

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Акиншина Ю.А.¹, Марданлы С.Г.^{1,2}, Ротанов С.В.¹, Малышев В.В.^{3,4}, Змеева Т.А.³,
Гумилевский Б.Ю.³, Хуторская Ю.Г.³

РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РОТАВИРУСОВ

¹АО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск, Россия;

²ГОУВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет» (ГОУ ВО МО «ГТТУ»), 142611, г. Орехово-Зуево, Россия;

³Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» (ФГБОУ ВО «ВМедА имени С.М.Кирова»), 194044, г. Санкт-Петербург, Россия;

⁴ФГБН «Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук», 199178, г. Санкт-Петербург, Россия

Представлены результаты разработки и апробации наборов реагентов для детекции ротавирусов. Продемонстрирована высокая диагностическая эффективность разработанной тест-системы.

Ключевые слова: иммунохроматография; ротавирусы.

Для цитирования: Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В., Малышев В.В., Змеева Т.А., Гумилевский Б.Ю., Хуторская Ю.Г. Разработка иммунохроматографического набора реагентов для выявления ротавирусов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (11): 672-679. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-68-11-672-679>

Для корреспонденции: Акиншина Юлия Александровна, руководитель научно-производственного отдела ИХТС АО «ЭКОлаб», akinshina.opr@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.09.2023

Принята к печати 26.10.2023

Опубликовано 21.11.2023

Akinshina Yu.A.¹, Mardanly S.G.^{1,2}, Rotanov S.V.¹, Malyshev V.V.^{3,4}, Zmeeva T.A.³, Gumilevsky B.Yu.³, Khutorskaya Yu.G.³

DEVELOPMENT OF A IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST KIT FOR THE DETECTION OF ROTAVIRUSES

¹JSC «EKOLab», 142530, Elektrogorsk, Russia;

²State educational institution of higher education of the Moscow region «State Humanitarian University of Technology» (GGTU), 142611, Orekhovo-Zuyevo, Russia;

³Federal state budgetary military educational institution of higher professional education «military medical Academy named after S. M. Kirov» of the Ministry of defense of the Russian Federation, 194044, Saint Petersburg, Russia;

⁴St. Petersburg Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, 199178, St. Petersburg, Russia

The results of the development and testing of test kits for the detection of rotaviruses are presented. The high diagnostic efficiency of the developed test system is demonstrated.

Key words: immunochromatography; rotaviruses.

For citation: Akinshina Yu.A., Mardanly S.G., Rotanov S.V., Malyshev V.V., Zmeeva T.A., Gumilevsky B.Yu., Khutorskaya Yu.G. Development of a immunochromatographic test kit for the detection of rotaviruses. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (11): 672-679 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-11-672-679>

For correspondence: Akinshina Yulia Aleksandrovna, specialist of the Innovative Development Department JSC «EKOLab»; e-mail: akinshina.opr@mail.ru

Information about authors:

Akinshina Yu. A., <https://orcid.org/0000-0002-9223-3455>;

Mardanly S. G., <https://orcid.org/0000-0003-3650-2363>;

Rotanov S. V., <https://orcid.org/0000-0002-3222-1401>;

Malyshev V. V., <https://orcid.org/0000-0002-5074-7212>;

Zmeeva T. A., <https://orcid.org/0000-0002-7603-3517>;

Gumilevsky B. Yu., <https://orcid.org/0000-0001-8755-2219>;

Khutorskaya Yu. G., <https://orcid.org/0009-0003-3888-7428>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 23.09.2023
Accepted 26.10.2023
Published 21.11.2023

Введение. Источники природной воды (реки, озёра, пруды, колодцы и скважины) могут быть загрязнены населяющими окружающую природную среду планктонными организмами, микробными биоплёнками и отдельными патогенными агентами, способными вызывать у человека вспышки инфекционных заболеваний. К числу патогенов, передающихся через воду, относятся: яйца и личинки разнообразных гельминтов, простейшие (амёбы, лямблии, криптоспоридии), бактерии (сальмонеллы, кампилобактерии, кишечные палочки, холерный вибрион и многие другие), грибы, вирусы (энтеровирусы, вирус гепатита А, ротавирусы, аденовирусы).

Вирусы-возбудители ОКИ являются наиболее частой причиной развития детского гастроэнтерита во всем мире, среди них ротавирусы считаются наиболее важными в эпидемиологическом отношении [1-3]. Ротавирусы могут распространяться в окружающей природной среде через грунтовые воды, морскую воду, реки, аэрозоли, выбрасываемые с очистных сооружений, недостаточно очищенную воду промышленного назначения и питьевую воду. Жизнедеятельность человека способствует распространению ротавирусов, несмотря на то, что современные производственные и санитарные технологии направлены на минимизацию рисков загрязнения источников питьевой воды. Ротавирусы способны сохранять жизнеспособность в воде с широким диапазоном водородного показателя (рН от 3 до 10), длительно переживать низкую температуру и замораживание. Своевременное обнаружение и контроль уровня содержания патогенов, в том числе и ротавирусов, в объектах водной среды являются актуальными проблемами современной гигиены и санитарии.

