

8. Leclerc P.M., Dubois-Colas N., Garenne M. Hormonal contraception and HIV prevalence in four African countries. *Contraception*. 2008, 77:371-376.
9. Morrison C.S., Richardson B.A., Mmiro F. et al. Hormonal contraception and the risk of HIV acquisition. *AIDS*. 2007, 21:85-95.
10. Schultz J.R., Petz L.N., Nardulli A.M. Estrogen receptor alpha and Sp1 regulate progesterone receptor gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2003, 201:165-75.
11. Stein B., Yang M.X. Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta. *Mol. Cell. Biol.* 1995, 15:4971-4979.
12. WHO. Hormonal contraceptive eligibility for women at high risk of HIV. Guidance statement: Recommendations concerning the use of hormonal contraceptive methods by women at high risk of HIV. December 2016.
13. WHO. Hormonal contraceptive eligibility for women at high risk of HIV. Updated February 2017.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

О.А.Петруша<sup>1</sup>, Т.Л.Черниченко<sup>2</sup>, И.А.Кофиади<sup>3</sup>, В.В.Зверев<sup>1,4</sup>, Е.Б.Файзулов<sup>1</sup>

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДА ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ С ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ В ДИАГНОСТИКЕ ПАРВОВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА У ПЛОТОЯДНЫХ

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, <sup>2</sup>ООО «Биоцентр», <sup>3</sup>ООО «ДНК-Технология», Москва; <sup>4</sup>Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова

*Цель.* Оценка параметров диагностической ценности метода петлевой изотермической амплификации ДНК с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (real-time LAMP, RT-LAMP) на модели парвовирусов энтерита плотоядных. *Материалы и методы.* Образцы фекалий, крови и мазков из прямой кишки разных видов хищных животных с парвовирусным энтеритом (n=39) и здоровых животных (n=31), а также лабораторные штаммы вируса энтерита норок были проанализированы методом RT-LAMP с использованием красителей SYTO-9 и SYTO-82. В качестве референтного метода использовалась ПЦР в режиме реального времени. *Результаты.* Показано, что метод RT-LAMP на модели парвовирусного энтерита плотоядных обеспечивает высокие показатели аналитической чувствительности ( $1,5 \times 10^3$  копий ДНК/мл), диагностической чувствительности и специфичности (до 100% при оптимальных условиях). Краситель SYTO-82 обеспечивал более высокое отношение сигнал/фон ( $22,6 \pm 2,1$ ), чем краситель SYTO-9 ( $6,3 \pm 1,5$ ) ( $p < 0,0000001$ ). Вместе с тем, с красителем SYTO-9 на пределе чувствительности (10 копий ДНК) прирост флуоресценции в реакционной смеси наблюдался на 13 минут раньше, чем для SYTO-82 (23 и 36 минут, соответственно). *Заключение.* Реакция RT-LAMP является перспективным методом для быстрой и высокочувствительной диагностики инфекционных заболеваний на месте лечения, а также в условиях животноводческих хозяйств или в походно-полевых условиях.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 90—95

Ключевые слова: диагностика вирусных инфекций, петлевая изотермическая амплификация ДНК, LAMP, SYTO-9, SYTO-82, парвовирус плотоядных

О.А.Petrusha<sup>1</sup>, Т.Л.Chernichenko<sup>2</sup>, I.A.Kofiadis<sup>3</sup>, V.V.Zverev<sup>1,4</sup>, E.B.Faizulov<sup>1</sup>

## EFFECTIVENESS OF THE LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION WITH FLUORESCENT DETECTION IN THE DIAGNOSIS OF PARVOVIRUS ENTERITIS IN CARNIVORES

<sup>1</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, <sup>2</sup>Company «Biocenter», <sup>3</sup>Company «DNA-Technology», Moscow; <sup>4</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

