НАУКА И ПРАКТИКА

Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-620

Получение конъюгатов на основе наночастиц коллоидного золота для быстрого выявления антител к вирусу гепатита Е

Алаторцева Г.И.✉, Нестеренко Л.Н., Амиантова И.И., Притворова Л.Н., Доценко В.В., Зверев В.В., Свитич О.А.

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия

Аннотация

Актуальность. Вирус гепатита Е (ВГЕ) — частая причина вирусных гепатитов не только на территориях с низким уровнем водоснабжения и гигиены, но и в промышленно развитых странах. Важнейшей проблемой совершенствования системы диагностики гепатита Е остаётся разработка тестов быстрого определения серомаркеров инфекции для применения в условиях отсутствия специального оборудования и обученного персонала.

Цель работы — получение конъюгатов наночастиц коллоидного золота (НЧЗ) нескольких размеров с рекомбинантным антигеном ORF2 ВГЕ 3-го генотипа и оценка возможности их применения в иммуноанализе для выявления антител к ВГЕ.

Материалы и методы. Исследовали специфические поликлональные и моноклональные антитела, рекомбинантный антиген ORF2 ВГЕ 3-го генотипа, образцы сывороток крови людей с диагнозом острого гепатита. Осуществляли синтез НЧЗ и их конъюгатов с рекомбинантным антигеном, иммуноферментный анализ, дот-иммуноанализ, иммунохроматографический анализ, использовали метод просвечивающей электронной микроскопии.

Результаты. Цитратным методом с использованием различных концентраций восстановителя синтезированы 3 препарата НЧЗ. На их основе получены конъюгаты с рекомбинантным антигеном ORF2 ВГЕ 3-го генотипа, иммунореактивность которых подтверждена методом дот-иммуноанализа с образцами сывороток крови, содержащими специфические иммуноглобулины класса G (IgG). Для применения в иммунохроматографическом анализе отобран конъюгат на основе НЧЗ диаметром 41 нм. Отработаны условия получения мультимембранного композита, включая формирование аналитической и контрольной линий и зоны конъюгата, изготовлены тест-полоски и проведены испытания полученного конъюгата методом иммунохроматографического анализа с образцами сывороток крови, предварительно охарактеризованными по содержанию IgG-антител к ВГЕ. Показана высокая иммунореактивность полученного конъюгата: антитела к вирусу выявлены в 100% обследованных IgG-положительных проб сывороток (n = 17) и не обнаружены в отрицательных пробах (n = 17).

Выводы. Получены иммунореагенты (рекомбинантный антиген, антитела, конъюгат), которые могут быть использованы при создании тест-систем для экспресс-диагностики ВГЕ.

Ключевые слова: *иммунохроматографический анализ, наночастицы коллоидного золота, рекомбинантный антиген, вирус гепатита Е, белок ORF2, иммуноглобулины класса G*

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов или их законных представителей. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Локальным советом по этике НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 4 от 22.02.2023).

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (уникальный идентификатор проекта RFMEFI61319X0091). Авторы благодарят Олега Лебедева (Laboratoire CRISMAT, ENSICAEN-CNRS UMR6508, Caen, France) за помощь в изучении структуры НЧЗ методом трансмиссионной электронной микроскопии, Национальный институт общественного здоровья МЗ КР и Белорусский государственный медицинский университет за предоставление образцов сывороток крови, содержащих и не содержащих серомаркеры инфицирования вирусом гепатита Е.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Алаторцева Г.И., Нестеренко Л.Н., Амиантова И.И., Притворова Л.Н., Доценко В.В., Зверев В.В., Свитич О.А. Получение конъюгатов на основе наночастиц коллоидного золота для быстрого выявления антител к вирусу гепатита Е. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(1):7–17. DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-620
EDN: https://www.elibrary.ru/ppmxde

© Алаторцева Г.И., Нестеренко Л.Н., Амиантова И.И., Притворова Л.Н., Доценко В.В., Зверев В.В., Свитич О.А., 2025

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(1)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-620
ORIGINAL RESEARCHES

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-620

Preparation of conjugates based on colloidal gold nanoparticles for application in rapid detection of antibodies to hepatitis E virus

Galina I. Alatortseva✉, Lyubov N. Nesterenko, Irina I. Amiantova, Lyudmila N. Pritvorova, Vera V. Dotsenko, Vitaly V. Zverev, Oksana A. Svitich

I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera, Moscow, Russia

Abstract

Relevance. Hepatitis E virus (HEV) is a common cause of viral hepatitis not only in areas with low levels of water supply and hygiene, but also in industrialized countries. Rapid tests development for the infection seromarkers detection in the absence of special equipment and trained staff remains the most important problem in improving the diagnosis of hepatitis E.

Aim. To produce conjugates of recombinant ORF2 antigen of HEV genotype 3 with gold nanoparticles (GNP) of varied sizes and to evaluate their applicability in the immunoassay for the detection of antibodies to HEV.

Materials and methods. Specific polyclonal and monoclonal antibodies, recombinant antigen ORF2 of hepatitis E virus genotype 3, blood serum samples of people diagnosed with acute hepatitis. Synthesis of GNPs and their conjugates with recombinant antigen, enzyme immunoassay, dot immunoassay, immunochromatographic analysis, transmission electron microscopy.

Results. Three samples of colloidal GNP were synthesized using citrate method with varied concentrations of reducing agent and were subsequently used for preparation of conjugates with recombinant antigen ORF2 of HEV genotype 3. Immunoreactivity of these conjugates was confirmed by dot-immunoassay with blood serum samples containing specific IgG. A conjugate based on a 41 nm GNP was chosen for use in immunochromatographic analysis (ICA). Optimal conditions for preparation of a multi-membrane composite, including formation of analytical and control lines and the conjugate area were identified, and test strips were developed. The obtained conjugate was tested by ICA using blood serum samples which had been subjected to preliminarily characterization by the content of the IgG antibody to HEV. High immunoreactivity of the conjugate was demonstrated. Antibodies to the virus were identified in 100% of the examined (n = 17) IgG-positive serum samples, while in negative samples (n = 17) they were absent.

Conclusion. The results demonstrated effectiveness of the obtained immunoreagents (recombinant antigen, antibodies, conjugate) for use in test-systems for rapid diagnosis of hepatitis E.

Keywords: *immunochromatographic assay, colloidal gold nanoparticles, recombinant antigen, hepatitis E virus, protein ORF2, IgG*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients or their legal representatives. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July, 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera (protocol No. 4, February 22, 2023).