Инфицирование ротавирусом приводит к появлению тяжёлой инфекционной диареи у детей, что часто отмечается в развитых и развивающихся странах [4-5]. Этот двухцепочечный РНК-содержащий вирус семейства *Reoviridae* передается пищевым путём, при этом первые клинические симптомы обычно развиваются после инкубационного периода от одного до двух дней. Большинство детей заражаются ротавирусом в течение первых трёх лет жизни; пик заболеваемости ротавирусной диареей приходится на возраст 6-24 месяца [6]. Перенесенная первичная инфекция обеспечивает защиту от последующих заболеваний. Повторное заражение встречается не редко, что может быть обусловлено снижением иммунитета или заражением иным вариантом возбудителя. Последующие заболевания, как правило, проявляются в более лёгкой клинической форме [7-9].

Необходимо учитывать, что концентрации ротавирусов в образцах, полученных из водных объектов окружающей среды, как правило, низкие, поскольку вирусы не способны размножаться самостоятельно вне клеток организма хозяина, и во внешней среде они подвергаются постоянной деградации и разбавлению. В этой связи для их выделения с целью исследования необходимо обрабатывать большие объёмы (до 100-1000 л) воды, с использованием специальных фильтров с

микропористыми мембранами.

Для эффективной адсорбции вирусов фильтрами с отрицательно заряженными мембранами необходима предварительная подготовка исследуемых проб воды путём добавления поливалентных солей и подкисления, что затрудняет обработку проб большого объёма. Применение фильтрующих мембран с положительным зарядом не требует предварительной обработки образцов воды; они способны концентрировать вирусы из воды в более широком диапазоне рН, чем электроотрицательные фильтры. Ультрафильтры концентрируют вирусы на основе их размера, а не электрокинетики; но они непрактичны для обработки проб воды в полевых условиях или выделения вирусов из проб мутной воды.

Извлечение (элюцию) вирусов из мембран фильтров после их концентрирования проводят органическими (например, раствором на основе экстракта говядины) или неорганическими растворами (например, полифосфатами натрия). При необходимости элюаты повторно концентрируют для уменьшения объёма и адаптации исследуемой пробы к методу лабораторного исследования (например, анализ инфекционности клеточных культур и методы молекулярного обнаружения). По завершении этапа предварительной пробоподготовки концентрация вирусов в исследуемых образцах элюата становится достаточной для того, чтобы осуществить их идентификацию при помощи экспресс-тестов, к числу которых относят методики иммунохроматографического анализа (ИХА).

Цель исследования: разработать экспериментальные модели иммунохроматографических наборов реагентов для детекции патогенных для человека ротавирусов и оценить эффективность их применения с использованием стандартных образцов предприятия, натуральных клинических образцов и смывов (элюатов), получаемых с мембран фильтров при обследовании проб воды из природных источников.

Материал и методы. При разработке экспериментальных иммунохроматографических наборов реагентов для идентификации ротавирусов применены технологические подходы, ранее апробированные нами и описанные в ряде публикаций [10-13]. При этом использованы моноклональные антитела мыши к ротавирусу человека (кат. №№ НМ052, НМ053 фирмы «Medix», Финляндия), иммуноглобулины класса G (IgG) кролика и антитела козы к иммуноглобулинам кролика (АО «ЭКОлаб», Россия). В качестве контрольных материалов для оценки аналитической чувствительности теста применены стандартные образцы предприятия (СОП+), изготовленные на основе рекомбинантного антигена ротавируса (кат. № 610145 фирмы «Medix», Финляндия).

При получении конъюгатов кроличьих IgG к ротавирусу использована золотохлористоводородная кислота (ЗХВК) фирмы «Aldrich» (США) (Gold (III) chloride hydrate; кат. № 254169-500MG) и цитрат натрия фирмы «Sigma» (США) (Sodium citrate tribasic dehydrate; кат. № S4641-25G). Размеры и однородность наночастиц

коллоидного золота (НЧ-КЗ) определяли с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и спектрофотометрически.