The *aim* of the study was to evaluate the diagnostic value of the method of loop-mediated isothermal amplification of DNA with real-time fluorescent detection (real-time LAMP, or RT-LAMP) on the model of carnivore parvoviruses. *Materials and methods.* Samples of feces, blood and swabs from the rectum of different species of predatory animals with parvovirus enteritis (n = 39) and healthy animals (n = 31), as well

as laboratory strains of mink enteritis virus, were analyzed by RT-LAMP using SYTO-9 and SYTO-82 dyes. Real-time PCR was used as a reference method. *Results.* In our study, the LAMP method with real-time fluorescence detection (RT-LAMP) in the carnivore parvovirus enteritis model provides high analytical sensitivity ( $1.5 \times 10^3$  copies of DNA/ml), diagnostic sensitivity and specificity (up to 100% under optimal conditions). Comparison of the two intercalating dyes showed that the SYTO-82 dye provides a higher signal-to-background ratio ( $22.6 \pm 2.1$ ) than the SYTO-9 dye ( $6.3 \pm 1.5$ ) ( $p < 0.0000001$ ). At the same time, SYTO-9 dye at the sensitivity limit (10 copies of DNA) provides an increase in fluorescence in the reaction mixture 13 minutes earlier than for SYTO-82 (23 and 36 minutes, respectively). *Conclusion.* RT-LAMP is a promising method for rapid and highly sensitive «point-of-care» diagnosis of infectious diseases, as well as in conditions of livestock farms or in field conditions.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 90–95

Key words: diagnosis of viral infections, loop-mediated isothermal amplification of DNA, LAMP, SYTO-9, SYTO-82, carnivore parvovirus

## ВВЕДЕНИЕ

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), благодаря своей универсальности, высокой специфичности и чувствительности стал «золотым стандартом» диагностики многих инфекционных заболеваний как в медицине, так и в ветеринарии. Однако, применение метода ПЦР для диагностики на месте оказания медицинской помощи («point-of-care»), в походно-полевых условиях или в животноводческих хозяйствах крайне затруднительно. Высокая потребность в средствах диагностики «point-of-care» заставляет исследователей искать подходящие методы, в числе которых особый интерес представляют методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот (ИАНК). Одним из наиболее перспективных методов ИАНК признан метод петлевой изотермической амплификации ДНК, разработанный Notomi T. et al. (LAMP, Loop-mediated Isothermal Amplification) [2]. В состав реакционной смеси LAMP, как правило, входит ДНК-полимераза термофильной бактерии *Bacillus stearothermophilus* (Bst ДНК-полимераза), которая обладает 5'-3'-ДНК-полимеразной активностью, способностью к замещению (вытеснению) цепей ДНК и не проявляет 5'-3'-экзонуклеазной активности. Благодаря использованию Bst ДНК-полимеразы, реакция LAMP проходит при постоянной температуре и не требует применения сложного и дорогого оборудования. Продукты реакции накапливаются в количестве, многократно превышающем количество продуктов ПЦР, что позволяет проводить визуальную детекцию результата прямо в пробирке. В классическом варианте LAMP в состав реакционной смеси входит четыре олигонуклеотидных праймера, что обеспечивает высокую специфичность метода при чувствительности, сопоставимой с ПЦР [1,3].

Существуют разные способы детекции результатов реакции LAMP — электрофоретический, колориметрический, турбидиметрический, флуоресцентный и другие. Использование интеркалирующих красителей ДНК является, на наш взгляд, одним из наиболее перспективных подходов, позволяющим проводить не только визуальную детекцию результата, но также и флуориметрическую детекцию «по конечной точке» или в режиме реального времени. Важно отметить, что инструментальные методы детекции минимизируют риск получения ложноположительных результатов в результате контаминации ампликонами и позволяют количественно определять ДНК-мишень. Проведение реакции ИАНК при постоянной температуре предоставляет возможность конструировать портативные анализаторы (весом менее 2 кг), включающие твердотельный термостат, оптический блок, встроенный или внешний компьютер.

