https://doi.org/10.17116/molgen20234104131

Применение специфичных к белку A29L моноклональных антител a-A29L_MPoxV для диагностики оспы обезьян

© С.А. ПЬЯНКОВ, И.С. ШУЛЬГИНА, А.В. РЫБЕЛЬ, А.З. МАКСЮТОВ, В.Ю. ТЮРИН, И.А. ДРАЧКОВА, Т.В. ТРЕГУБЧАК, Т.В. БАУЭР, А.С. ОВЧИННИКОВА, Д.А. ОДНОШЕВСКИЙ, А.С. КАБАНОВ, С.А. БОДНЕВ, О.В. ПЬЯНКОВ, А.П. АГАФОНОВ

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

РЕЗЮМЕ

Введение. Распространение с 2022 г. заболевания, вызываемого вирусом оспы обезьян (ВОО), показало актуальность разработки мер противодействия. Развитие современных методов клинической лабораторной диагностики ВОО способствует этому. Иммуноферментный анализ (ИФА) является доступной и чувствительной платформой для разработки средств диагностики. Выявление антигенов ВОО тест-системами ИФА на основе моноклональных антител (МКА) перспективно благодаря оперативности анализа и наличию минимальных требований к пробоподготовке.

Материал и методы. Разработаны и депонированы два штамма-продуцента рекомбинантных белков на основе экспрессирующей системы *Escherichia coli*. Белок AgPOX для иммунизации мышей содержит уникальные антигенные последовательности ВОО. Белок Trx+A29 для отбора продуцента МКА включает оригинальную аминокислотную последовательность A29L. В ИФА проверяли отсутствие кроссовера антител к белку Trx и нативным препаратам вируса натуральной оспы и вируса осповакцины. В результате гибридизации спленоцитов иммунизированных мышей получены продуценты МКА.

Результаты. 15 гибридом-продуцентов МКА отобраны по результатам ИФА с тремя специфичными и тремя неспецифичными антигенами ВОО. Для депонирования по критерию продуктивности отобраны три гибридомы. Проверена возможность выявления МКА от них различных концентраций нативного антигена ВОО, определена чувствительность метода. МКА a-A29L_MPoxV трех гибридом выявили нативный антиген ВОО в концентрации 10^2 БОЕ/мл. Вероятно, метод еще более чувствителен при подборе условий анализа.

Заключение. На основе меченых МКА a-A29L_MPoxV возможна разработка чувствительной и специфичной иммунодиагностики ВОО методом непрямого двухстадийного ИФА.

Ключевые слова: *вирус оспы обезьян, иммуноферментный анализ, антиген, штамм, гибридома, моноклональное антитело.*

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Пьянков С.А. — https://orcid.org/0000-0002-6593-6614; e-mail: pyankov_sa@vector.nsc.ru
Шульгина И.С. — https://orcid.org/0000-0002-6850-338X; e-mail: shulgina_is@vector.nsc.ru
Рыбель А.В.— https://orcid.org/0009-0000-1111-9435; e-mail: ann2539@yandex.ru
Максютов А.З. — https://orcid.org/0000-0002-4027-8299; e-mail: amaksyutov@yandex.ru
Тюрин В.Ю. — https://orcid.org/0009-0000-7916-9332; e-mail: tyurin_vyu@vector.nsc.ru
Драчкова И.А. — https://orcid.org/0000-0002-2522-1657; e-mail: drachkova_ia@vector.nsc.ru
Трегубчак Т.В. — https://orcid.org/0000-0001-9608-2044; e-mail: tregubchak_tv@vector.nsc.ru
Бауэр Т.В. — https://orcid.org/0000-0002-4954-9905; e-mail: bauer_tv@vector.nsc.ru
Овчинникова А.С. — https://orcid.org/0000-0002-1745-7643; e-mail: ovchinnikova_as@vector.nsc.ru
Одношевский Д.А. — https://orcid.org/0000-0003-0616-7488; e-mail: odnoshevskiy_da@vector.nsc.ru
Кабанов А.С. — https://orcid.org/0000-0002-6287-0912; e-mail: kabanov@vector.nsc.ru
Боднев С.А. — https://orcid.org/0000-0003-0599-3817; e-mail: bodnev@vector.nsc.ru
Пьянков О.В. — https://orcid.org/0000-0003-3340-8750; e-mail: pyankov@vector.nsc.ru
Агафонов А.П. — https://orcid.org/0000-0003-2577-0434; e-mail: agafonov@vector.nsc.ru
Автор, ответственный за переписку: Пьянков С.А. — e-mail: pyankov_sa@vector.nsc.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Пьянков С.А., Шульгина И.С., Рыбель А.В., Максютов А.З., Тюрин В.Ю., Драчкова И.А., Трегубчак Т.В., Бауэр Т.В., Овчинникова А.С., Одношевский Д.А., Кабанов А.С., Боднев С.А., Пьянков О.В., Агафонов А.П. Применение специфичных к белку A29L моноклональных антител a-A29L_MPoxV для диагностики оспы обезьян. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2023;41(4):31–37. https://doi.org/10.17116/molgen20234104131