Используемые материалы для конструирования твёрдой фазы: подложка для мембраны из поливинилхлорида, размером 60x4 мм, толщиной 0,2-0,6 мм (фирма «Современные технологии», Россия); нитроцеллюлозная реакционная мембрана с большой пропускной способностью, размером 30x4 мм, толщиной 185 мкм±20%, (фирма «Millipore», США, кат. № SHF1800425); мембрана для нанесения конъюгата (фирма «Millipore», США, кат. № GFDX 203000), размером 6x4 мм; впитывающая мембрана для нанесения исследуемого образца, размером 17x4 мм, толщиной 0,6-0,8 мм, плотностью 270±20 г/м² (фирма «LF1, Whatman», Великобритания, кат. № 8121-1750); мембрана для адсорбции, размером 16x4 мм, толщиной 0,3-0,5 мм, плотностью 179±5 г/м² («Millipore», США, кат. № CFSP2 230 00).

Для приготовления всех рабочих растворов использована деионизированная вода («Simplicity System», фирмы «Millipore») с удельным сопротивлением при 25 °С не менее 18,2 Мом/см. Перед приготовлением растворов очищенную воду дополнительно фильтровали через стерилизующий фильтр с размером пор 0,22 мкм.

При разработке и контроле диагностических характеристик разработанных тест-систем использована панель стандартных образцов предприятия, состоящая из 8-ми образцов буферного раствора с разной концентрацией антигена ротавируса.

Для определения диагностических клинических показателей опытно-экспериментальных серий разработанных ИХА наборов применены 135 лабораторно обследованных образцов кала, полученных от детей в возрасте до 4-х лет (проходивших лечение в инфекционном отделении Детской больницы г. Павловский Посад, Московской области) с подтверждённым диагнозом ротавирусный гастроэнтерит ($n=67$), аденови-

русный гастроэнтерит ($n=12$) или норовирусный гастроэнтерит ($n=26$), 30 образцов кала здоровых детей. Для проведения исследования было получено информированное добровольное согласие родителя (опекуна) на медицинское вмешательство. Образцы кала собирали в индивидуальные чистые сухие контейнеры без консервантов; в них с помощью аппликаторов с резьбой забирали по 20-30 мг кала из трёх разных локаций исходного образца. Каждый аппликатор с пробой погружали в одноразовый флакон-капельницу с 2 мл буферного раствора (0,05М трис-буфер, рН-7,2). Флакон-капельницу встряхивали до растворения биоматериала. Подготовленные для исследования образцы хранили при 2-8 °С не более суток.

С целью моделирования образцов воды из природных источников, содержащих ротавирусы, использованы музейные культуры вирусов. Модельные растворы с содержанием энтеровирусов в концентрации 10⁴-10¹¹ вирионов в 1 мл готовили на дистиллированной воде.

Разные объёмы модельных растворов для сорбции и концентрирования ротавирусов пропускали через фильтровальные установки с мелкопористыми мембранами, характеризующимися разными принципами (механизмами) сорбции: фильтр мембранный полиамидный (ФМПА, величина пор - 0,2 мкм); фильтр из полиэфирсульфона (ПЭС, 0,2 мкм); экспериментальный фильтр из капрона с положительным зарядом мембраны (Капрон⁺_{экспер.}), фильтр мембранный на основе смеси эфиров целлюлозы (ФМСЕ, 0,22мкм).

Элюентом (3% бифэкстракт на трис-буфере с рН 9,1-9,5) двукратно по 10 мл в течение нескольких минут проводили механические смывы сорбированных патогенов (ротавирусов) с поверхности фильтрующих мембран; рН полученного элюата доводили до 7,0-7,5 с помощью 1,0 N раствора соляной кислоты.

Дизайн исследования модельных проб воды для выявления в них ротавирусов человека представлен на рис. 1.

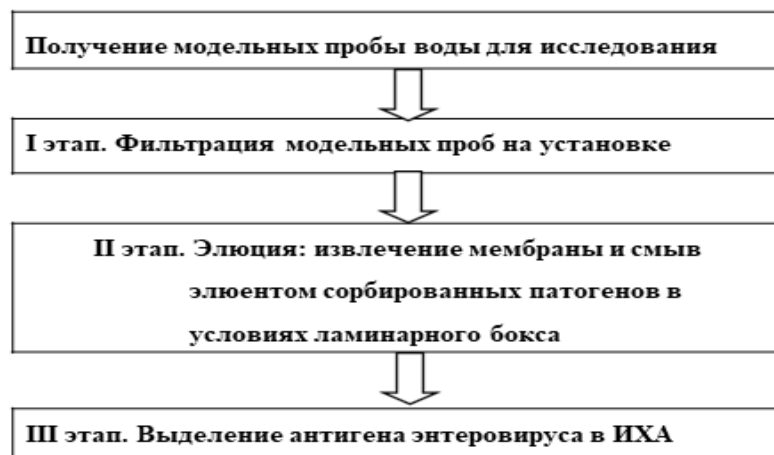


Рис. 1. Схема пробоподготовки и исследования проб воды для детекции ротавирусов.