Acknowledgement. The work was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (unique project identifier RFMEFI61319X0091). The authors thank Oleg Lebedev (Laboratoire CRISMAT, ENSICAEN-CNRS UMR6508, Caen, France) for his help in the HEV structure studying using transmission electron microscopy, the National Institute of Public Health of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic and the Belarusian State Medical University for providing blood sera samples containing and not containing serological markers of HEV infection.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Alatortseva G.I., Nesterenko L.N., Amiantova I.I., Pritvorova L.N., Dotsenko V.V., Zverev V.V., Svitich O.A. Preparation of conjugates based on colloidal gold nanoparticles for application in rapid detection of antibodies to hepatitis E virus. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(1):7–17.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-620
EDN: https://www.elibrary.ru/ppmxde

Введение

Вирус гепатита Е (ВГЕ) — частая причина вирусных гепатитов не только на территориях с низким уровнем водоснабжения и гигиены, но и в промышленно развитых странах [1]. Европейская ассоциация по изучению печени рекомендует следующие критерии для клинической диагностики случаев острого гепатита Е (ГЕ): одновременное присутствие в анализируемых пробах РНК ВГЕ и специфических IgM- и/или IgG-антител (IgM-АТ,

© Alatortseva G.I., Nesterenko L.N., Amiantova I.I., Pritvorova L.N., Dotsenko V.V., Zverev V.V., Svitich O.A., 2025

IgG-АТ), повышение титров IgG-АТ на фоне присутствия IgM-АТ, выявление антигена (АГ) ВГЕ. Диагноз хронического ГЕ подтверждается обнаружением РНК ВГЕ и/или АГ-ВГЕ в течение более 3 мес. О перенесённой инфекции судят по присутствию в образцах специфических IgG [2]. Золотым стандартом диагностики острых и хронических случаев ГЕ остаётся полимеразная цепная реакция, позволяющая определять вирусную РНК на самых ранних стадиях заболевания и при отсутствии специфических антител у пациентов с иммунодефицитом при хроническом ГЕ. В ряде случаев более надёжными и специфичными являются серологические методы диагностики ГЕ [3], которые из-за короткого периода вирусемии при ГЕ в большинстве случаев не имеют альтернативы [4]. У каждого традиционно применяемого метода серодиагностики ГЕ есть ограничения, затрудняющие точное определение стадии заболевания. Из-за трудностей, связанных с культивированием вируса, в тест-системах для диагностики ГЕ используют в основном рекомбинантные АГ, реже — синтетические пептиды.

Проблему ускоренного получения результатов предварительной лабораторной диагностики ГЕ решает использование экспресс-тестов для выявления специфических IgG-, IgM-, суммарных АТ и АГ-ВГЕ. Как правило, такие тесты основаны на методе иммунохроматографического анализа (ИХА) с применением коллоидного золота, конъюгированного с рекомбинантными АГ или АТ к вирусным белкам и/или иммуноглобулинам человека или животных. Наряду с ускоренным проведением анализа (15 мин), большим преимуществом метода является возможность тестирования у постели больного в отсутствие специального оборудования и обученного персонала. Разработанные и выпускаемые зарубежными компаниями тест-системы в формате ИХА для выявления АГ-ВГЕ и АТ к нему показали хорошую воспроизводимость при достаточно высоких показателях чувствительности, специфичности и хорошей согласованности результатов с данными, полученными с помощью классического иммуноферментного анализа (ИФА). Ряд сравнительных испытаний показал, что ИХА-тесты для выявления IgM-АТ к ВГЕ, производимые в Китае («IgM antibody to hepatitis E virus (HEV-IgM) rapid test», «Wantai», кат № WJ-15) и Сингапуре («MP Diagnostics ASSURE HEV IgM Rapid Test», «MP Biomedicals Asia Pacific Pte. Ltd.», кат. № 43160-020), обладают даже более высокой чувствительностью, чем некоторые традиционные ИФА-тесты [5]. Канадские компании «Citest Diagnostics Inc.» и «BiogateLabs» выпускают иммунохроматографические тест-системы для одновременного определения IgG- и IgM-АТ к ВГЕ (кат № IHE-302, кат № RT-EV1112-C-1 соответственно) в сыворотке, плазме и цельной крови. В России и странах постсоветского пространства тест-системы для быстрого выявления серологических маркеров ГЕ методом ИХА не производятся, нет также сообщений о проводимых в этом направлении исследованиях.

Ключевыми компонентами диагностических экспресс-тестов, предназначенных для выявления серологических или биохимических маркеров различных заболеваний, наряду со специфическими АГ или АТ, являются конъюгаты коллоидных наночастиц с биологическими макромолекулами, применение которых позволяет проводить визуальный или цифровой учёт результатов реакции [6–9]. Известно, что уникальные оптические свойства наночастиц золота (НЧЗ) обусловлены явлением поверхностного плазмонного резонанса, что проявляется интенсивной полосой поглощения в видимой области спектра. Пики поглощения поверхностных плазмонов наблюдаются у синтезированных НЧЗ в области длин волн около 520 нм в зависимости от размера синтезированных НЧЗ [10]. К преимуществам применения конъюгатов на основе НЧЗ в методах экспресс-диагностики можно отнести возможность визуальной детекции результатов, что связано с высокими молярными коэффициентами поглощения [9, 11], а также их способность к полному восстановлению свойств после сорбции на мембране и последующего её высушивания [12, 13]. Диагностическая эффективность ИХА-тестов определяется способностью конъюгата НЧЗ специфически взаимодействовать с молекулами-мишенями, которая, с одной стороны, связана с физико-химическими свойствами НЧЗ, в частности, с их размером и формой, а с другой — с антигенной специфичностью сорбированных на них белков, выполняющих дополнительную функцию вторичной стабилизации коллоидных частиц в составе конъюгатов.

Все тест-системы для выявления АТ к ВГЕ основаны на применении в качестве антигенной основы капсидного белка ORF2, содержащего диагностически значимые эпитопы. Ранее нами был получен [14] рекомбинантный АГ (рекАГ) ORF2 ВГЕ 3-го генотипа, имеющего наиболее широкое географическое распространение в мире [15, 16] и доминирующего на территории России [17]. Данный рекАГ выбран нами в качестве основы для последующей разработки экспресс-теста для одновременного определения антител IgG и IgM к ВГЕ.

Цель данного исследования — получение конъюгатов НЧЗ нескольких размеров с рекАГ и оценка возможности их применения в иммуноанализе для выявления IgG-антител к ВГЕ.

Материалы и методы

Иммунореагенты

Использовали поликлональные АТ козы против IgG человека (GAHIss; «Имтек»), рекАГ ORF2 ВГЕ

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(1)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-620

3-го генотипа (НИИВС им. И.И. Мечникова) [18], поликлональные IgG-АТ кролика к рекАГ, полученные путём иммунизации кроликов и последующей аффинной очистки (НИИВС им. И.И. Мечникова); конъюгат моноклональных АТ мыши к рекАГ с пероксидазой хрена (НИИВС им. И.И. Мечникова), полученный методом перйодатного окисления [19].

Сыворотки крови людей с диагнозом острого вирусного ГЕ были предоставлены Национальным институтом общественного здоровья Министерства здравоохранения Киргизской Республики и Белорусским государственным медицинским университетом. По результатам тестирования в наборе реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы») [20, 21] и разработанном в НИИВС им. И.И. Мечникова подтверждающем тесте для определения IgG-АТ к ВГЕ методом лайн-блота [22] сыворотки содержали (n = 17) и не содержали (n = 17) IgG-АТ к ВГЕ.

Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов или их законных представителей. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Локальным советом по этике НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 4 от 22.02.2023).

Растворы наночастиц золота

НЧЗ с заданным размером частиц получали цитратным методом, используя в качестве прекурсора золотохлороводородную кислоту $HAuCl_4 \times 3H_2O$ («Aldrich») [11–13]. Учитывая, что средний диаметр частиц уменьшается при увеличении концентрации цитрата в реакционной смеси [12], для получения препаратов НЧЗ с разными размерами частиц использовали различные количества восстановителя. К 99 мл деионизированной воды добавляли 1 мл 1% раствора $HAuCl_4 \times 3H_2O$, раствор при перемешивании нагревали до кипения, после чего добавляли различные объёмы 1% водного раствора цитрата натрия $C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$ («Merck»).