В настоящей работе в качестве модели использованы вирусы энтерита норок (ВЭН), энтерита собак (ВЭС) и панлейкопении кошек (вирус ПЛК), которые относятся к одному виду, роду, подсемейству и семейству. Парвовирусы имеют сферический вирион диаметром 20 нм без оболочки и одноцепочечный ДНК геном. Заболевания, вызванные вирусами вида *Carnivore protoparvovirus 1*, сопровождаются

высокой смертностью и опасны, в первую очередь, для новорожденных и молодых животных. Для диагностики парвовирусного энтерита применяются методы ПЦР и иммуноферментного анализа, требующие отправки образцов в специализированную лабораторию. Экспресс-методы диагностики, такие как латексагглютинация, обладают меньшей чувствительностью. Целью исследования являлась оценка параметров диагностической ценности метода LAMP с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (real-time LAMP, или RT-LAMP) на модели парвовирусов — возбудителей энтерита у плотоядных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы фекалий, крови и мазков из прямой кишки разных видов хищных животных (кошек, собак, норок, лисиц) с парвовирусным энтеритом (n=39) и здоровых животных (n=31), а также лабораторные культуральные штаммы вируса энтерита норок «Береговой» и «Родники» были предоставлены компанией ООО «Биоцентр».

Для постановки ПЦР использовали праймеры к гену белка VP2 вируса Carnivore protorogovirus 1 и зонд, меченный красителем ROX, описанные в статье Streck A.F. et al. [4]. Амплификацию проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл с использованием набора реагентов «2,5x реакционная смесь для ПЦР-РВ» («Синтол»). Реакционная смесь содержала по 5 пмоль каждого праймера и 5 пмоль зонда. ПЦР-РВ проводилась в амплификаторе ДТпрайм («ДНК-технология») в режиме 95°С — 90 сек. (1 цикл); 95°С — 20 сек., 58°С — 40 сек. (45 циклов). Визуальная детекция результатов LAMP и ПЦР-РВ проводилась методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с бромистым этидием, а для LAMP также путем добавления 10 мкл стократного разведения раствора SYBR Green I (кат. №S9430, «Sigma-Aldrich») к 10 мкл продуктов реакции амплификации.

Для проведения реакции LAMP использовали праймеры к гену белка VP2 вируса энтерита норок, описанные в статье Wang J. et al. [7]. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 8 ед ДНК-полимеразы Bst 2.0 WarmStart («BioLabs», Великобритания), 2,5 мкл 10x буфера для Bst полимеразы, MgSO<sub>4</sub> 8 мМ, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов 2 мМ каждого («Синтол», Россия), по 5 пмоль каждого из внешних (M-F3 и M-B3) и по 15 пмоль внутренних (M-FIP и M-BIP) праймеров, краситель SYTO-9 или SYTO-82 (Invitrogen, США). Реакцию проводили в амплификаторе ДТпрайм («ДНК-Технология», Россия) в режиме 65°С — 60 мин; 80°С — 10 мин. Для регистрации флуоресценции красителей SYTO-9 и SYTO-82 использовали цветовые каналы FAM и R6G, соответственно.

Для определения оптимальной концентрации красителей SYTO-9 и SYTO-82 и отношения сигнал/фон использовали их в концентрации 0,5 мкМ, 1 мкМ и 2 мкМ. Выделение ДНК из клинических и контрольных образцов производили с помощью набора реагентов РИБО-преп (ЦНИИ эпидемиологии, Москва). Отношение сигнал/фон определяли на основе данных амплификатора ДТпрайм путем деления максимального значения флуоресценции на значение флуоресценции до начала роста сигнала. Вычисление проводилось для каждой реакции отдельно. Время появления сигнала в LAMP (значение Tt) и значение порогового цикла в ПЦР (ПЦ) определялось автоматически с помощью программы RealTime PCR v.7.7 («ДНК-Технология») на основе математического анализа формы кривой амплификации (метод геометрический, Ср). Все праймеры и зонды синтезированы в ООО «ДНК-Синтез» (Россия).