Результаты. Получение конъюгатов для ИХА. Наночастицы коллоидного золота (НЧ-КЗ) со средним размером частиц 30 нм синтезировали из ЗХВК по методу Френса; полученный продукт НЧ-КЗ (30 нм) имел спектр поглощения с максимумом при длине волны 524-525 нм. На основе полученных частиц НЧ-КЗ опытно-экспериментальным путём готовили 2 вида конъюгатов: конъюгат-1 (НЧ-КЗ с антителами козы к IgG кролика) и конъюгат-2 (НЧ-КЗ, нагруженные специфическими моноклональными мышинными антителами к ротавирусу); выбор количественных соотношений реагентов для эффективной конъюгации проводили на основании построения и изучения флоккуляционных кривых, отражающих агрегацию продукта реакции при высокой ионной силе раствора.

Для всех видов используемых антител минимальная концентрация раствора, обеспечивающая устойчивость золя к коагулирующему действию электролита, составила 10-15 мкг/мл, поэтому для получения их конъюгатов с НЧ-КЗ выбрана концентрация 15 мкг/мл. Смесь НЧ-КЗ и соответствующих антител инкубировали 30 минут при температуре 20-22 °С и постоянном перемешивании. Для завершения процесса конъюгации вносили 10% водный раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА), фильтрованный через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм, достигая конечной концентрации БСА 0,25%.

Конъюгаты (НЧ-КЗ с иммобилизованными на них антителами) отделяли от избытка непрореагировавших антител центрифугированием при 10 тыс. g в течение 30 минут. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали в 10 мМ трис-НСl буфере, содержащем также БСА, сахарозу и азид натрия. Приготовленные препараты конъюгатов антител и НЧ-КЗ хранили до применения при 4-6 °С.

Подготовка мембраны для внесения образца. Мембрану для последующего нанесения исследуемого образца пропитывали буферным раствором, содержащим трис-оксиметил аминометан (1%), трис-оксиметил аминометан гидрохлорид (0,1%), казеинат натрия соль (1%), поливинилпирролидон (0,1%), азид натрия (0,02%), твин-20 (0,01%) и антитела мыши к эритроцитам человека (0,2 мг/мл). Значение рН должно соответствовать $8,0 \pm 0,1$; лист мембраны размером 20,4x25,4 см погружали в буферный раствор в объёме 50 мл и инкубировали на орбитальном горизонтальном шейкере в течение 15 минут с каждой стороны при режиме 13 об/мин. Сушку мембран для образца осуществляли при комнатной температуре (18-25 °С) и относительной влажности не более 30% в течение 24 часов. Высушенные мембраны хранили при комнатной температуре (18-25 °С) и относительной влажности не более 30%. Нарезку проводили на автоматическом резаке по 1,9 см.

Подготовка мембраны для пропитки конъюгатами антител с НКЗ. Готовили буферный раствор, содержащий натрий гидрофосфат безводный (1,5%), поливиниловый спирт (0,5%), альбумин бычий сывороточный (1%), тритон-Х-100 (0,1%), азид натрия (0,2%). Значение рН должно соответствовать $7,4 \pm 0,1$. Раствор для пропитки мембран хранили при температуре 2-8 °С в течение 14 суток. Мембрану для конъюгата пропитывали данным раствором в объёме 20 мл на

лист 20,4*25,4 см. на орбитальном шейкере в течение 15 минут с каждой стороны (режим 13 об/мин). Сушку мембран для образца осуществляли при комнатной температуре (18-25 °С) и относительной влажности не более 30% в течение 24 часов. Высушенные мембраны хранили при комнатной температуре (18-25 °С) и относительной влажности не более 30%. Нарезку проводили на автоматическом резаке по 0,9 см.

Подготовка мембраны для адсорбции. Мембраны для адсорбции не требуют обработки и предназначены для впитывания излишка жидкости при тестировании образцов, их нарезали на автоматическом резаке по 1,5 см; хранили при комнатной температуре (18-25 °С) и относительной влажности не более 30%.

Приготовление буферного раствора для разведения антител для сорбции (тестовая и контрольная линии). Готовили буферный раствор, содержащий натрий гидрофосфат безводный (0,1%), натрий дигидрофосфат дигидрат (0,03%), натрий хлористый (0,9%), азид натрия (0,02%). Значение рН должно соответствовать $7,4 \pm 0,1$. Хранили раствор для сорбции при температуре 2-8 °С в течение 14 суток.

Приготовление рабочего раствора антител для сорбции на зону тестовой линии. В буфер для сорбции вносили моноклональные антитела к ротавирусу в концентрации 1,5 мг/мл. Раствор хранению не подлежит.