Раствор кипятили с обратным холодильником 20 мин при перемешивании, затем охлаждали до комнатной температуры и измеряли спектры поглощения в диапазоне длин волн 400–700 нм с помощью планшетного спектрофотометра «Multiskan GO» («Thermo Scientific»). Структуру НЧЗ исследовали на растровом просвечивающем электронном микроскопе «JEOL JEM ARM200F» атомного разрешения (HAADF-STEM), оснащённом системой энергодисперсионного анализа на основе спектрометра «GIF Quantum» с детектором «CENTURIO EDX» разрешающей способности 0,08 нм при ускоряющем напряжении 200 кВ в STEM-режиме («Jeol») [23, 24]. Препараты для исследования готовили путём нанесения образца, предварительно разбавленного до поглощения 1,0 опт. ед. при длине волны 520 нм, на покрытые плёнкой углерода медные сетки.

Синтез конъюгатов

Оптимальные условия получения конъюгатов НЧЗ с рекАГ подбирали в соответствии с рекомендациями [25, 26]. В лунки 1–11 вертикальных рядов 96-луночного полистиролового планшета («Greiner») вносили по 10 мкл раствора рекАГ с концентрацией 1–50 мкг/мл в фосфатном буфере. Затем в лунки А–Н горизонтальных рядов планшета вносили по 100 мкл растворов НЧЗ с pH 5,5–9,0 таким образом, чтобы каждый столбец соответствовал определённой концентрации рекАГ, а каждый ряд — значению pH раствора. Через 15 мин во все лунки добавляли по 20 мкл 10% раствора NaCl и спустя 10 мин измеряли оптическое поглощение растворов при длинах волн 520 и 580 нм (A_{520}, A_{580}). Стабилизирующую концентрацию рекАГ оценивали по разности «$A_{520} - A_{580}$» [25].

Конъюгаты НЧЗ с рекАГ получали, добавляя по каплям 10 мл раствора НЧЗ с pH 8,0 к раствору рекАГ до концентрации рекАГ 25 мкг/мл для НЧЗ-1, до 30 мкг/мл для НЧЗ-2 и до 40 мкг/мл для НЧЗ-3. Далее смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 30 мин на приборе «Multi-Reax» («Heildorf»), вносили 10% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА; «Sigma») до конечной концентрации 0,25% и инкубировали 15 мин в прежних условиях. Затем раствор центрифугировали 30 мин при 4ºС и скорости 8–11 тыс. об/мин в зависимости от размера НЧЗ. Осадок суспендировали в 1 мл фосфатного буфера с 0,1% БСА, 10% сахарозы и 0,01% азида натрия и регистрировали спектры поглощения. Полученные конъюгаты НЧЗ с рекАГ хранили при 4ºС.

Результат посадки рекАГ на поверхность НЧЗ контролировали методом ИФА [25]. В лунках планшета сорбировали поликлональные IgG-АТ кролика к рекАГ в концентрации 5 мкг/мл в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере pH 9,6. Блокировку планшета осуществляли раствором 0,02 М фосфатно-солевого буфера pH 7,2 с 0,05% Твин-20 с 5% сахарозы, 0,09% казеината натрия. В лунки вносили по 100 мкл супернатантов, полученных после центрифугирования конъюгатов НЧЗ с рекАГ. В качестве конъюгата в ИФА использовали меченные пероксидазой хрена моноклональные АТ, в качестве хромогена — 0,5 мМ раствор 3,3’,5,5’-тетраметилбензидина. Калибровочные образцы представляли собой серию разведений рекАГ (5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,31, 0,15 мкг/мл) в надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования раствора коллоидного золота. Концентрацию рекАГ в исследуемых образцах определяли по калибро-

вочному графику зависимости значений оптической плотности при длине волны 450 нм от концентраций рекАГ в калибровочных образцах.

Реакция дот-иммуноанализа

Для проведения дот-иммуноанализа в сэндвич-формате на дисках нитроцеллюлозной мембраны (0,45 мкм) диаметром 13 мм сорбировали АТ в количестве 0,1; 0,05; 0,025 и 0,0125 мкг, в качестве отрицательного контроля наносили 0,1 мкг раствора БСА в 0,02 М фосфатно-солевом буфере pH 7,2. Свободные участки мембран блокировали 0,09% раствором казеината натрия в фосфатно-солевом буфере. Мембраны инкубировали с сывороткой, содержащей специфические IgG-АТ, в течение 1 ч в термошейкере («Eppendorf») при 37ºС, затем 30 мин — с растворами конъюгатов НЧЗ с рекАГ (A_{520} = 0,5 ед. опт. пл.) при комнатной температуре. Интенсивность окрашивания опытных и контрольных пятен на мембранах оценивали визуально.

Иммунохроматографический анализ

Растворы антител наносили на мембраны для иммунохроматографии с помощью автоматического диспенсера «IsoFlow» («Imagene Technology»): поликлональные IgG-АТ кролика к рекАГ — в контрольной зоне, АТ — в аналитической (тестовой) зоне, — со скоростью 0,2 мкл на 1 мм длины мембраны. На стекловолоконной мембране сорбировали конъюгат НЧЗ с рекАГ в оптимальной концентрации A_{520} = 4 ед. опт. пл., которую определили, меняя разведения конъюгатов в интервале значений A_{520} = 2–8 ед. опт. пл. на 3 положительных образцах сывороток для каждого разведения.

Сборку мультимембранного композита и нарезку тест-полосок осуществляли с помощью ручного ламинатора «MTB 300» («Kinbio Tech Co. Ltd.») и резака гильотинного типа «Cutter ZQ2002» («Kinbio Tech Co. Ltd.»). При проведении ИХА 20 мкл сыворотки крови наносили на участок иммунохроматографической тест-полоски для образца, далее край полосы опускали в 80 мкл фосфатно-солевого буфера, через 2–3 мин тест-полоску выкладывали на горизонтальную поверхность и через 15 мин оценивали результат, который учитывали как положительный при окрашивании любой интенсивности контрольной и аналитической зон и как отрицательный при отсутствии окрашивания аналитической зоны. В случае отсутствия окрашивания контрольной зоны результат не учитывали.

Для цифровой оценки результатов анализа тест-полоски сканировали на приборе «Gel Doc XR» («Bio-Rad») с программным обеспечением «Image Lab Software». Коэффициент позитивности (КП) рассчитывали по отношению интенсивности окрашивания аналитической зоны к фоновому окрашиванию тест-полоски.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ R и «MS Excel 2013».

Результаты

Методы получения коллоидного золота описаны в научной литературе достаточно подробно [11, 26–29]. С учётом приведённых рекомендаций, опирающихся в основном на модификации цитратного метода Френса, для получения НЧЗ диаметром 15–40 нм, оптимальным для эффективной сорбции антител, были синтезированы препараты НЧЗ со средним размером частиц 16 нм (НЧЗ-1), 25 нм (НЧЗ-2) и 41 нм (НЧЗ-3). Синтез НЧЗ проводили, добавляя в реакционную среду (к 50 мл 0,01% $HAuCl_4 \times 3H_2O$) 1% раствор цитрата натрия в объёме 1, 0,75 и 0,5 мл. На магнитной мешалке устанавливали температуру 300ºС и режим перемешивания 375 об/мин, скорость перемешивания усиливали до 500 об/мин при появлении красного окрашивания [27]. Избыток цитрат-анионов на поверхности НЧЗ стабилизирует золь золота, не препятствуя в дальнейшем взаимодействию НЧЗ с макромолекулами белка при получении иммунометрических конъюгатов. Проверка стабильности коллоидных растворов показала, что они сохраняли свои характеристики при хранении в темноте при 4ºС в течение не менее 6 мес.