Application of A29L protein specific monoclonal antibodies a-A29L_MPoxV for monkeypox diagnosis

© S.A. PYANKOV, I.S. SHULGINA, A.V. RYBEL, A.Z. MAKSYUTOV, V.Yu. TYURIN, I.A. DRACHKOVA, T.V. TREGUBCHAK, T.V. BAUER, A.S. OVCHINNIKOVA, D.A. ODNOSHEVSKIY, A.S. KABANOV, S.A. BODNEV, O.V. PYANKOV, A.P. AGAFONOV

State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

ABSTRACT

Introduction. The spread of the disease caused by monkeypox virus (MPox) since 2022 has shown the urgency of developing countermeasures. The development of modern methods of clinical laboratory diagnostics of MPox contributes to this.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is an accessible and sensitive platform for developing diagnostic tools. Detection of MPox antigens using ELISA kits based on monoclonal antibodies (MAbs) is promising due to quick time of analysis and minimal requirements for sample preparation.

Matherial and methods. We have developed and deposited two strains of *Escherichia coli* that produce recombinant proteins. Mice were immunized the AgPOX protein contains unique antigenic sequences of MPox. The Trx+A29 protein for selecting MAb producers includes the original amino acid sequence A29L. The absence of antibody crossover to Trx protein and native preparations of variola virus and vaccinia virus tested by ELISA. As a result of hybridization of splenocytes from immunized mice, MAb producers were obtained.

Results. 15 MAb-producing hybridomas were selected based on ELISA results with three specific MPox antigens and three non-specific ones. Three hybridomas were selected for deposit according to the productivity criteria. The possibility of detecting by its MAbs of the native MPox antigen at various concentrations was tested and method sensitivity was determined. The MAbs a-A29L_MPoxV of three hybridomas detected the native antigen MPox at a concentration of 10^2 PFU/ml. It is likely that the method is even more sensitive when selecting analysis conditions.

Conclusion. Based on labeled MAbs a-A29L_MPoxV, it is possible to develop a sensitive and specific indirect two-step ELISA kit for immunodiagnostics of MPox.

Keywords: *monkeypox virus, enzyme-linked immunosorbent assay, antigen, strain, hybridoma, monoclonal antibody.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:
Pyankov S.A. — https://orcid.org/0000-0002-6593-6614; e-mail: pyankov_sa@vector.nsc.ru
Shulgina I.S. — https://orcid.org/0000-0002-6850-338X; e-mail: shulgina_is@vector.nsc.ru
Rybel A.V. — https://orcid.org/0009-0000-1111-9435; e-mail: ann2539@yandex.ru
Maksyutov A.Z. — https://orcid.org/0000-0002-4027-8299; e-mail: amaksyutov@yandex.ru
Tyurin V.Yu. — https://orcid.org/0009-0000-7916-9332; e-mail: tyurin_vyu@vector.nsc.ru
Drachkova I.A. — https://orcid.org/0000-0002-2522-1657; e-mail: drachkova_ia@vector.nsc.ru
Tregubchak T.V. — https://orcid.org/0000-0001-9608-2044; e-mail: tregubchak_tv@vector.nsc.ru
Bauer T.V. — https://orcid.org/0000-0002-4954-9905; e-mail: bauer_tv@vector.nsc.ru
Ovchinnikova A.S. — https://orcid.org/0000-0002-1745-7643; e-mail: ovchinnikova_as@vector.nsc.ru
Odnoshevskiy D.A. — https://orcid.org/0000-0003-0616-7488; e-mail: odnoshevskiy_da@vector.nsc.ru
Kabanov A.S. — https://orcid.org/0000-0002-6287-0912; e-mail: kabanov@vector.nsc.ru
Bodnev S.A. — https://orcid.org/0000-0003-0599-3817; e-mail: bodnev@vector.nsc.ru
Pyankov O.V. — https://orcid.org/0000-0003-3340-8750; e-mail: pyankov@vector.nsc.ru
Agafonov A.P. — https://orcid.org/0000-0003-2577-0434; e-mail: agafonov@vector.nsc.ru
Corresponding author: Pyankov S.A. — e-mail: pyankov_sa@vector.nsc.ru

TO CITE THIS ARTICLE:
Pyankov SA, Shulgina IS, Rybel AV, Maksyutov AZ, Tyurin VYu, Drachkova IA, Tregubchak TV, Bauer TV, Ovchinnikova AS, Odnoshevskiy DA, Kabanov AS, Bodnev SA, Pyankov OV, Agafonov AP. Application of A29L protein specific monoclonal antibodies a-A29L_MPoxV for monkeypox diagnosis. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya (Molecular Genetics, Microbiology and Virology)*. 2023;41(4):31–37. (In Russ.). https://doi.org/10.17116/molgen20234104131