Для оценки аналитической чувствительности реакции LAMP использовали последовательные десятикратные разведения ДНК ВЭН штамма «Береговой» с известной концентрацией от  $1,5 \times 10^7$  до  $1,5 \times 10^1$  копий/мл. Диагностическую чувствительность LAMP рассчитывали определением доли положительных результатов LAMP для образцов, в которых методом ПЦР-РВ была обнаружена ДНК парвовируса плотоядных. Диагностическую специфичность LAMP рассчитывали определением доли отрицательных результатов LAMP для образцов, в которых методом ПЦР-РВ не была обнаружена ДНК парвовируса плотоядных.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании J. Wang et al. [7] показана высокая эффективность метода LAMP в диагностике парвовирусного энтерита норок. В работе продукты амплификации визуализировали методом электрофореза в агарозном геле с бромистым этидием либо добавлением в реакционную смесь красителя SYBR Green I. Поскольку применение этих методов детекции сопряжено с высоким риском контаминации исследуемых образцов ампликонами и получения ложноположительных результатов, мы на данной модели исследовали эффективность RT-LAMP флуоресцентной детекцией результатов.

Основным требованием к интеркалирующим красителям ДНК для детекции результатов RT-LAMP является их неспособность в рабочей концентрации ингибировать активность ДНК-полимеразы. Важным показателем для системы детекции в режиме реального времени также является отношение интенсивности положительного сигнала к фоновому свечению, или отношение сигнал/фон. Высокие значения данного показателя обеспечивает надежную трактовку результата как при флуориметрической детекции результата в режиме реального времени, так и по конечной точке. В эксперименте по RT-LAMP анализу клинических образцов мы определили отношение сигнал/фон для двух интеркалирующих красителей ДНК — SYTO-9 и SYTO-82, которые, как показано в предыдущих исследованиях [5,6], в наименьшей степени ингибируют Bst ДНК-полимеразу. Краситель SYTO-82 показал более высокое и стабильное отношение сигнал/фон ( $22,6 \pm 2,1$ ), чем краситель SYTO-9 ( $6,3 \pm 1,5$ ) ( $p < 0,000001$ ). При анализе ДНК штамма ВЭН «Береговой», полученного в культуре клеток, признаков ингибирования реакции названными красителями в диапазоне концентраций 0,5 — 2 мкМ не выявлено. Однако при постановке реакции с клиническими образцами от норок было отмечено, что время появления сигнала (значение Tt) и его нарастания до максимальных значений для SYTO-9 значительно меньше, чем у SYTO-82. В среднем сигнал в реакциях в присутствии SYTO-9 появлялся на 2 мин (при концентрации 1 мкМ) ( $p < 0,001$ ) и на 5 минут (при концентрации 2 мкМ) ( $p < 0,0017$ ) раньше, чем в реакции с тем же клиническим образцом в присутствии SYTO-82. При этом при повышении концентрации красителя SYTO-82 отмечались признаки ингибирования реакции. Так, при концентрации SYTO-82 в 1 мкМ сигнал появлялся в среднем на 3 мин раньше, чем при концентрации 2 мкМ ( $p < 0,021$ ). В реакциях с SYTO-9 изменений значения Tt в зависимости от концентрации красителя не наблюдалось.

Для оценки аналитической чувствительности реакции LAMP использовали последовательные десятикратные разведения ДНК ВЭН (штамм «Береговой») с известной концентрацией. Чувствительность LAMP составила  $1,5 \times 10^3$  копий ДНК/мл, тогда как чувствительность ПЦР-РВ составила менее  $1,5 \times 10^2$  копий ДНК/мл (табл.).

В качестве референтного метода выявления результатов LAMP применяли электрофорез в агарозном геле с бромистым этидием и прямое окрашивание продуктов амплификации в микропробирках. При добавлении раствора SYBR Green I в реакционную смесь наблюдалось окрашивание реакционной смеси в зеленый цвет в случае положительной реакции и в светло-коричневый цвет в образцах с отрицательным

Сравнение аналитической чувствительности методов ПЦР-РВ и RT-LAMP

Копий ДНК на реакционную смесь	Копий ДНК в мл	Результат LAMP, значение Tt, минут		Результат ПЦР, значение ПЦ
		SYTO-9	SYTO-82	
3750	150000	18,7±0,63	23,3±0,32	31,1±0,4
375	15000	21,4±0,98	27,9±0,93	34,2±0,21
37,5	1500	23,5±1,5	36,3±5,76	37,3±0,17
3,75	150	0	45,1*	40,7±0,98
0,37	15	0	0	41,3±0,2**

Примечание. \* Одна положительная реакция из четырех, \*\*две положительные реакции из четырех.