Приготовление рабочего раствора антител для сорбции на зону контрольной линии. В буфер для сорбции вносили козы антитела к IgG кролика до конечной концентрации 0,5 мг/мл.

Сорбция антител. Сорбцию проводили с помощью диспенсера «АУТОКУН», модель HGS510. На твёрдую подложку наклеивали нитроцеллюлозную мембрану CN140, снимая защитный слой. На каждую подложку наносили рабочий раствор антител для тестовой и контрольной линии в объёме 2 мкл/см.

Сушка подложек с нанесёнными антителами. Сушку подложки с нанесёнными антителами осуществляли при комнатной температуре (18-25 °С) и относительной влажности не более 30% в течение 24 часов. Высушенные подложки хранили при комнатной температуре (18-25 °С) и относительной влажности не более 30% в бумажном конверте.

Приготовление буферного раствора для разведения конъюгатов. Готовили буферный раствор, содержащий трис-оксиметил аминометан гидрохлорид (10,1%), трис-оксиметил аминометан (3,2%), альбумин бычий сывороточный (1%), азид натрия (0,02%); рН должно соответствовать $8,0 \pm 0,1$. Хранили раствор для сорбции при температуре 2-8 °С в течение 14 суток. Перед разведением конъюгата добавляли сахарозу 20%, трегалозу 5%.

Приготовление рабочего раствора конъюгатов. Определяли рабочее разведение конъюгатов. В качестве рабочего разведения принимали то, при котором достигаются устойчивые результаты со стандартными образцами предпрития для данного теста. Обработанные листы мембран выкладывали в чистый и сухой лоток под размер листа, обрабатывали раствором из расчёта 20 мкл на см².

Сушка и нарезка мембран с нанесёнными конъюгатами. Сушку листов осуществляли при комнатной температуре (18-25 °С) и относительной влажности не

более 30% в течение 24 часов. Высушенные мембраны с нанесённым конъюгатом хранили при комнатной температуре (18-25 °С) и относительной влажности не более 30% в бумажном конверте. Нарезку осуществляли в автоматическом резаке по 0,9 см. Хранили при комнатной температуре (18-25 °С) и относительной влажности не более 30% в бумажном конверте.

Сборка и нарезка иммуносорбента (мастершита). Сборку мастершита осуществляли при комнатной температуре (18-25 °С) и относительной влажности не более 30%. Для сборки мастершита использовали предварительно обработанные (при необходимости) и нарезанные мембраны (рис. 2). С подложки с наклеенной мембраной CN140 снимали защитный слой в зоне мембраны для адсорбции. Наклеивали полоску мембраны для адсорбции,

выравнивая её по наружному краю с краем подложки. При этом на противоположном крае образовывался нахлест на CN140 1-2 мм. Далее освобождали от защитного слоя зону конъюгата и наклеивали мембрану с конъюгатом, выравнивая её по нижнему краю со стороны зоны для образца, при этом на противоположном крае образовывался нахлест на CN140 1-2 мм. В последнюю очередь освобождали подложку от оставшегося защитного слоя в нижней зоне, где и наклеили мембрану для образца, выравнивая её по нижнему краю с краем подложки.

Производили нарезку собранного мастершита на тест-полоски по 4 мм на высокоскоростном резаке HGS210, «AUTOKUN»; каждую тест-полоску для удобства последующего использования помещали в индивидуальную пластиковую кассету.

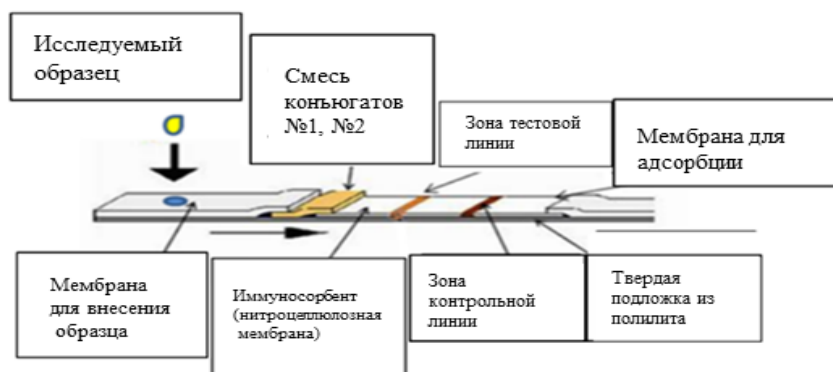


Рис. 2. Схема тест-полоски.

Принцип работы теста. В основе работы разработанного набора реагентов (теста) для определения ротавирусов лежит метод качественного иммунохроматографического анализа (ИХА) с использованием тест-кассет, подготовленных как описано выше.