Введение

Заболевания, вызываемые ортопоксвирусами, всегда представляли существенную угрозу здоровью человека [1]. Сразу 2 из 12 видов рода *orthopoxvirus*, вирус натуральной оспы (*variola virus*) (ВНО) и вирус оспы обезьян (*monkeypox virus*) (ВОО), определены в действующих санитарных правилах и нормах как особо опасные патогены первой группы патогенности [2]. Самой эффективной мерой в борьбе с вызываемыми ими инфекциями является вакцинация. Международная программа по элиминации натуральной оспы выполнялась при помощи тотальной вакцинации и завершилась в 1980 г. Благодаря тому, что ортопоксвирусы имеют высокий уровень антигенного кроссовера — более 95%, был сформирован коллективный иммунитет и к натуральной оспе, и к оспе обезьян. Однако со временем коллективный иммунитет понизился настолько, что участились и стали более интенсивными вспышки заболеваний, вызываемых как другими ортопоксвирусами, так и оспой обезьян [3].

ВОО был впервые выделен в 1958 г. в Дании от импортированной макаки-крабоеда, а первые зарегистрированные случаи заболевания людей были описаны в начале 1970-х годов в Центральной Африке [4, 5]. В Африке оспа обезьян является зоонозным заболеванием, распространенным среди довольно обширного ареала животных, включая белок и других грызунов [6, 7]. Ученые нашей страны под руководством академика РАЕН С.С. Маренниковой впервые доказали, что оспа обезьян может поражать и человека [8]. У людей оспа обезьян характеризуется выраженной лимфаденопатией, клиническая картина включает высокую температуру, головную боль, недомогание и развитие кожных поражений. Уровень смертности достигает 10% при инфекции, вызванной штаммами центральноафриканской клады [9]. Западноафриканские штаммы вызывают инфекцию с менее тяжелыми клиническими проявлениями [10, 11].

С января 2022 г. в мире регистрируются вспышки заболевания, вызванного ВОО, а к сентябрю 2023 г. отмечено почти 90,5 тыс. случаев оспы обе-

зьян, из них более 150 (0,17%) летальных [12]. Для неполового пути передачи отмечена низкая инфекционность и слабая тяжесть заболевания. Однако следует помнить, что ВОО способен изменять биологические свойства. Поэтому необходимо постоянное обеспечение лабораторной диагностики как основного средства мониторинга заболевания разнообразными современными способами.

В настоящее время выявление ВОО основано на проведении анализа клинических образцов методом полимеразной цепной реакции [13]. Доказанными считаются подтвержденные другими лабораторными методами (например ИФА) случаи. Иммуноферментная диагностика специфических к ВОО антител широко применяется, но она обеспечивает только ретроспективное выявление оспы обезьян [14]. По этой причине актуальной в настоящее время является разработка средств иммунодиагностики, основанных на выявлении антигенов ВОО [15]. Решение эьой задачи тесно связано с созданием гибридом — продуцентов моноклональных антител (МКА) к уникальным антигенам ВОО.

За рубежом есть зарегистрированные тест-системы ИФА, разрешенные к применению в своих странах. Принцип их действия основан на выявлении белка A27L ВОО сэндвич-методом [16].

Цель нашего исследования — определение возможности разработки средства иммуноферментной диагностики оспы обезьян на основе МКА по специфическому антигену поверхностного белка A29L ВОО.

Материал и методы

Дизайн аминокислотных последовательностей, получение штаммов-продуцентов рекомбинантных аналогов белков ВОО, Trx

Дизайн аминокислотных последовательностей, получение штаммов и рекомбинантных белков проводили по классическим методикам [17].

Получение инактивированных нативных антигенов ВОО, ВНО и ВОВ

Штаммом hMpxV/Russia/St.Petersburg-02/2022 ВОО, штаммом India 3a вируса натуральной оспы (ВНО) и штаммом ЛИВП вируса осповакцины (ВОВ) заражали монослой чувствительной клеточной культуры и инкубировали при 37°С в атмосфере 5% CO_2 в течение 5—7 сут до поражения монослоя на 80—90%.

Титрование ВОО проводили методом бляшкообразования в 24-луночных планшетах. Титр вируса выражали в БОЕ/мл [18]. Титр ВОО составил $4{,}1 \cdot 10^6$ БОЕ/мл, стоки вируса хранили при –70°С.

Культуральную вируссодержащую жидкость (КВЖ) с ВНО обрабатывали добавлением трехкратного объема 10% формалина и выдерживали в течение 14 сут при 23°С. ВОО и ВОВ инактивировали 0,02% раствором пропиолактона в течение 2 ч при 37°С. Аликвоты ВОО, ВНО и ВОВ хранили при –70°С.