Важными характеристиками НЧЗ являются положение и конфигурация полосы поверхностного плазмонного резонанса, поэтому для всех препаратов НЧЗ исследовали спектры поглощения (**рис. 1**). Увеличение размера частиц сопровождалось ростом интенсивности окрашивания растворов и смещением максимума поглощения в область более длинных волн: для НЧЗ-1 — 518 нм; НЧЗ-2 — 522 нм; НЧЗ-3 — 528 нм.

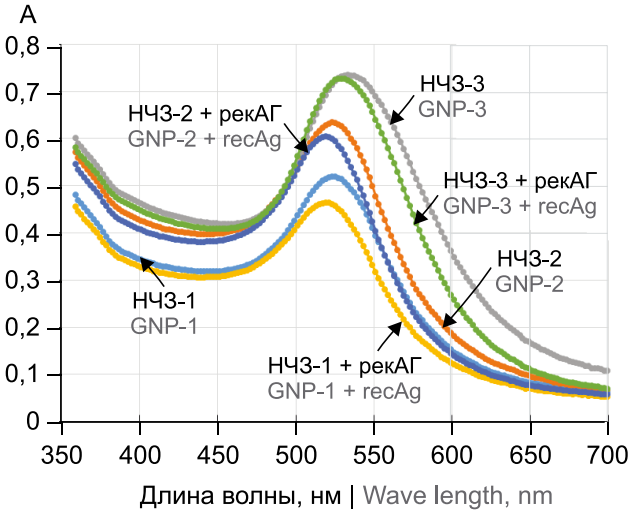

Рис. 1. Спектры поглощения растворов НЧЗ-1, НЧЗ-2, НЧЗ-3 и их конъюгатов с рекАГ.

Fig. 1. Absorption spectra of GNP-1, GNP-2, GNP-3 solutions and their conjugates with recAg.

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(1)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-620

Средний размер и форму НЧЗ оценивали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (**рис. 2**). На снимках с высоким разрешением заметна относительная гомогенность частиц по форме и размерам в каждой группе. Более мелкие частицы имеют преимущественно сферическую форму, в препарате образца НЧЗ-3 отмечается присутствие наночастиц, отклоняющихся по форме от правильной сферической, что согласуется с классификацией строения наночастиц в зависимости от их размера [30].

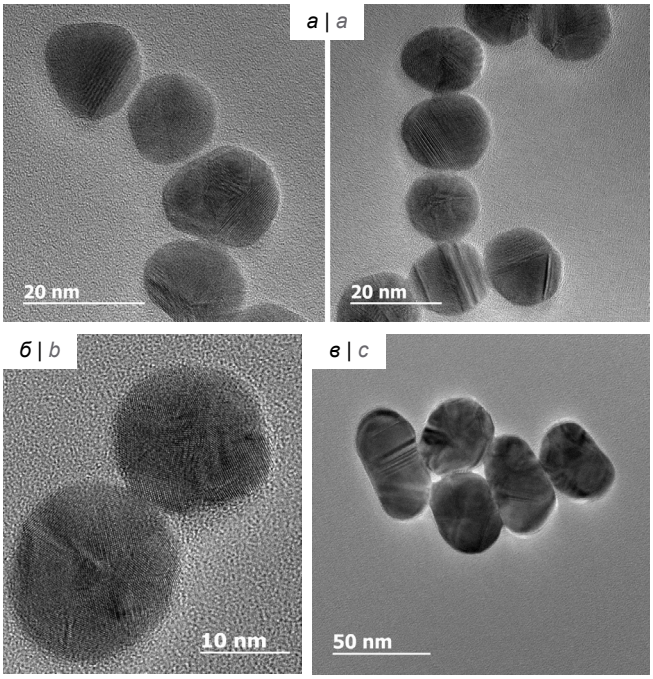

Рис. 2. Фотографии НЧЗ, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии.
а — НЧЗ-1; *б* — НЧЗ-2; *в* — НЧЗ-3.

Fig. 2. Photographs of GNP obtained by means of TEM.
a — GNP-1; *b* — GNP-2; *c* — GNP-3.

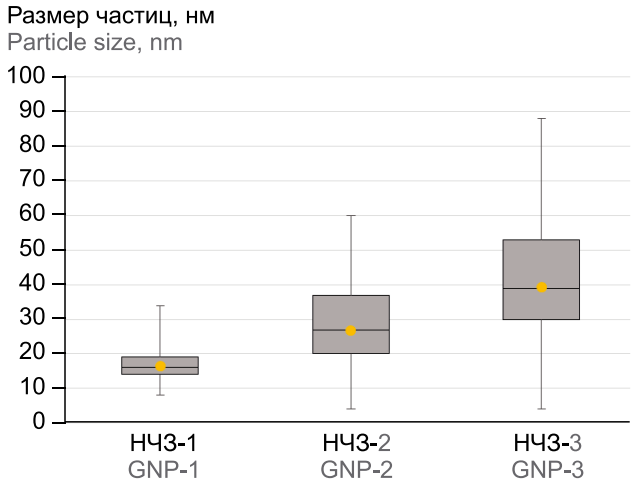

Рис. 3. Распределение НЧЗ-1, НЧЗ-2 и НЧЗ-3 по размерам (функции Box Plot).

Fig. 3. Size distribution diagrams for GNP-1, GNP-2, and GNP-3 (Box Plot functions).

Величина среднего размера частиц, оцененная с помощью просвечивающей электронной микроскопии, составила 16, 25 и 41 нм для НЧЗ-1, НЧЗ-2 и НЧЗ-3 соответственно, что хорошо согласовывалось со значениями, заданным условиями синтеза, и свидетельствовало о высокой технологичности и воспроизводимости использованного метода.

Настоящее исследование ограничивалось получением НЧЗ трех размеров с целью сопоставления результатов с данными, приведёнными в литературе [31–33].

Три группы НЧЗ были охарактеризованы с использованием пакета программ R с построением диаграмм размаха (функции Box Plot) (**рис. 3**). Степень дисперсии максимальна для частиц самого большого размера НЧЗ-3 (30–56 нм). Для НЧЗ-1 разброс минимален (14–18 нм), размеры для НЧЗ-2 находились в интервале 20–37 нм. Количественные данные проверяли на соответствие закону нормального распределения по критерию W Шапиро–Уилка ($p \leq 0{,}05$) и положению медиан для НЧЗ-1, НЧЗ-2 и НЧЗ-3. Для всех препаратов НЧЗ распределение размеров немного отличалось от нормального.

Получение маркеров на основе НЧЗ для использования в ИХА чаще всего базируется на нековалентной (адсорбционной) конъюгации белков с поверхностью наночастиц в связи с технологической простотой данного подхода, а также с сохранением нативной структуры и свойств макромолекул в составе получаемых комплексов, в частности, их иммунореактивности [27, 34, 35]. Нековалентные связи при этом образуются за счёт электростатических взаимодействий между отрицательно заряженной наночастицей и положительно заряженными участками на поверхности белка, гидрофобных притяжений между белком и поверхностью металла, донорно-акцепторных взаимодействий между металлом и электронами атомов азота и серы в составе белка [26]. Образование комплексов НЧЗ с белками сопровождается формированием стабилизирующей белковой оболочки вокруг них, что неоднократно подтверждено экспериментально [35, 36]. В настоящей работе для получения конъюгатов препаратов НЧЗ с рекАГ также была использована методика пассивной иммобилизации.