Исследование проводится при комнатной температуре. Для каждого образца используется отдельная тест-кассета. Исследуемая проба в объёме 50 мкл наносится на тест-полоску через окно для внесения образца.

При наличии в исследуемом образце антигена определяемого вируса он связывается в области внесения пробы со специфичным конъюгатом № 1 (специфические мышиные моноклональные антитела, меченные НЧ-КЗ), при этом формируется комплекс «антиген ротавируса - антитело к нему - НЧКЗ», который с током жидкости постепенно мигрирует вдоль тест-полоски. В тестовой зоне кассеты происходит взаимодействие этого иммунного комплекса с иммобилизованными на мембране специфическими моноклональными антителами другого клона к тому же антигену ротавируса, с формированием более сложного иммунного комплекса «моноклональное антитело к антигену ротавируса, фиксированное на тестовой линии - антиген вируса - антитело к антигену ротавируса в составе конъюгата с НЧ-КЗ», который постепенно окрашивает тестовую зону в розовый цвет за счёт интенсивного накопления НЧ-КЗ,

входящего в состав конъюгата. Интенсивность проявляющейся окраски пропорциональна количеству антигена ротавируса, содержащегося в исследуемой пробе.

Неспецифический конъюгат № 2 (антитела кролика IgG и НЧ КЗ) в процессе проведения исследования с током жидкости исследуемого образца выходит за пределы тестовой зоны и достигая контрольной зоны взаимодействует с иммобилизованными в ней антивидовыми антителами козы, что ведёт к образованию окрашенного иммунного комплекса. Цветная контрольная линия в результате проведения теста формируется всегда, независимо от наличия ротавируса в образце.

Положительным, характеризующим присутствие определяемого патогена (ротавируса), считается результат исследования с образованием двух различных окрашенных полос розового или красного цвета в контрольной и тестовой зонах. Отрицательный результат анализа фиксируют при появлении только одной окрашенной полосы в области контрольной зоны. При отсутствии формирования окрашенной полосы в зоне контроля результат исследования пробы считается недействительным, и требуется повторное исследование образца.

Оценка диагностических характеристик теста. Разработанный набор реагентов «ИХА-Ротавир» охарактеризован по показателям диагностической информативности в исследованиях со стандартными образ-

цами предприятия (СОП_{ротавир}⁺), изготовленными на основе рекомбинантных антигенов ротавируса. Кон-

центрации антигена ротавируса в каждом образце приведены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты исследований СОП_{ротавир}⁺ с набором реагентов «ИХА-Ротавир»

№ образца в панели СОП _{ротавир} ⁺	Расчётная концентрация антигена ротавируса (в нг/мл)	Результаты в ИХА
1	0	Отрицательный
2	2	Отрицательный
3	3	Положительный
4	6	Положительный
5	10	Положительный
6	15	Положительный
7	30	Положительный
8	45	Положительный

Установлено, что концентрация ротавируса 3 нг/мл является показателем аналитической чувствительности теста «ИХА-Ротавир». Исследования с каждым образцом панели повторены по 10 раз, при этом не получено отклонений в результатах исследования, что позволяет оценить воспроизводимость результатов исследования на уровне 100%.

При оценке информативности разработанного теста исследованы образцы кала, полученные от детей с ла-

бораторно подтверждённым диагнозом ротавирусной ($n=67$), аденовирусной ($n=12$), норовирусной инфекции ($n=26$), от здоровых детей ($n=30$). Подготовленные к исследованию образцы из флакона-капельницы по 2 капли переносили на тест-полоску в кассете «ИХА-Ротавир». Во всех случаях получены ожидаемые результаты, соответствовавшие ранее установленному клиническому диагнозу (табл. 2).

Таблица 2

Исследование клинических образцов с набором реагентов «ИХА-Ротавир»

Группа обследуемых	Результат в ИХА	
	Положительный	Отрицательный
Ротавирус+ ($n=67$)	67	0
Аденовирус+ ($n=12$)	0	12
Норовирус+ ($n=26$)	0	26
Здоровые ($n=30$)	0	30

Примечание. n – число обследуемых.

В результате исследований с СОП_{ротавир}⁺ и клиническими образцами показана 100% клиническая чувствительность и специфичность результатов исследований в ИХА с разработанным тест-набором.

Применение разработанного ИХА теста для определения ротавируса в пробах воды. Оценена эффективность сорбции 4-х различных видов микропористых мембран (ФМПА - фильтр мембранный полиамидный, ПЭС - фильтр из полиэфирсульфона, Капрон⁺_{экспер} - экспериментальный фильтр из капрона с положительным зарядом мембраны и ФМСЕ - фильтр мембранный из смеси эфиров целлюлозы) по отношению к ротавирусам в исследуемых объёмах проб воды из природных источников при вирусной нагрузке 10^8 вирионов на мембрану (табл. 3).