Иммунизация животных рекомбинантными белками ВОО

В работе использовали инбредных разнополых 10—12-недельных мышей линии BALB/c массой 20—22 г. Подопытных животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях. Трех мышей линии BALB-C внутрибрюшинно иммунизировали препаратом очищенного рекомбинантного белка AgPOX 50 мкг/животное, трехкратно, с перерывом в 14 сут, первый раз с полным адъювантом Фрейнда, затем с неполным адъювантом Фрейнда. Через 14 дней после последней иммунизации проводили бустерную иммунизацию антигеном в 0,9% NaCl. Через 3 дня из иммунизированных животных выделяли спленоциты, которые в дальнейшем были использованы для гибридизации. Гибридизацию полученных спленоцитов с линией клеток миеломы мыши SP2/0 проводили с использованием полиэтиленгликоля 1500 (Sigma Aldrich) согласно инструкции производителя. После гибридизации полученные пулы гибридомных клеток высевали в лунки планшета с селективной средой IMDM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамина, 100 мкМ гипоксантина, 0,4 мкМ аминоптерина и 16 мкМ тимидина. Каждые 3 сут в лунке с пулом заменяли селективную среду свежей. На 10—14-е сутки культивирования из лунок отбирали супернатант и тестировали в ИФА на наличие специфичных антител к белку AgPOX. Из них отдельные гибридомные штаммы-продуценты МКА получали методом предельных разведений.

Очистка моноклональных антител

МКА против рекомбинантного белка AgPOX выделяли из асцитной жидкости мышей, которым вводили клетки гибридом. Сначала МКА переосаждали в 50% растворе $(NH_4)_2SO_4$ (50%), после чего антитела растворяли в буфере ХБА (0,75 М глицин-NaOH, 3 М NaCl, pH 8,9). На втором этапе антитела очищали хроматографически, для этого колонку с сорбентом (белок А сефароза-4В эж, Thermo Fischer Scientific, США) промывали 5 объемами колонки буфером ХБА и наносили раствор МКА. После нанесения колонку еще раз промывали буфером ХБА. Антитела элюировали 0,1 М цитратным буфером, pH 3,5. К раствору очищенных антител добавляли $^1/_{10}$ объема буфера (1,5 М трис-HCl, pH 8,8) для нейтрализации pH. Затем МКА диализом переводили в буфер ЗФР (0,02М калий фосфорнокислый, pH 7,3; 0,15М натрия хло-

рид, 0,05% раствор азида натрия). Концентрацию белка в препарате определяли спектрофотометрически, проводя измерение при длине волны 280 нм.

Выбор гибридом, синтезирующих IgG к A29L ВОО

Выбор гибридом, синтезирующих IgG к A29L ВОО, осуществляли в ИФА на иммуносорбентах (ИС) с 6 антигенами. Для приготовления ИС рекомбинантные и нативные белки раздельно сорбировали в лунках 96-луночного планшета для иммунологических реакций (Nunc MaxiSorp), внося в пропорции 1:100 с 0,01 М раствором натрия углекислого по 100 мкл/лунку. После инкубации при 23°С в течение 18 ч жидкость аспирировали и вносили по 200 мкл блокирующего раствора 0,1% казеина (Serva). После 2 ч инкубации при 23°С жидкость аспирировали и высушивали в течение 18 ч при 23°С. Каждую пробу супернатанта, содержащую МКА к AgPOX, исследовали в ИФА параллельно с использованием этих ИС. В качестве отрицательного контроля (К–) использовали растворы МКА к белкам других вирусов. Для этого вносили в дубле в лунки по 100 мкл супернатанта, разведенного 1:100 в 0,1% растворе бычьего сывороточного альбумина (РС). После инкубации при 37°С в течение 60 мин лунки ИС отмывали пятикратно раствором фосфатно-солевого буферного раствора с добавлением 0,2% Твин-20 (ФСБ-Т). Затем вносили по 100 мкл разведенного 1:5000 в РС пероксидазного конъюгата антител кролика к IgG мыши (Sigma Aldrich). После инкубации при 37°С в течение 30 мин лунки ИС отмывали пятикратно раствором ФСБ-Т и вносили по 100 мкл хромогена ТМБ для визуализации образовавшихся иммунных комплексов через 15 мин инкубации при 37°С. Останавливали реакцию внесением 1 М раствора серной кислоты, результаты учитывали на планшетном ридере при длине волны 450 нм. Гибридома, продуцирующая антитела к уникальным эпитопам белка A29L, удовлетворяла критериям отбора при условии превышения величины фонового сигнала в 200 раз от супернатанта с IgG в лунках планшета с антигеном AgPOX, в 100 раз с Trx-A29 и при отсутствии любого сигнала выше фонового (4х среднеарифметическое значение оптической плотности К–) в лунках с антигенами Trx, ВНО и ВОВ.