С целью получения устойчивого золя были оптимизированы условия адсорбции рекАГ на поверхности НЧЗ с учётом физико-химических свойств белка: молекулярной массы, растворимости, изоэлектрической точки (pI = 5,43) и концентрации, стабилизирующей коллоидную систему. Стабилизирующую концентрацию белка определяли в интервале значений pH 5,5–9,0 для НЧЗ всех трех размеров. На **рис. 4** в качестве примера представлены кривые зависимости показателя

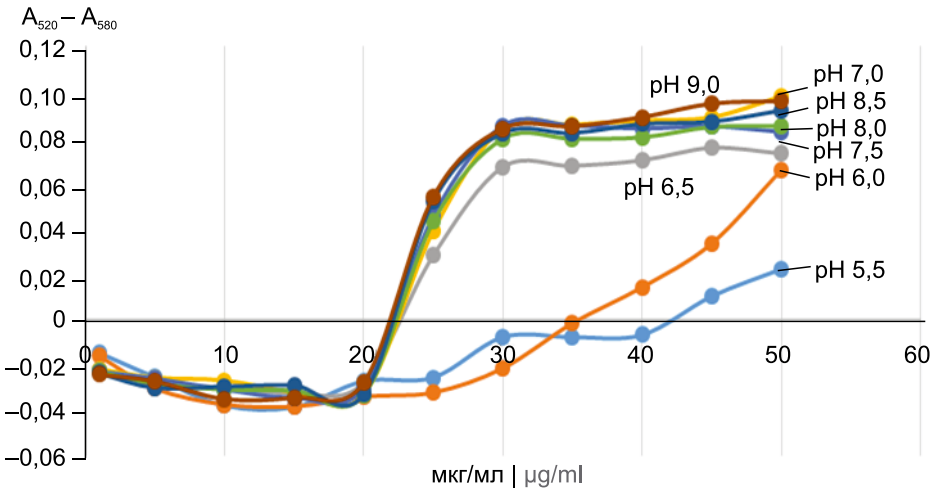

Рис. 4. Зависимость разности оптического поглощения $A_{520} – A_{580}$ раствора НЧЗ-2 (25 нм) от концентрации рекАГ при разных значениях pH раствора.

Fig. 4. Dependence between the optical absorption difference $A_{520} – A_{580}$ of the GNP-2 solution (25 nm) and the concentration of recAg at different pH values of the solution.

$A_{520} – A_{580}$ от концентрации белка при различных значениях pH для НЧЗ-2.

Добавление NaCl в растворы НЧЗ с низкими концентрациями рекАГ приводило к агрегации нестабилизированных белком НЧЗ, что отражалось в увеличении поглощения при $\lambda = 580$ нм. При этом происходило изменение окраски раствора с красного на серо-голубой. Достижение стабилизирующих концентраций рекАГ сопровождалось возрастанием и далее сохранением величины показателя $A_{520} – A_{580}$, стабильностью золя и цвета раствора в присутствии электролита.

В кислой среде система была менее стабильна, что, возможно, обусловлено меньшей устойчивостью золей в растворах со значением pH, близким к изоэлектрической точке рекАГ (5,36). При pH ≥ 7 различие между полученными кривыми было незначительно, поэтому синтез конъюгатов НЧЗ с рекАГ проводили при pH = 8. Стабилизирующие концентрации рекАГ определялись значениями, при которых кривые выходили на плато (20 мкг/мл для НЧЗ-1, 25 мкг/мл для НЧЗ-2 и 30 мкг/мл для НЧЗ-3). С увеличением размера НЧЗ концентрация рекАГ, стабилизирующая коллоидную систему, возрастала. В дальнейшем, в соответствии с рекомендациями [34], для получения конъюгатов были использованы концентрации рекАГ, на 10–15% превышающие стабилизирующую.

Результат взаимодействия белка с НЧЗ при получении конъюгатов исследовали, сравнивая спектры поглощения НЧЗ и их конъюгатов с рекАГ. Связывание НЧЗ в растворе с молекулами белка приводит к достаточному для детекции смещению пика поверхностного плазмонного резонанса НЧЗ. Величина этого сдвига обусловлена размером частиц и может быть параметром при оценке связывающей активности адсорбированного белка [35]. В литературе описан метод определения состава конъюгатов НЧЗ с белками, основанный на оценке собственной флуоресценции несвязанных белковых молекул [36]. Белки могут быть по-разному ориентированы на поверхности НЧЗ в зависимости от их размера, что, в свою очередь, может приводить к различной биологической активности конъюгатов, и, таким образом, размер НЧЗ может влиять на реакционную способность адсорбированных белков. На полученных спектрах поглощения растворов конъюгатов НЧЗ с рекАГ максимум поглощения смещён в длинноволновую область, причём более выраженно для НЧЗ меньшего размера (рис. 1). Эффективность связывания макромолекул белка с поверхностью НЧЗ оценивали по остаточному белку в супернатантах после центрифугирования препаратов конъюгатов [25]. Концентрация остаточного белка в надосадочных жидкостях после 2 циклов центрифугирования для НЧЗ-1 в среднем составила 2,0 и 1,0 мкг/мл, для НЧЗ-2 — 3,0 и 0,8 мкг/мл, для НЧЗ-3 — 4,6 и 2,2 мкг/мл. Количество связавшегося рекАГ соответствовало 88% для НЧЗ-1, 87% — для НЧЗ-2, 84% — для НЧЗ-3, что свидетельствовало о высокой эффективности процесса.

Иммунореактивность конъюгатов подтверждали методом дот-иммуноанализа с образцами сывороток крови людей, содержащих IgG-АТ к ВГЕ. На всех мембранах наблюдалось окрашивание пятен с сорбированными АТ, его яркость несколько снижалась при последовательных разведениях сорбированных АТ (0,1; 0,05; 0,025 и 0,0125 мкг). Подтверждена реакционная способность всех полученных конъюгатов и возможность их применения с использованием нитроцеллюлозной мембраны в

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(1)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-620

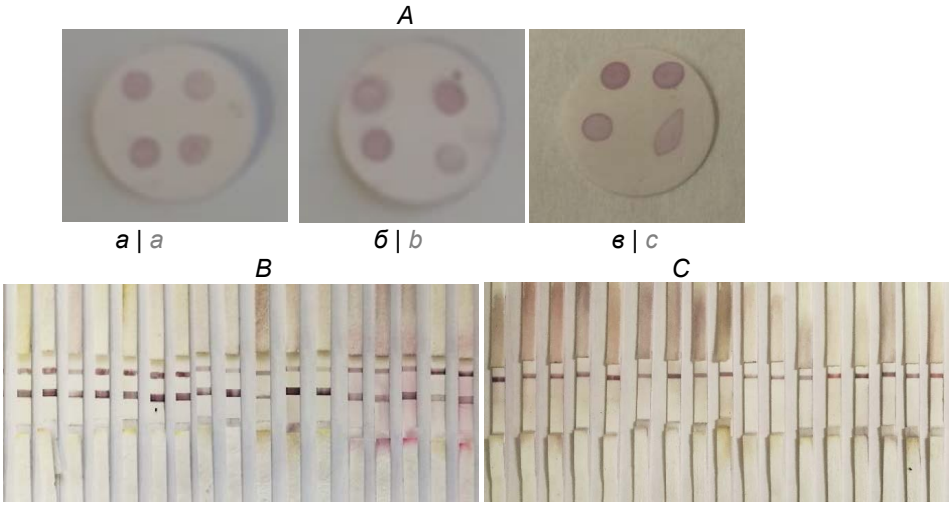

Рис. 5. Результаты дот-иммуноанализа (*А*) с применением конъюгатов НЧЗ с рекАг (*а* — НЧЗ-1; *б* — НЧЗ-2; *в* — НЧЗ-3) и ИХА положительных (*В*) и отрицательных (*С*) образцов сывороток с применением НЧЗ-3, конъюгированных с рекАГ.