В лунки маркированных тест-кассет, предназначенные для исследуемых образцов, вносили по 2 капли (80 мкл) проб элюатов, полученных при смывании с соответствующих типов фильтров ранее описанным способом. Результаты исследования в ИХА визуально оценивали через 5-10 минут, но не позднее 15-ти минут после внесения пробы.

Подготовка проб воды. Растворы с содержанием ротавирусов в концентрации 10^8 вирионов в 1 мл готовили на дистиллированной воде.

Для сорбции и концентрирования вирусов из модельных растворов применены фильтровальные установки и мелкопористые мембраны с разным принципом (механизмом) сорбции: фильтр мембранный полиамидный (ФМПА, величина калиброванных пор - 0,2 мкм); фильтр из полиэфирсульфона (ПЭС, 0,2 мкм); экспериментальный фильтр из капрона с положительным зарядом мембраны (Капрон⁺_{экспер}) и фильтр мембранный, смесь эфиров целлюлозы (ФМСЕ, 0,22 мкм).

Равные объёмы модельных растворов пропускали через мембранные фильтры с целью сорбции и концентрирования ротавирусов. Затем элюентом (3% бифэкстракт на трис-буфере с рН 9,1–9,5) двукратно по 10 мл в течение нескольких минут проводили механический смыв сорбированных патогенов с поверхности мембраны; рН полученного элюата доводили до 7,0–7,5 1,0 N раствором соляной кислоты.

Исходя из данных концентрации вируса, обнаруживаемых в фильтрате воды после прохождения через мембраны ФМПА, ПЭС, Капрон⁺_{экспер}, можно сделать вывод что эффективность сорбции выше при использовании мембран Капрон⁺_{экспер} (табл. 3).

Эффективность элюции определяли расчётным методом с учётом содержания ротавирусов в элюатах.

Таблица 3

Эффективность сорбции и элюции различных микропористых мембран по отношению к ротавирусам в исследуемых объёмах воды с нагрузкой 10^8 вирионов на мембрану

Материал мембран	Концентрация в фильтрате	Эффектив-ность сорбции, %	Количество вирионов на мембране после сорбции	Количество вирионов в элюате (в 1 мл)	Эффектив-ность элюции, %
ФМПА-0,2 мкм	не $<10^6$	94,5 \pm 4,5	10^8	не $<1,5 \times 10^6$	16,2
ПЭС-0,2 мкм	не $<5 \times 10^7$	65 \pm 15	не $<5 \times 10^7$	не $<2 \times 10^6$	40
Капрон ⁺ _{экспер}	не $<10^6$	99	10^8	10^7	100
ФМСЕ-0,22 мкм	не $<2 \times 10^6$	80	не $<80 \times 10^6$	не $<10^6$	1,2

Максимальная эффективность элюции наблюдалась при использовании мембранных фильтров Капрон⁺_{экспер}. Эффективность сорбции ротавирусов фильтрующи-

ми мембранами и их элюции с фильтрующих мембран в исследуемых объёмах воды с нагрузкой 10^8 вирионов на мембрану представлена на рис. 3.

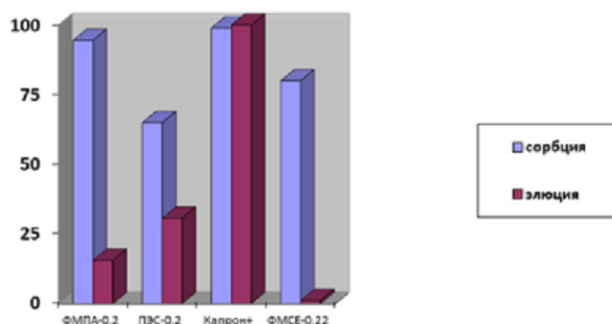


Рис. 3. Эффективность сорбции и элюции изучаемых фильтрующих мембран.

На следующем этапе использованы разработанные нами иммунохроматографические тест-системы для детекции ротавируса в образцах воды. Элюат искусственно контаминировали ротавирусным антигеном. Постановку ИХА проводили согласно инструкции по

применению к набору реагентов. По истечении 5 минут на всех кассетах, куда был внесён образец, появилась цветная тестовая полоса, что детектируется как положительный результат. Через 10 минут результат стал более явным (рис. 4).



Рис. 4. ИХА тестирование элюатов воды, контаминированных ротавирусами «ИХА-Ротавир» (через 10 минут).