Определение чувствительности МКА к A29L ВОО в ИФА

Культуральную жидкость, содержащую ВОО, разводили раствором $NaHCO_3$ до концентраций 10^4, 10^3, 10^2 и 10 БОЕ/мл и вносили по 100 мкл/лунку 96-луночного планшета для иммунологических реакций в 18 дублях. После инкубации при 23°С в течение 18 ч жидкость аспирировали и вносили по 200 мкл блокирующего раствора — 0,1% раствора казеина (Serva). После 2 ч инкубации при 23°С жидкость аспирировали и высушивали в течение 18 ч при 23°С. ИФА проводили, как описано выше, в качестве первичных антител использовали МКА к A29L ВОО от трех гибридом в концентрации 0,02 мг/мл.

Результаты и обсуждение

Дизайн искусственного мозаичного белка AgPOX, содержащего уникальные эпитопы ВОО

Дизайн искусственного мозаичного белка AgPOX, содержащего уникальные эпитопы ВОО, проведен на основе сравнительного анализа структурно-функциональной организации белков ВОО, ВНО, ВОВ и других ортопоксвирусов. Выявлены и комбинированы уникальные эпитопы ВОО с «иммунологически существенными» отличиями от белков-ортологов. В составе AgPOX представлены уникальные участки восьми белков ВОО, включая короткую последовательность белка A29L **(рис. 1, см. https://mediasphera.ru/upload/medialibrary/files/Mol_genetika_2023_02_034_add.zip)**.

Дизайн белка Trx-A29

Белок A29L ВОО способствует слиянию мембран вирусной частицы и клетки-хозяина. Существует только четыре аминокислотных различия с белками-ортологами ортопоксвирусов. В иммуногенной области расположены только три [16].

В качестве матрицы для синтеза антигена использовали укороченный вариант кодирующей последовательности ДНК A29L (1—83 а.о.). В состав включен спирально-спиральный домен, отвечающий за самосборку в четвертичную структуру [19]. При трансформации реципиента *Escherichia coli* плазмидой pET-32(a)-A29L проведена инсерция целевого фрагмента A29L в последовательность гена Trx для достижения оптимальных условий синтеза последовательности **(рис. 2, см. https://mediasphera.ru/upload/medialibrary/files/Mol_genetika_2023_02_034_add.zip)**.

Получение штаммов-продуцентов рекомбинантных аналогов белков ВОО, Trx и наработка ими рекомбинантных белков

На основе штамма BL21(DE-3) *E. coli* был создан продуцент *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET28b-AgPOX белка AgPOX. Рекомбинантный белок AgPOX в дальнейшем использован для иммунизации животных при получении диагностических МКА к ВОО. Индукцию синтеза белка AgPOX осуществляли внесением IPTG до 0,1 мМ. Штамм обеспечивает продукцию рекомбинантного белка AgPOX в количестве 5—10 мг на 1 г биомассы при выделении методом аффинной металлхелатной хроматографии.

Таблица 1. **Величина положительного сигнала IgG к антигенам ортопоксвирусов у иммунизированных штаммом ЛИВП ВОВ мышей на иммуносорбентах ВНО и ВОВ**

№ мыши	ИС ВНО		ИС ВОВ	
	ОП, о.е.	КПоз	ОП, о.е.	КПоз
1	2,346	59	4,501	64
2	1,343	34	4,223	60
3	1,009	25	5,947	85
4	1,986	50	4,652	66
5	1,193	30	4,963	71
6	0,907	23	4,389	63
отр. К1	0,009	0,2	0,014	0,2
отр. К2	0,010	0,3	0,019	0,3
Ср. геометрическое		34,4		67,8
Lg ср. геом		1,54		1,83
Доверит. интервал Lg I_{95}		0,17		0,13

Примечание. * — КПоз = оптическая плотность исследуемого образца / оптическая плотность фона (4х среднего арифметического отрицательного контроля).

Второй штамм-продуцент, *Escherichia coli* Rosetta2/pET-32(a)-A29L, нарабатывает рекомбинантный белок Trx-A29. При индукции синтеза белка Trx-A29 с использованием IPTG на 1 г биомассы выход белка составляет 7,32 мг. Он содержит в своем составе последовательность Trx. По этой причине при применении Trx-A29 для отбора продуцента IgG в ИФА потребовалось использование дополнительного иммуносорбента на основе чистого Trx чтобы исключить выбор продуцента антител к тиоредоксину. Белок был очищен из биомассы штамма-реципиента.