результатом. При облучении пробирок ультрафиолетом ( $\lambda=320$  нм) в положительных образцах наблюдается ярко-зеленое свечение, отсутствующее в отрицательных образцах.

Одной из характеристик реакции LAMP является высокая скорость накопления продуктов амплификации. Так, например, клинические образцы с высоким содержанием вирусной ДНК (до  $2 \times 10^{11}$  копий/мл) давали прирост флуоресценции с красителем SYTO-9, начиная уже с четвертой минуты реакции. На пределе чувствительности (10 копий ДНК на реакционную смесь) достоверный прирост флуоресценции в реакционной смеси наблюдался через 23 минуты (SYTO-9) и 36 минут (SYTO-82), тогда как в ПЦР-РВ выявление того же количества ДНК требует примерно 74-76 минут. Графики флуоресценции, полученные для красителя SYTO-82, отличались по форме и характеризовались значительным отклонением от сигмоидной функции, наилучшим образом описывающей данный тип накопления сигнала. Наличие таких отклонений, особенно в начальной фазе роста флуоресценции, свидетельствует о неоптимальных условиях реакции или наличии ингибиторов. На эффективность RT-LAMP в данном случае мог повлиять сам краситель SYTO-82. Однако эта гипотеза требует подтверждения в дополнительных экспериментах.

Для определения диагностической чувствительности и специфичности реакции LAMP использовали центрифугаты кала от 5 норок с лабораторно-подтвержденным (ПЦР-РВ) парвовирусным энтеритом, в том числе двух животных, экспериментально зараженных штаммами ВЭН «Береговой» и «Родники». Также использовали 34 образца крови, кала и ректальных смывов от больных животных, в которых методом ПЦР-РВ было подтверждено наличие ДНК парвовируса плотоядных, и 31 образец от здоровых животных, давших отрицательный результат в ПЦР-РВ. Все образцы были проанализированы в реакции RT-LAMP с красителем SYTO-82. В результате RT-LAMP анализа ДНК парвовируса плотоядных была обнаружена у 32 животных с парвовирусным энтеритом.

Несмотря на то, что метод LAMP по, нашим данным, несколько уступает по аналитической чувствительности методу ПЦР-РВ, он показал 100% диагностическую чувствительность на образцах от норок и кошек. Однако при анализе образцов от собак выявлено два случая несоответствия (результаты положительные в ПЦР, но отрицательные в RT-LAMP), а доля сопоставимых с ПЦР-РВ результатов составила 91%. Более низкая диагностическая чувствительность RT-LAMP на образцах от собак может быть объяснена тем, что праймеры для LAMP были подобраны и рекомендованы авторами [7] для выявления ДНК ВЭН, но не филогенетически близкого ВЭС. Действительно, проведенный нами анализ нуклеотидных последовательностей геномов ВЭС из базы данных GenBank (NCBI) позволил выявить у некоторых штаммов несоответствия в сайтах связывания праймеров для LAMP, способные ухудшить диагностическую чувствительность.

В образцах здоровых животных ДНК парвовируса не обнаружена, следовательно, диагностическая специфичность LAMP составила 100%.

