-step real-time multiplex RT-PCR assay for the detection and quantitation of dengue virus RNA in plasma // *J. Virol. Methods*. 2011. Vol. 177, N 2. P. 168–173. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.08.002>
13. Tandel K. et al. Detection of dengue virus serotypes by single-tube multiplex RT-PCR and multiplex real-time PCR assay // *Med. J. Armed Forces India*. 2022. Vol. 78, N 3. P. 333–338. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2021.09.001>
14. Акиншина Ю.А. и др. Сравнительное применение экспериментальной ИФА-тест-системы НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского «ИФА-IGM-денге» (Россия) и фирмы EUROIMMUN ANTI-DENGUE VIRUS ELISA IGM (Германия) для серодиагностики лихорадки денге // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2017. Т. 22, № 1. С. 4–8. DOI: <https://doi.org/10.17816/EID40949>
15. Poltavchenko A.G. et al. The selection and optimization of the detection system for self-contained multiplexed dot-immunoassay // *J. Immunoassay Immunochem.* 2016. Vol. 37, N 5. P. 540–554. DOI: <https://doi.org/10.1080/15321819.2016.1174134>
16. Ushkalenko N. et al. Evaluation of Rapid dot-immunoassay for detection orthopoxviruses using laboratory-grown viruses and animal's clinical specimens // *Viruses*. 2022. Vol. 14, N 11. P. 2580. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14112580>
17. Zhang H. et al. NS1-based tests with diagnostic utility for confirming dengue infection: a meta-analysis // *Int. J. Infect. Dis.* 2014. Vol. 26. P. 57–66. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.02.002>
18. Weiskopf D. et al. Immunodominance changes as a function of the infecting dengue virus serotype and primary versus secondary infection // *J. Virol.* 2014. Vol. 88, N 19. P. 11 383–11 394. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01108-14>
19. Полтавченко А.Г. и др. Выбор системы детекции для мультиплексного dot-иммуноанализа антител // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016, Т. 61, № 4. С. 229–233. DOI: <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-4-229-233>

REFERENCES

1. Owino E. *Aedes* spp mosquitoes and emerging neglected diseases of Kenya. *Int J Mosq Res.* 2018; 5: 1–11.
2. Dengue and severe dengue. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> (date of access December 26, 2022).
3. St John A.L., Gubler D.J. *Dengue Viruses (Flaviviridae)*. In: D.H. Bamford, M. Zuckerman (eds). *Encyclopedia of Virology*. 4th ed. Oxford: Academic Press, 2021: 218–31. ISBN 978-0-12-814516-6.
4. World Health Assembly 58. Revision of the International Health Regulations. World Health Organization, 2005. URL: https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA58/WHA58_3-en.pdf (date of access December 26, 2022).
5. Ternovoi V.A., et al. Identification of dengue infection markers in patients after visiting to dengue endemic countries. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology, Virology]*. 2019; 37 (3): 140–8. DOI: <https://doi.org/10.17116/molgen201937031140> (in Russian)
6. Nechaev V.V., et al. Clinical-epidemiological characteristics delivery cases of tropic dengue fever. *Zhurnal infektologii [Journal of Infectology]*. 2021; 13 (1): 78–85. DOI: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2021-13-1-78-85> (in Russian)
7. On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2021: State report. Moscow: Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitel'ey i blagopoluchiya cheloveka, 2022: 340 p. URL: https://rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=21796 (date of access December 26, 2022). (in Russian)
8. Ganushkina L.A., et al. Detection of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Aedes koreicus* in the Area of Sochi, Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2016; 16 (1): 58–60. DOI: <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1761>
9. Knipe D.M., Howley P. *Fields Virology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013: 2664 p. ISBN 978-1-4698-3066-7.
10. Kuhn R.J., et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 2002; 108 (5): 717–25. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00660-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00660-8)
11. Darwish N., Alias Y., Khor S. An introduction to dengue-disease diagnostics. *Trends Anal Chem.* 2015; 67: 45–55. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.01.005>
12. Hue K.D.T., et al. Validation of an internally controlled one-step real-time multiplex RT-PCR assay for the detection and quantitation of dengue virus RNA in plasma. *J Virol Methods*. 2011; 177 (2): 168–73. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.08.002>
13. Tandel K., et al. Detection of dengue virus serotypes by single-tube multiplex RT-PCR and multiplex real-time PCR assay. *Med J Armed Forces India*. 2022; 78 (3): 333–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2021.09.001>
14. Акиншина Ю.А., et al. Comparison of the application of domestic «ELISA-IGM-DENGUE» kit, delivered in the D.I. Ivanovsky institute of virology (Moscow, Russian Federation) and «ANTI-DENGUE VIRUS ELISA IGM» KIT (EUROIMMUN, Germany) for the serodiagnosis of Dengue fever. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2017; 22 (1): 4–8. DOI: <https://doi.org/10.17816/EID40949> (in Russian)
15. Poltavchenko A.G., et al. The selection and optimization of the detection system for self-contained multiplexed dot-immunoassay. *J Immunoassay Immunochem.* 2016; 37 (5): 540–54. DOI: <https://doi.org/10.1080/15321819.2016.1174134>
16. Ushkalenko N., et al. Evaluation of Rapid dot-immunoassay for detection orthopoxviruses using laboratory-grown viruses and animal's clinical specimens. *Viruses*. 2022; 14 (11): 2580. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14112580>
17. Zhang H., et al. NS1-based tests with diagnostic utility for confirming dengue infection: a meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2014; 26: 57–66. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.02.002>
18. Weiskopf D., et al. Immunodominance changes as a function of the infecting dengue virus serotype and primary versus secondary infection. *J Virol.* 2014; 88 (19): 11 383–394. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01108-14>
19. Poltavchenko A.G., et al. The selection of system of detection for multiplex dot-immuneanalysis of antibodies. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika [Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2016; 61 (4): 229–33. DOI: <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-4-229-233> (in Russian)