Контроль качества нативных антигенов ВНО и ВОВ

Исходя из того, что геномы ВОО, ВНО и ВОВ идентичны более чем на 90%, для контроля специфичности и отсутствия кроссреактивного связывания антител на антигены ВНО и ВОВ использовали иммуносорбенты на основе их инактивированных препаратов. Специфическую активность иммуносорбентов ВНО и ВОВ исследовали в ИФА с применением первичных антител из сыворотки крови иммунизированных штаммом ЛИВП ВОВ мышей. Результаты ИФА — в **табл. 1**.

Получение и характеризация МКА против белка A29L ВОО

В результате гибридизации, селекции и последующего скрининга выросших гибридомных клеток получены 15 гибридом, продуцирующих МКА к рекомбинантному белку AgPOX. Результаты ИФА по определению их диагностических характеристик — в **табл. 2**.

Чувствительность ИФА с использованием МКА к A29L ВОО

Три гибридомы отобраны для депонирования по критерию производительности МКА мыши класса IgG к A29L ВОО. Серии препаратов МКА a-A29L_MPoxV от каждой из гибридом исследованы в ИФА на предмет чувствительности при выявлении антигена ВОО в иммуносорбенте. Результаты — в **табл. 3**.

В данном эксперименте мы применили комбинированный способ получения диагностических МКА к определенному эпитопу ВОО с последующим контролем их специфичности. Для гибридизации использованы спленоциты от мышей, иммунизированных рекомбинантным белком с восемью уникальными для ВОО последовательностями. Выбор перспективных гибридом проведен на другом рекомбинантном белке с последовательностью A29L, содержащей три поверхностных уникальных для ВОО эпитопа.

Для контроля специфичности использованы нативные антигены ВНО и ВОВ. Предварительно они показали, что данный способ их применения обеспечивает чувствительность анализа по результатам ИФА с применением поликлональных антител иммунизированных ВОВ мышей **(см. табл. 1)**. Статистически достоверных различий для антигенов ВОВ и ВОО в ИФА не выявлено (интервалы погрешности при доверительном уровне 95% вероятности перекрываются).

При определении чувствительности МКА от 15 гибридом к последовательности A29L ВОО в составе белка Trx-A29 **(см. табл. 2)** величины положительных сигналов на нативном антигене ВОО превысили сигнал от отрицательного контроля более чем в 150 раз. Кроме того, 12 из 15 образцов МКА имели величины положительных сигналов в ИФА к антигену Trx+A29 в 2—4 раза выше, чем к антигену AgPOX, использованному для иммунизации животных, это свидетельствует о том, что Trx+A29 содержит эпитопы с корректными фолдингом. Специфичность МКА подтверждает отсутствие ложноположительного сигнала от антигенов Trx, ВНО и ВОВ. МКА трех отобранных для депонирования гибридом при исследовании их диагностической чувствительности, согласно **табл. 3**, показали достоверное десятикратное отличие сигнала от фона при детекции ВОО в концентрации 10^2 БОЕ/мл.

Таблица 2. **Результаты ИФА по отбору гибридом**

№ гибридомы	Иммуносорбент в ИФА, КПоз.*					
	AgPOX	Trx+A29	Trx	ВОВ	ВНО	ВОО
4H11	212,9	847,7	1,0	1,3	0,9	161,8
8F12	222,8	813,4	2,5	0,9	1,0	169,3
2B6	215,3	686,7	1,1	1,3	0,9	163,6
4C4	210,0	674,1	1,2	1,8	1,0	159,6
2D1	209,9	673,7	1,0	1,3	0,9	159,5
5D4	231,1	664,2	1,1	1,2	1,1	175,6
1H2	205,6	654,6	1,1	1,4	0,8	156,3
A12	221,2	654,3	1,0	1,3	0,9	168,1
4E7	213,9	650,2	1,1	1,4	0,9	162,5
1E3	234,7	642,7	1,1	1,1	1,0	178,4
3F10	225,2	574,4	1,1	1,3	0,9	171,2
7D1	218,5	437,4	1,0	1,3	0,9	166,1
8D8	222,2	183,7	1,1	1,5	0,9	168,9
6A12	236,5	220,9	1,1	2,7	0,9	179,8
3E12	245,3	190,2	1,1	1,2	0,9	186,4
МКА ККГЛ 4E8	0,1	0,1	0,6	0,1	0,1	0,5
МКА ЛЗН 5H11	0,3	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1
МКА SARS-CoV-2 6C10	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,4

Примечание. * — КПоз = оптическая плотность исследуемого образца / оптическая плотность фона (4х среднего арифметического отрицательного контроля).