Fig. 5. Results of dot immunoassay using (*A*) GNP conjugated with recAg (*a* — GNP-1; *b* — GNP-2; *c* — GNP-3) and immunochromatographic analysis of positive (*B*) and negative (*C*) serum samples using GNP-3 conjugated with recAg.

качестве твёрдой фазы (**рис. 5**). О специфичности конъюгатов свидетельствовало отсутствие окрашивания контрольного антигена (БСА).

Конъюгат НЧЗ-3 с рекАГ, при использовании которого имело место стабильное яркое окрашивание реакционной зоны в дот-иммуноанализе, был выбран для проведения модельных экспериментов по ИХА на положительных (n = 17) и отрицательных (n = 17) образцах сывороток крови, предварительно протестированных методом ИФА, по чувствительности, как правило, превосходящей ИХА. В качестве тест-системы сравнения был выбран набор реагентов «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы») как один из лучших на мировом рынке наборов для диагностики ВГЕ [37].

Предварительно подобраны условия формирования контрольной и аналитической зон тест-полоски: концентрации сорбируемых АТ и поликлональных IgG-АТ кролика к рекАГ, скорости их нанесения и условия высушивания мембран. На основании полученных результатов было выбрано разведение конъюгата с A_{520} = 4, при котором наблюдалось достаточно яркое окрашивание тестовой и контрольной полос и отсутствовало фоновое окрашивание мембраны в реакциях с образцами сывороток крови. При увеличении концентрации АТ в аналитической зоне (0,25; 0,5; 1 мг/мл) и поликлональных IgG-АТ кролика к рекАГ в контрольной зоне (0,5; 1; 2 мг/мл) происходило усиление окрашивания. При концентрациях АТ 0,5 мг/мл и поликлональных IgG-АТ кролика к рекАГ 2 мг/мл наблюдалось достаточное для визуальной детекции окрашивание контрольной и тестовой полос, поэтому они были выбраны как наиболее приемлемые. При этом учитывали, что при значительном увеличении концентрации сорбированных АТ существует вероятность их частичной десорбции и миграции с потоком по мембране [26, 28].

Аналитические характеристики полученных иммунохроматографических тест-полосок оценивали в реакциях с пробами сывороток крови, содержащими (n = 17) и не содержащими (n = 17) IgG-антитела к ВГЕ (**рис. 5**). На 34 исследованных образцах, результаты анализа которых представлены на рис. 5, показана 100% чувствительность и 100% специфичность тест-полосок. Все результаты были разделены на три группы по степени окрашивания аналитической зоны: «1+» (КП = 7,8–15,1; Me = 9,6); «2+» (КП = 26,7–35,1, Me = 31,0); «3+» (КП = 58,3–77,7, Me = 62,8). Для большинства (73%) положительных образцов интенсивность окрашивания составила «2+» и «3+», что соответствовало интенсивности окрашивания, удобной для визуальной детекции.

Обсуждение

ИХА основан на движении аналита вдоль мембраны, которое вызывает образование на определённых участках мембраны специфических иммунокомплексов, регистрируемых по окрашиванию. Наиболее часто в иммунохроматографических тестах применяют конъюгаты антигенов и антител с НЧЗ. Методы получения НЧЗ с различными размерами частиц и синтез на их основе конъюгатов с биологическими макромолекулами достаточно полно представлены в литературе [9, 12, 13]. Поскольку оптические свойства НЧЗ зависят от их размера и формы, в проведённом исследовании были синтезированы НЧЗ нескольких размеров, исследованы их физико-химические свойства, получены на их основе конъюгаты с рекАГ ВГЕ и проведена оценка

реакционной способности полученных конъюгатов в дот-иммуноанализе и ИХА.

С увеличением диаметра частиц максимум поглощения несколько сдвигался в более длинноволновую область (518 и 522 и 528 нм для НЧЗ-1, НЧЗ-2 и НЧЗ-3 соответственно), что согласуется с данными, приведёнными в литературе [23], а цвет растворов, соответственно, менялся от оранжево-красного у наименьшего размера частиц до пурпурного у коллоидного раствора золота с размером частиц около 41 нм. Согласно данным литературы, увеличение размера частиц до 50 нм и более может приводить к снижению аналитического сигнала [32, 33], поэтому мы ограничились полученными НЧЗ трёх размеров: 16, 25 и 41 нм. Полученные НЧЗ по данным сканирующей электронной микроскопии имели размеры, сопоставимые с размерами, рассчитанными по методу Френса [11].

К настоящему времени предложен ряд методов для экспериментальной оценки количества макромолекул, которые сорбируются на поверхности наночастицы [35, 38], и расчёта концентрации белка для посадки на НЧЗ. При синтезе конъюгата НЧЗ с молекулами антигена важно решение двух основных задач: получение устойчивого золя и сохранение антигенной активности молекул белка. Нами были отработаны оптимальные условия синтеза с учётом влияния на стабильность золя концентрации антигена и pH раствора. Минимальную концентрацию белка, при которой не изменялся цвет смеси, рассматривали как стабилизирующую, т. е. определяющую границы устойчивости золя. Белковая оболочка вокруг коллоидных НЧЗ гидратирована, благодаря чему после нанесения на пористую стекловолоконную мембрану и сушки частицы при последующем взаимодействии с образцом и буфером снова переходят в раствор, не теряя своей реакционной способности. В результате проведённого эксперимента были получены стабильные в течение 6 мес препараты конъюгатов антигена с НЧЗ трёх размеров.

Первичную оценку способности полученных конъюгатов к специфическому взаимодействию с АТ выполняли методом дот-иммуноанализа в формате захвата, что позволило сделать вывод о высокой активности препаратов и их пригодности для использования в тестах с применением нитроцеллюлозных мембран в качестве твёрдой фазы. В реакциях ИХА при увеличении размера НЧЗ аналитический сигнал значительно возрастал, и самая яркая полоса в тестовой зоне наблюдалась при использовании конъюгата с размером частиц 41 нм, что подтверждало возрастание коэффициента экстинкции растворов НЧЗ с увеличением размеров частиц. Увеличение аналитического сигнала при использовании для приготовления конъюгата НЧЗ большего диаметра также может быть связано с тем, что человеческий глаз острее воспринимает более контрастный, характерный для них пурпурный цвет.

Заключение

В работе получены и охарактеризованы НЧЗ размером 16, 25 и 41 нм. Разработаны условия получения конъюгатов НЧЗ с рекАГ, показаны высокая эффективность и специфичность их взаимодействия с IgG-АТ к ВГЕ. Для конъюгата НЧЗ-3 с рекАГ подтверждена возможность использования в ИХА.

Полученный конъюгат планируется использовать при разработке тест-системы для быстрого одновременного определения IgG- и IgM-АТ к ВГЕ. IgG-АТ появляются в крови заболевших через несколько дней после появления IgM-АТ. Длительность персистенции IgM-АТ составляет 6–9 мес, IgG-АТ могут сохраняться в крови переболевших десятилетиями [16]. На ранних сроках заболевания одновременное выявление IgG- и IgM-АТ к ВГЕ является дополнительным инструментом диагностического алгоритма. Обнаружение IgG-АТ может свидетельствовать как об острой или перенесённой инфекции, так и о поствакцинальном иммунитете. Важная область применения экспресс-тестов для определения IgG — проведение эпидемиологических исследований при минимальной лабораторной оснащённости.