Таким образом, полученные результаты показали, что при детекции результатов LAMP по конечной точке предпочтительным является использование красителя SYTO-82, обеспечивающего большее отношение сигнал/фон. Тогда как при флуоресцентной детекции в режиме реального времени лучше использовать SYTO-9, поскольку он обеспечивает более быстрое получение результата. Метод RT-LAMP обеспечивает высокую чувствительность и специфичность выявления ДНК парвовируса плотоядных в клинических образцах, при этом время проведения реакции, позволяющее достичь максимальной аналитической чувствительности, составляет 30-40 мин. Выявленная нами на порядок более низкая аналитическая чувствительность метода RT-LAMP по сравнению с ПЦР-РВ не способна ухудшить диагностическую чувствительности, поскольку парвовирусный энтерит характеризуется крайне высокой концентрацией вирусной ДНК в фекалиях. Так, средняя концентрация парвовирусной ДНК в исследованных нами клинических образцах составила  $2,8 \times 10^{10}$  копий/мл.

Реакция LAMP является перспективным методом для быстрой и высокочувствительной диагностики инфекционных заболеваний «point-of-care», а также в

условиях животноводческих хозяйств или в походно-полевых условиях. Однако, для его внедрения в лабораторную практику требуется решить ряд проблем. Учет результатов в нашей работе проводился в амплификаторе ДТпрайм, разработанным для постановки и учета результатов ПЦР-РВ, однако изотермический характер реакции LAMP позволяет проводить детекцию в более простых, недорогих и компактных приборах. Компании Eiken Chemical (Япония) и OptiGene Limited (Великобритания) уже разработали и внедрили подобные приборы, основанные на методах турбидиметрии или флуориметрии с детекцией в режиме реального времени. Актуальной остается разработка и внедрение портативного термостатируемого флуориметра отечественного производства для постановки ИАНК. Важной проблемой остается также создание упрощенных систем пробоподготовки, позволяющих быстро и с минимальным риском контаминации подготовить образцы к анализу во внелабораторных условиях.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Craw P., Balachandra W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab on a Chip*. 2012, 12(14):2469-2486.
2. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28(12): E63.
3. Notomi T., Mori Y., Tomita N. et al Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*. 2015, 53 (1):1-5.
4. Streck A.F., Ruster D., Truyen U. et al. An updated TaqMan real-time PCR for canine and feline parvoviruses. *J. Virol. Meth.* 2013, 193:6-8.
5. Seyrig G., Stedtfeld R., Tourlousse D. Selection of fluorescent DNA dyes for real-time LAMP with portable and simple optics. *J. Microbiol. Methods*. 2015, 119:223-227.
6. Oscorbin I.P., Belousova E.A., Zakabunin A.I. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). *Biotechniques*. 2016, 61(1):20-5.
7. Wang J., Cheng S., Yi L. et al. Detection of mink enteritis virus by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J. Virol. Meth.* 2013, 187:401-405.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*А.В.Солдатенкова, Е.М.Зимина, А.М.Кудряшова, Н.Ф.Гаврилова, И.В.Яковлева, О.В.Борисова, В.В.Свиридов, Н.А.Михайлова*

## **РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ СИНЕГНОЙНОЙ**

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

*Цель.* Разработка и оптимизация иммуноферментных методов для контроля качества рекомбинантной вакцины синегнойной. *Материалы и методы.* Рекомбинантные белки в промежуточных продуктах и при контроле полноты сорбции выявляли в «сэндвич» вариантах твердофазного ИФА с использованием специфических поликлональных и моноклональных антител. Определение антигена в вакцине проводили по остаточному количеству антител, специфичных к анатоксину или OpgF, не связавшихся с вакцинным препаратом в процессе предварительной инкубации. *Результаты.* Разработаны и оптимизированы ИФА для количественного определения компонентов (анатоксина и мембранного белка OpgF) рекомбинантной вакцины синегнойной в процессе производства. Установлено, что методики являются специфичными для определения анатоксина и OpgF, предел их количественного определения обладает приемлемой надежностью, показана возможность выбора интерполяции калибровочной зависимости в пределах аналитической области, правильность и прецизионность удовлетворяют критериям приемлемости, методика устойчива в условиях проведения анализа. *Заключение.* Методы могут быть использованы для контроля качества препарата в процессе его изготовления и хранения.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 95–100

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, белок наружной мембраны OpgF, анатоксин, иммуноферментный анализ, рекомбинантная вакцина синегнойная