Таблица 3. **Определение чувствительности ИФА по выявлению антигена ВОО с применением в качестве первичных антител МКА трех серий от разработанных гибридом, в усредненных КПоз* от трех повторов**

МКА	Концентрация ВОО в иммуносорбенте, БОЕ/мл			
	10^4	10^3	10^2	10
a-A29L_MPoxV 1	159,6	47,7	11,0	1,2
a-A29L_MPoxV 2	159,5	43,4	12,5	1,9
a-A29L_MPoxV 3	165,3	46,7	11,1	1,4
МКА ККГЛ 4E8	0,5	0,2	0,3	0,6
МКА ЛЗН 5H11	0,9	0,8	0,7	0,7
МКА SARS-CoV-2 6C10	0,2	0,1	0,6	0,2

Примечание. * — КПоз = оптическая плотность исследуемого образца / оптическая плотность фона (4х среднего арифметического отрицательного контроля).

Увеличить чувствительность набора реагентов можно при использовании МКА без инактивации препарата ВОО. Тогда часть антигенных детерминант не поменяет конформацию и не затруднит связывание с активными центрами МКА. Набор реагентов RayBio Monkeypox Virus (MPXV) A29 ELISA Kit производства RayBiotech, Inc. (США) предназначен для иммуноферментной диагностики ВОО сэндвич-методом по антигену A29L за 4 ч 45 мин. К сожалению, в эксплуатационной документации нет описания пробоподготовки, хотя результат выражается в концентрации пг/мл белка A29L. Поэтому привязать результат к вирусной активности невозможно. В РФ зарегистрировано медицинское изделие «Набор реагентов Тест-система иммуноферментная для выявления антигена ортопоксвирусов по ТУ 9388-148-14237183-10» производства АО «НПО «Микроген». Изделие позволяет выявить без дифференцировки антигены ортопоксвирусов в неинактивированных биопробах при подготовке планшета к анализу в течение 24 ч и времени анализа 1 ч 10 мин.

Полученные нами результаты могут помочь в сокращении времени выявления антигена ВОО за счет разработки на основе биотинилированных МКА двухстадийной системы непрямого твердофазного ИФА со временем анализа не более 3 ч. В качестве анализируемых образцов будут исследоваться инактивированные и неинактивированные биопробы.

Заключение

На основе штаммов *E. coli* разработаны продуценты рекомбинантных белков: белка, состоящего из уникальных аминокислотных последовательностей нативных белков ВОО AgPOX для иммунизации животных с целью получения производящих специфические МКА гибридом; и белка, содержащего пептидную последовательность нативного белка A29L ВОО

Trx-A29 для отбора в ИФА продуцентов МКА к ВОО при использовании его в качестве антигена.

На примере штамма hMpxV/Russia/St.Petersburg-02/2022 из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН «ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (номер депонирования V-1200) показана возможность выявления вируса оспы обезьян методом ИФА с применением МКА к белку A29L в концентрациях выше 10^2 БОЕ/мл.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о возможности создания современного средства диагностики ВОО на основе метода ИФА.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю благодарность Андрею Леонидовичу Матвееву, старшему научному сотруднику Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, за его неоценимый вклад в создание гибридом и редактирование статьи.

Финансирование работы. Работа выполнена в рамках государственного задания ГЗ-34/21 ФБУН «ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (номер государственного учета НИР: рег. №121033100069-4).