Данные результаты получены впервые и могут быть использованы при создании нового ИХА-теста для экспресс-диагностики ГЕ.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Thomas D.L., Yarbough P.O., Vlahov D., et al. Seroreactivity to hepatitis E virus in areas where the disease is not endemic. *J Clin. Microbiol.* 1997;35(5):1244–7. DOI: https://doi.org/10.1128/jcm.35.5.1244-1247.1997
2. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. J. Hepatol. 2018;68(6):1256–71. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.005
3. Takahashi M., Kusakai S., Mizuo H., et al. Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(1):49–56. DOI: https://doi.org/10.1128/jcm.43.1.49-56.2005
4. Chandra N.S., Sharma A., Malhotra B., Rai R.R. Dynamics of HEV viremia, fecal shedding and its relationship with transaminases and antibody response in patients with sporadic acute hepatitis E. *Virol. J.* 2010;7:213. DOI: https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-213
5. Chionne P., Madonna E., Pisani G., et al. Evaluation of rapid tests for diagnosis of acute hepatitis E. *J. Clin. Virol.* 2016;78:4–8. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.02.005
6. Rosi N.L., Mirkin C.A. Nanostructures in biodiagnostics. *Chem. Rev.* 2005;105(4):1547–62. DOI: https://doi.org/10.1021/cr030067f
7. Jans H., Huo Q. Gold nanoparticle-enabled biological and chemical detection and analysis. *Chem. Soc. Rev.* 2012;41(7):2849–66. DOI: https://doi.org/10.1039/c1cs15280g
8. Dykman L.A., Bogatyrev V.A. Colloidal gold in solid-phase analysis. *Biochemistry (Moscow).* 1997;62(4):350–6. EDN: https://elibrary.ru/leawar
9. Wilson R. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. *Chem. Soc. Rev.* 2008;37(9):2028–45. DOI: https://doi.org/10.1039/b712179m

10. Mulvaney P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *Langmuir.* 1996;12(3):788–800. DOI: https://doi.org/10.1021/la9502711
11. Wilson R. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. *Chem. Soc. Rev.* 2008;37(9):2028–45. DOI: https://doi.org/10.1039/b712179m
12. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Phys. Sci.* 1973;241(105):20–2. DOI: https://doi.org/10.1038/physci241020a0
13. Park J.W., Shumaker-Parry J.S. Structural study of citrate layers on gold nanoparticles: Role of intermolecular interactions in stabilizing nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2014;136(5):1907–21. DOI: https://doi.org/10.1021/ja4097384
14. Сафронова В.А., Самсонова Ж.В., Григоренко В.Г., Осипов А.П. Определение прогестерона методом латерального проточного иммуноанализа. *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия.* 2012;53(5):326–34. EDN: https://elibrary.ru/puirof
Safronova V.A., Samsonova J.V., Grigorenko V.G., Osipov A.P. Lateral flow immunoassay for progesterone detection. *Moscow University Chemistry Bulletin.* 2012;67(5):241–8. DOI: https://doi.org/10.3103/S0027131412050045 EDN: https://elibrary.ru/rgicvf
15. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н. и др. Разработка рекомбинантного белка капсида вируса гепатита Е третьего генотипа: клонирование, экспрессия, очистка, оценка антигенных свойств. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2019;96(1):10–7. Alatortseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., et al. Development of hepatitis E 3 genotype recombinant protein capsid of: cloning, expression, purification, evaluation of the antigenic properties. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2019;96(1):10–7. DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-10-17 EDN: https://elibrary.ru/hmyroi
16. Khuroo M.S., Khuroo M.S., Khuroo N.S. Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure. *World J. Gastroenterol.* 2016;22(31):7030–45. DOI: https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i31.7030
17. Kamar N., Izopet J., Pavio N., et al. Hepatitis E virus infection. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2017;3:17086. DOI: https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.86
18. Mikhailov M.I., Karlsen A.A., Potemkin I.A., et al. Geographic and temporal variability of hepatitis E virus circulation in the Russian Federation. *Viruses*. 2022;15(1):37. DOI: https://doi.org/10.3390/v15010037
19. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н. и др. Рекомбинантный белок, содержащий антигенно-значимые фрагменты белков вируса гепатита Е, используемый в тест-системах для серодиагностики гепатита Е (варианты). Патент РФ 2711907 C2;2020. Alatortseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., et al. Recombinant protein containing antigen-significant fragments of hepatitis E virus proteins, used in test systems for hepatitis E serodiagnosis (embodiments). Patent RU № 2711907 C2;2020.
20. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem*. 1974;22(12):1084–91. DOI: https://doi.org/10.1177/22.12.1084
21. Алаторцева Г.И., Лухверчик Л.Н., Нестеренко Л.Н. и др. Определение доли гепатита Е в этиологической структуре острых вирусных гепатитов в отдельных регионах Кыргызстана. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2019;64(12):740–6. Alatortseva G.I., Lukhverchik L.N., Nesterenko L.N., et al. The estimation of the hepatitis E proportion in the etiological structure of acute viral hepatitis in certain regions of of Kyrgyzstan. *Clinical Laboratory Diagnostics.* 2019;64(12):740–6. DOI: https://doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-740-746 EDN: https://elibrary.ru/ptiyxm
22. Давыдов В.В., Жаворонок С.В., Рогачева Т.А. и др. Распространённость антител к вирусу гепатита Е у населения регионов Республики Беларусь. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2022;99(2):160–71. Davydov V.V., Zhavoronok S.V., Rogacheva T.A., et al. Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in the population of the Republic of Belarus. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2022;99(2):160–71. DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-236 EDN: https://elibrary.ru/wpzhlf
23. Алаторцева Г.И., Доценко В.В., Нестеренко Л.Н. и др. Тест-система для выявления IgG-антител к вирусу гепатита Е (Hepeviridae, Orthohepevirus, Orthohepevirus A) методом линейного иммуноанализа. *Вопросы вирусологии.* 2020;65(3):132–42. Alatortseva G.I., Dotsenko V.V., Nesterenko L.N., et al. Line immunoassay for detection of IgG antibodies to hepatitis E virus (Hepeviridae, Orthohepevirus, Orthohepevirus A). *Problems of Virology.* 2020;65(3):132–42. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-132-142 EDN: https://elibrary.ru/svgsma
24. De Mey J., Moeremans M. The preparation of colloidal gold probes and their use as marker in electron microscopy. In: Koehler, J.K., eds. *Advanced Techniques in Biological Electron Microscopy III.* Berlin, Heidelberg; 1986: 229–71. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-71135-0_6
25. Yao N., Wang Z.L., ed. *Handbook of Microscopy for Nanotechnology.* Boston; 2006.
26. Сотников Д.В. *Определение специфических антител методом иммунохроматографии: количественные закономерности и практические приложения:* Автореф. дисс. … канд. хим. наук. М.;2016. Sotnikov D.V. *Determination of specific antibodies by immunochromatography: quantitative patterns and practical applications:* Diss. Moscow;2016.
27. Дыкман Л.А., Богатырев В.А. Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии. *Успехи химии.* 2007;76(2):199–213. EDN: https://elibrary.ru/knoucz
Dykman L.A., Bogatyrev V.A. Gold nanoparticles: preparation, functionalisation and applications in biochemistry and immunochemistry. *Russian Chemical Reviews.* 2007;76(2):181–94. DOI: https://doi.org/10.1070/RC2007v076n02ABEH003673 EDN: https://elibrary.ru/lkoyxr
28. Богачева Н.В., Смирнова Д.Н., Дармов И.В., Крупина К.А. Способ получения наночастиц коллоидного золота со средним диаметром 25-30 нм. Патент РФ 2644466 C2;2016. Bogacheva N.V., Smirnova D.N., Darmov I.V., Krupina K.A. Method for obtaining nanoparticles of colloid gold with average diameter 25–30 nm. Patent RU 2644466 C2;2016. EDN: https://elibrary.ru/ckmfyd
29. Zaraysky E.I. Nanogold and its conjugates in immunochromatography: synthesis, analysis, separation, conjugation with macromolecules. *Eurasian Union of Scientists.* 2018;(12-3):42–7. DOI: https://doi.org/10.31618/ESU.2413-9335.2018.3.57.42-47 EDN: https://elibrary.ru/csxzyv
30. Kumar D., Mutreja I., Sykes P. Seed mediated synthesis of highly mono-dispersed gold nanoparticles in the presence of hydroquinone. *Nanotechnology*. 2016;27(35):355601. DOI: https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/35/355601
31. Mori T., Hegmann T. Determining the composition of gold nanoparticles: a compilation of shapes, sizes, and calculations using geometric considerations. *J. Nanopart. Res*. 2016; 18(10):295. DOI: https://doi.org/10.1007/s11051-016-3587-7
32. Rajasekharreddy P., Usha Rani P., Sreedhar B. Qualitative assessment of silver and gold nanoparticle synthesis in various plants: a photobiological approach. *J. Nanopart. Res.* 2010;12:1711–21. DOI: https://doi.org/10.1007/s11051-010-9894-5
33. Safenkova I., Zherdev A., Dzantiev B. Factors influencing the detection limit of the lateral-flow sandwich immunoassay:

a case study with potato virus X. *Anal. Bioanal. Chem*. 2012;403(6):1595–605.
DOI: https://doi.org/10.1007/s00216-012-5985-8

34. Бызова Н.А., Сафенкова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Сравнительная характеристика наночастиц коллоидного золота разного диаметра как носителей и маркеров в иммунохроматографическом анализе. *Естественные и технические науки.* 2012;(1):62–71. Byzova N.A., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. A comparative analysis of colloidal gold nanoparticles of various diameters as carriers and markers in immunochromatographic assay. *Natural and Technical Sciences.* 2012;(1):62–71. EDN: https://elibrary.ru/owmcqx
35. Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., et al. Rapid pretreatment-free immunochromatographic assay of chloramphenicol in milk. *Talanta*. 2010;81(3):843–8. DOI: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.01.025
36. Kaur K., Forrest J.A. Influence of particle size on the binding activity of proteins adsorbed onto gold nanoparticles. *Langmuir*. 2012;28(5):2736–44. DOI: https://doi.org/10.1021/la203528u
37. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development and application of a label-free fluorescence method for determining the composition of gold nanoparticle-protein conjugates. *Int. J. Mol. Sci*. 2014;16(1):907–23. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms16010907
38. Al-Sadeq D.W., Majdalawieh A.F., Mesleh A.G., et al. Laboratory challenges in the diagnosis of hepatitis E virus. *J. Med. Microbiol*. 2018;67(4):466–80. DOI: https://doi.org/10.1099/jmm.0.000706
39. Chakraborty S., Joshi P., Shanker V., et al. Contrasting effect of gold nanoparticles and nanorods with different surface modifications on the structure and activity of bovine serum albumin. *Langmuir*. 2011;27(12):7722–31. DOI: https://doi.org/10.1021/la200787t

Информация об авторах

Алаторцева Галина Ивановна✉ — канд. биол. наук, зав. лаб. клонирования вирусных геномов отдела вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, alatortseva@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-9887-4061

Нестеренко Любовь Николаевна — канд. хим. наук, в. н. с. лаб. клонирования вирусных геномов отдела вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, innesterenko3001@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-3825-3906

Амиантова Ирина Ильинична — н. с. лаб. клонирования вирусных геномов отдела вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, amianti@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-3483-0128

Притворова Людмила Николаевна — канд. мед. наук, в. н. с. лаб. клонирования вирусных геномов отдела вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, lexx294@yandex.by, https://orcid.org/0000-0002-2997-8892

Доценко Вера Васильевна — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. клонирования вирусных геномов отдела вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, verramal@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-5866-944X

Зверев Виталий Васильевич — д-р биол. наук, профессор, академик РАН, зав. отделом вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе, научный руководитель НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, vitalyzverev@outlook.com, https://orcid.org/0000-0002-0017-1892

Свитич Оксана Анатольевна — д-р мед. наук, член-корр. РАН, зав. отделом иммунологии и аллергологии, директор НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, svitichoa@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-1757-8389

Участие авторов: *Алаторцева Г.И.* — концепция и дизайн исследования, анализ научной литературы, анализ и обобщение результатов исследований, написание и редактирование статьи; *Нестеренко Л.Н.* — дизайн исследования, анализ научной литературы, отработка условий проведения ИХА, систематизация и анализ результатов исследования, написание статьи; *Амиантова И.И.* — отработка условий проведения ИХА, систематизация результатов исследования; *Притворова Л.Н.* — подготовка и тестирование испытуемых образцов, анализ результатов; *Доценко В.В.* — подготовка и тестирование испытуемых образцов, анализ результатов; *Зверев В.В.* — концепция исследований, общее руководство, анализ результатов; *Свитич О.А.* — концепция исследований, общее руководство, анализ результатов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисковой и аналитической работы в подготовке статьи, прочитали и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 20.10.2024;
принята к публикации 28.12.2024;
опубликована 28.02.2025

Information about the authors

Galina I. Alatortseva✉ — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of cloning of viral genomes, Virology department named after O.G. Andzhaparidze, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, alatortseva@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-9887-4061

Lyubov N. Nesterenko — Cand. Sci. (Chem.), leading researcher, Laboratory of cloning of viral genomes, Virology department named after O.G. Andzhaparidze, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, innesterenko3001@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-3825-3906

Irina I. Amiantova — researcher, Laboratory of cloning of viral genomes, Virology department named after O.G. Andzhaparidze, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, amianti@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-3483-0128

Lyudmila N. Pritvorova — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of cloning of viral genomes, Virology department named after O.G. Andzhaparidze, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, lexx294@yandex.by, https://orcid.org/0000-0002-2997-8892

Vera V. Dotsenko — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of cloning of viral genomes, Virology department named after O.G. Andzhaparidze, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, verramal@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-5866-944X

Vitaly V. Zverev — D. Sci. (Biol.), Professor, RAS Full Member, Head, Virology department named after O.G. Andzhaparidze, scientific director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, vitalyzverev@outlook.com, https://orcid.org/0000-0002-0017-1892

Oksana A. Svitich — D. Sci. (Med.), Corresponding Member of the RAS, Head, Immunology and Allergology department, Director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia, svitichoa@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0003-1757-8389

Authors' contribution: *Alatortseva G.I.* — research concept and design, analysis of scientific literature, analysis and generalization of research results, writing and editing an article; *Nesterenko L.N.* — research design, analysis of scientific literature, elaboration of the conditions for conducting an IHA, systematization and analysis of research results, writing an article; *Amiantova I.I.* — elaboration of the conditions for conducting an IHA, systematization results of the study; *Pritvorova L.N.* — preparation and testing of test samples, analysis of results; *Dotsenko V.V.* — preparation and testing of test samples, analysis of results; *Zverev V.V.* — research concept, general guidance, analysis of results; *Svitich O.A.* — research concept, general guidance, analysis of results. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 20.10.2024;
accepted for publication 28.12.2024;
published 28.02.2025