Заключение. АО «ЭКОлаб» разработаны экспериментально-производственные образцы иммунохроматографического набора реагентов «ИХА-Ротавир» с аналитической чувствительностью 3 нг/мл. В испытаниях с СОП+ и клиническими образцами показана высокая диагностическая эффективность результатов исследований с разработанной тест-системой «ИХА-Ротавир»: специфичность и чувствительность по 100%. При сравнительных испытаниях фильтрующих мембран 4 видов (ФМПА, ПЭС, Капрон+^{экспер.} и ФМСЭ) с целью сорбции и концентрации энтеровирусов из проб модельных растворов лучшие показатели сорбции и последующей элюции получены с мембранами Капрон+^{экспер.}. Тестирование с «ИХА-Ротавир» элюатов, контаминированных ротавирусами, показывает положительный результат уже через 5 минут после внесения образца в лунку, через 10 минут результат становится более выраженным.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 5-9 см. REFERENCES)

2. В.В. Малышев, Т.А. Змеева, В.Б. Сбойчаков, С.С. Котов. Мембранные технологии в пробоподготовке и детекции кишечных вирусов в водных объектах. *Санитарный врач*. 2016; 28-35.
3. В.В. Малышев, Т.А. Змеева, Т.В. Носкова. Качество воды и заболеваемость острыми кишечными вирусными инфекциями детей и взрослых в России. *Инфекция и иммунитет*. 2016; 6(3): 269.
10. Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В., Помазанов В.В., Киселева В.А. О количественном определении D-димера в крови иммунохроматографическим методом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67(2): 91-6.
11. Акиншина Ю.А., Марданлы С.С., Киселева В.А. Иммунохроматографический тест для дифференцированного выявления антител классов М и G к коронавирусу SARS-COV-2. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(11): 688-92.
12. Никитина А.В., Акиншина Ю.А., Нищаква Н.Е., Амелина Е.А., Марданлы С.Г. Иммунохроматографический тест для выявления скрытой крови в кале. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(9): 536-40.
13. Никитина А.В., Амелина Е.А., Марданлы С.Г. Иммунохроматографический тест для определения D-димера. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(11): 654-8.

REFERENCES

1. Abuelyazeed A. Elsheik, Walid A. Azab, Abdulrahman M Al-Qurashi, Shima M.G. Mansour Rotavirus and adenovirus in human and animals in Southwest of Saudi Arabia. *J. of American Science*. 2012; 8(2): 489-93.
2. Malyshev V.V., Zmeeva T.A., Sboychakov V.B., Kotov S.S.. Membrane technologies in sample preparation and detection of intestinal viruses in water bodies. *Sanitarnyi vrach*. 2016; 28-35. (in Russian)
3. Malyshev V.V., Zmeeva T.A., Noskov T.V.. Water quality and incidence of acute intestinal viral infections in children and adults in Russia. *Infektsiya i immunitet*. 2016; 6(3): 269. (in Russian)
4. Kuruvilla S., Schweitzer J., Black R.E., Cousins S., Johnson H.L., Johnson H.L. et al. Global, regional and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet*. 2010; 375: 1969-87. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60549-1 PMID: 20466419.
5. Bassani D.G., Kumar R., Awasthi S., Morris S.K., Paul V., et al. Million Death Study Collaborators, Causes of neonatal and child mortality in India: a nationally representative mortality survey. *Lancet*. 2010; 376: 1853-60. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61461-4 PMID: 21075444.
6. Parashar U.D., Burton A., Lanata C., Boschi-Pinto C., Shibuya K., Steele D. et al. Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *J. Infect. Dis*. 2009; 200: 9-15. DOI: 10.1086/605025 PMID: 19817620.
7. Parashar U.D., Hummelman E.G., Bresee J.S., Miller M.A., Glass R.I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis*. 2003; 9: 565-72. DOI: 10.3201/eid0905.020562 PMID: 12737740.
8. Interventions to address deaths from childhood pneumonia and diarrhea equitable: what works and at what cost? *Lancet*. 2013; 381: 1417-29.
9. Akinshina Yu.A., Mardany S.G., Rotanov S.V., Pomazanov V.V., Kiseleva V.A. On the quantitative determination of D-dimer in the blood by the immunochromatographic method. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67(2): 91-6. (in Russian)
10. Akinshina Yu.A., Mardany S.S., Kiseleva V.A. Immunochromatographic test for differential detection of antibodies of classes M and G to SARS-COV-2 coronavirus. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65(11): 688-92. (in Russian)
11. Nikitina A.V., Akinshina Yu.A., Nishchakova N.E., Amelina E.A., Mardany S.G. Immunochromatographic test for the detection of occult blood in the feces. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64(9): 536-40. (in Russian)
12. Akinshina Yu.A., Nikitina A.V., Amelina E.A., Mardany S.G. Immunochromatographic test for the determination of D-dimer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64(11): 654-8. (in Russian)