Соблюдение этических стандартов

Информация о соблюдении стандартов работы с животными. Исследования и манипуляции на животных были проведены с одобрения комитета по биоэтике ФБУН «ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Информация об исследованиях, где в качестве объектов выступали люди. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Zhang Y, Zhou Y, Pei R, Chen X, Wang Y. Potential threat of human pathogenic orthopoxviruses to public health and control strategies. *J Biosaf Biosecur.* 2023;5(1):1-7. https://doi.org/10.1016/j.jobb.2022.12.004
2. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.21 №4 «Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Ссылка активна на 19.09.23. Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation dated January 28, 2021 No. 4 "On approval of sanitary rules and norms SanPiN 3.3686-21 "Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases". (In Russ.). Accessed September 19, 2023. https://base.garant.ru/400342149/?ysclid= lmpx9sn6gb601578034
3. Sklenovská N, Van Ranst M. Emergence of Monkeypox as the Most Important Orthopoxvirus Infection in Humans. *Front Public Health*. 2018;6:241. https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00241
4. Arita I, Henderson DA. Smallpox and monkeypox in nonhuman primates. *Bull. World Health Organ*. 1968;39:277-283.
5. Arita I, Jezek Z, Khodakevich L, Ruti K. Human monkeypox: A newly emerged orthopoxvirus zoonosis in the tropical rain forests of Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 1985;34:781-789. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1985.34.781
6. Di Giulio DB, Eckburg PB. Human monkeypox: an emerging zoonosis. *Lancet Infect Dis*. 2004;4:15-25. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00856-9
7. Huhn GD, Bauer AM, Yorita K, Graham MB, Sejvar J, Likos A, et al. Clinical characteristics of human monkeypox, and risk factors for severe disease. *Clin Infect Dis.* 2005;41(12):1742-1751. https://doi.org/10.1086/498115
8. Маренникова С.С., Щелкунов С.Н. *Патогенные для человека ортопоксвирусы.* М.: Товарищество научных изданий КМК; 1998:38. Marennikova SS, Shchelkunov SN. *Orthopoxviruses pathogenic to humans.* M.: Partnership of Scientific Publications KMK; 1998:38. (In Russ.).
9. Likos AM, Sammons SA, Olson VA, Frace AM, Li Y, Olsen-Rasmussen M, Davidson W, Galloway R, Khristova ML, Reynolds MG, Zhao H, Carroll DS, Curns A, Formenty P, Esposito JJ, Regnery RL, Damon IK. A tale of two clades: monkeypox viruses. *J Gen Virol*. 2005;86(Pt 10):2661-2672. https://doi.org/10.1099/vir.0.81215-0
10. Chen N, Li G, Liszewski MK, Atkinson JP, Jahrling PB, Feng Z, et al. Virulence differences between monkeypox virus isolates from West Africa and the Congo basin. *Virology.* 2005;340(1):46-63. https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.05.030
11. Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, et al. Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in non-human primates. *J Gen Virol.* 2009;90(Pt 9):2266-2271. https://doi.org/10.1099/vir.0.010207-0
12. WHO. *2022-23 Mpox (Monkeypox) outbreak: Global Trends.* Accessed October 02, 2023. https://www.who.int/publications/m/item/multi-country-outbreak-of-mpox--external-situation-report-28---19-september-2023
13. Dyall J, Johnson RF, Chen DY, Huzella L, Ragland DR, Mollura DJ, et al. Evaluation of monkeypox disease progression by molecular imaging. *J Infect Dis.* 2011;204(12):1902-1911. https://doi.org/10.1093/infdis/jir663
14. Dubois ME, Slifka MK. Retrospective analysis of monkeypox infection. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(4):592-599. https://doi.org/10.3201/eid1404.071044
15. Ушкаленко Н.Д., Ерш А.В., Филатов П.В., Полтавченко А.Г. Ускоренный метод иммуноферментного анализа для выявления ортопоксвирусов. *Вопросы вирусологии.* 2023;68(3):242-251. Ushkalenko ND, Ersh AV, Filatov PV, Poltavchenko AG. The rapid ELISA method for detection of orthopoxviruses. *Problems of Virology*. 2023;68(3): 242-251. (In Russ.). https://doi.org/10.36233/0507-4088-178
16. Hughes LJ, Goldstein J, Pohl J, Hooper JW, Lee Pitts R, Townsend MB, et al. A highly specific monoclonal antibody against monkeypox virus detects the heparin binding domain of A27. *Virology.* 2014;464-465:264-273. https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.06.039
17. Maniatis T, Fritsch EE, Sambrook J. *Molecular cloning.* Cold Spring Harbor lab. 1982.
18. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology.* 1938;27:493-497. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
19. Chang TH, Chang SJ, Hsieh FL, Ko TP, Lin CT, Ho MR, et al. Crystal Structure of Vaccinia Viral A27 Protein Reveals a Novel Structure Critical for Its Function and Complex Formation with A26 Protein. *PLoS Pathog.* 2013;9(8):e1003563. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003563

Поступила 28.09.2023
Received 28.09.2023
Принята к печати 13.10.2023
Accepted 13.10.2023

Приложение к статье *С.А. Пьянкова и соавт.* «Применение специфичных к белку A29L моноклональных антител a-A29L_MPoxV для диагностики оспы обезьян»

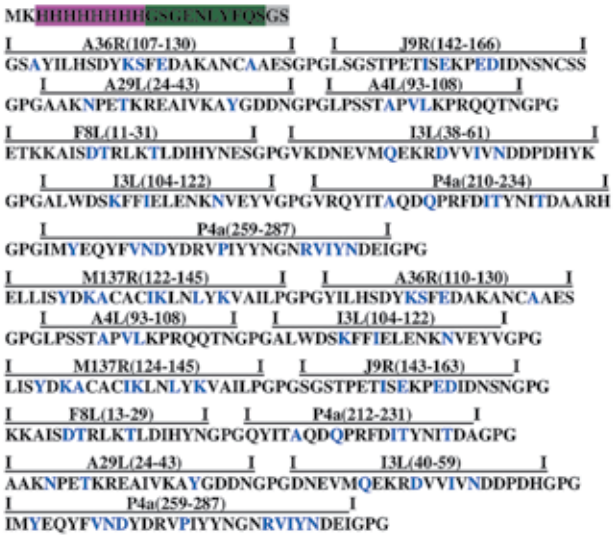

Рис. 1. **Аминокислотная последовательность белка AgPOX.**

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



Рис. 2. **Аминокислотная последовательность белка Trx-A29.**

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