

16. Черногор Л.И., Арбатская Е.В., Данчинова Г.А., Козлова И.В., Горина М.О., Сунцова О.В., Чапоргина Е.А., Беликов С.И., Борисов В.А. Клинико-лабораторная характеристика иксодового клещевого боррелиоза в Прибайкалье. Журн. микробиол. 2005, 6: 60-62.
17. Jahfari S., Sarkysyan D.S., Kolyasnikova N.M., Hovius J.W., Sprong H., Platonov A.E. Evaluation of a serological test for the diagnosis of *Borrelia miyamotoi* disease in Europe. J. Microbiol. Methods 2017, 136: 11-16.
18. Koetsveld J., Kolyasnikova N.M., Wagemakers A., Toporkova M.G., Sarkysyan D.S., Oei A., Platonov A.E., Hovius J.W. Development and optimization of an in vitro cultivation protocol allows for isolation of *Borrelia miyamotoi* from patients with hard tick-borne relapsing fever. Clin. Microbiol. Infect. 2017, 23 (7): 480-484.
19. Krause P.J., Fish D., Narasimhan S., Barbour A.G. *Borrelia miyamotoi* infection in nature and in humans. Clin. Microbiol. Infect. 2015, 21 (7): 631-639.
20. Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Makhneva N.A., Toporkova M.G., Maleev V.V., Krause P.J., Fish D. Humans infected with the relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. Emerg. Infect. Dis. 2011, 17 (10): 1816-1822.
21. Sarkysyan D.S., Platonov A.E., Karan L.S., Shipulin G.A., Sprong H., Hovius J.W. Probability of spirochete *Borrelia miyamotoi* transmission from ticks to humans. Emerg. Infect. Dis. 2015, 21 (12): 2273-2274.
22. Wagemakers A., Koetsveld J., Narasimhan S., Wickel M., Deponte K., Bleijlevens B., Jahfari S., Sprong H., Karan L.S., Sarkysyan D.S., van der Poll T., Bockenstedt L.K., Bins A.D., Platonov A.E., Fikrig E., Hovius J.W. Variable Major Proteins as targets for specific antibodies against *Borrelia miyamotoi*. J. Immunol. 2016, 196 (10): 4185-4195.
23. Wagemakers A., Staarink P.J., Sprong H., Hovius J.W. *Borrelia miyamotoi*: a widespread tick-borne relapsing fever spirochete. Trends Parasitol. 2015, 31 (6): 260-269.

Поступила 22.11.17

Контактная информация: Платонов Александр Евгеньевич, д.б.н., проф.,
111123, Москва, ул. Новогириевская, 3а, р.т. (495) 974-96-46

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*А.Л.Кравцов, С.В.Генералов, В.А.Кожевников,
Ю.К.Гаврилова, Е.Г.Абрамова, А.В.Кочкин, А.К.Никифоров*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОЛИ ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ БЕШЕНСТВА КЛЕТОК ЛИНИИ VERO С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Цель. Экспериментальное обоснование возможности определения в культуре доли инфицированных вирусом бешенства клеток линии Vero с использованием проточной цитометрии (ПЦ) и диагностического антирабического иммуноглобулина (ДАИ), меченого ФИТЦ (ВНИИЗЖ, г. Владимир). *Материалы и методы.* Фиксацию и пермебиализацию клеток Vero, инфицированных вирусом бешенства «Москва 3253», проводили с помощью реагента Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, USA) по методу Vengatesan D. et al. (2006). и внутриклеточный антиген окрашивали ДАИ. Процент инфицированных клеток определяли с помощью ПЦ через 24, 48 и 72 ч., а также через 48 ч при инфицировании клеточных культур десятикратными разведениями вирусосодержащей жидкости от 10^{-1} до 10^{-8} . *Результаты.* Доля инфицированных клеток возрастала в промежутке времени от 24 до 48 ч в среднем с 30 до 70%. При добавлении к клеткам вирусосодержащей жидкости в разведении 10^{-3} методом ПЦ обнаружено $6,9 \pm 0,21$ % инфицированных клеток Vero ($P < 0,001$, $n=3$). *Выводы.* ПЦ проявила себя как быстрый, чувствительный и надёжный метод определения относительного числа инфицированных вирусом бешенства клеток Vero. Препарат ДАИ обладал активностью, достаточной для его эффективного использования в автоматизированном варианте постановки МФА на базе метода ПЦ. Использование ПЦ возможно на различных этапах производства и контроля антирабических препаратов,

а также перспективно с точки зрения дальнейшего совершенствования диагностики бешенства.

Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 18—25

Ключевые слова: вирус бешенства, проточная цитометрия, культура клеток Vero

*A.L.Kravtsov, S.V.Generalov, V.A.Kozhevnikov,
Yu.K.Gavrilova, E.G.Abramova, A.V.Kochkin, A.K.Nikiphorov*

DETERMINATION OF THE RABIES VIRUS-INFECTED VERO LINE CELL PORTION BY FLOW CYTOMETRY

Russian Research Institute for Plague Control « Microb», Saratov, Russia

Aim. Experimental substantiation of possibility to determine the rabies virus-infected Vero cell line portion in culture by flow cytometry (FC) and FITC labeled diagnostic anti-rabies immunoglobulin (DAI), manufactured in Russia. *Materials and methods.* Fixation and permeabilization of Vero cells, infected by rabies virus strain «Moscow 3253», was carried out by means of Cytofix/Cytoperm reagent (BD Biosciences, USA) according the Vengatesan D. et al. method (2006) and then intracellular rabies antigen was stained by DAI. Percentage of infected cells was determined by FC in 24, 48 and 72 h and as well in 48 h when the cell cultures were infected with tenfold dilutions of virus-containing fluid from 10^{-1} to 10^{-8} . *Results.* There was a significant increase in the percentage of infected cells on average from 30 to 70% in time interval from 24 to 48 h. With 1000-fold dilution of viral-containing fluid the FC method detected the $6,9 \pm 0,21\%$ of infected cells in Vero cultures ($P < 0,001$, $n=3$). *Conclusion.* FC has proved to be a fast, sensitive and reliable method for determining the relative number of virus- infected Vero cells in cultures. The drug DAI had a sufficient activity for its effective use in the automated version of MFA based on the FC method. The use of FC is possible at various stages of anti-rabies drug production and control, and is also promising in terms of further improving of the rabies diagnosis.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 3, P. 18—25

Key words: rabies virus, flow cytometry, Vero cell culture

ВВЕДЕНИЕ

Вирус бешенства, относящийся к семейству Rhabdoviridae и роду Lyssavirus, вызывает у человека и животных опасное инфекционное заболевание, наносящее ущерб экономике и здравоохранению. На территории Российской Федерации с 1 января 2015 г. действует межгосударственный стандарт диагностики бешенства, согласно которому выделение вируса осуществляют в культуре клеток мышинной нейробластомы. Детекцию вируса бешенства в инфицированных клетках (ИК) проводят методом флуоресцирующих антител (МФА), и результат учитывают с помощью люминесцентной микроскопии. Указанная схема лабораторной диагностики бешенства представляет собой альтернативу биопробе на белых мышах [2]. Люминесцентную микроскопию широко используют также для определения активности вируса и антирабических сывороток в тестах *in vitro*, подразумевающих использование клеточных культур и рекомендуемых Всемирной Организацией Здравоохранения и Всемирной Организацией по охране здоровья животных [14, 15].

Однако классический вариант постановки МФА с использованием люминесцентной микроскопии характеризуется длительностью, трудоёмкостью и субъективностью. Он не способен точно определять относительное число

инфицированных вирусами клеток, в отличие от автоматизированного варианта количественной оценки реакции иммунофлуоресценции на основе технологии импульсной проточной цитометрии (ПЦ) [10, 14]. Применение ПЦ в микробиологии — это путь к дальнейшему совершенствованию диагностики инфекционных болезней [4, 6], и в зарубежной печати имеются сообщения о детекции с помощью ПЦ вируса бешенства в культурах клеток мышины нейробластомы (MNA), почки сирийского хомяка (ВНК-21) и глиомы крыс (С6) [7, 14]. Клетки почечного эпителия зелёной мартышки (Vero) нашли применение для обнаружения методом ПЦ опасных для людей вирусов Эбола [8], Денге [12] и Зика [9], но не для детекции в них вируса бешенства.

Тем не менее, перевиваемую клеточную линию Vero успешно используют для культивирования вируса бешенства в России [3], где ПЦ для обнаружения вирусов в инфицированных клеточных культурах еще не применялась. На сегодняшний день отсутствует также информация о возможности использования выпускаемых в России препаратов диагностических антирабических флуоресцирующих антител в автоматизированном варианте постановки МФА на базе ПЦ анализа.

Целью настоящей работы явилось экспериментальное обоснование возможности определения в культуре доли инфицированных вирусом бешенства клеток линии Vero с использованием ПЦ и выпускаемого в России диагностического флуоресцирующего антирабического иммуноглобулина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали клеточную линию Vero, полученную из коллекции ООО «Биолот» (Санкт-Петербург), а также аттенуированный штамм вируса бешенства «Москва 3253», полученный из коллекции Научного центра экспертизы средств медицинского применения (Москва). Клетки Vero культивировали на среде Игла MEM с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота («Биолот», Россия). Инфекционный титр вируса для клеточной линии Vero предварительно определяли на 96-луночных планшетах. В каждую лунку с серийными четырехкратными разведениями вирусосодержащей суспензии добавляли по 100 мкл среды, содержащей $1,2 - 2,0 \times 10^4$ клеток Vero. Клетки инкубировали с вирусом в течение 48 ч при 37°C в 5% CO_2 , затем фиксировали ацетоном и окрашивали меченным ФИТЦ диагностическим антирабическим иммуноглобулином (ВНИИЗЖ, г. Владимир). По результатам учёта фокусов флуоресценции с помощью люминесцентного микроскопа «Микромед И-ЛЮМ» определяли инфицирующую дозу (ИД₅₀) [1].

Для цитофлуориметрического анализа клетки Vero, предварительно выращенные в культуральных флаконах с площадью ростовой поверхности 25 см² до состояния конфлюэнтного монослоя, открепляли от поверхности флакона и ресуспендировали в 5 мл питательной среды, к которой добавляли вирус в исходной дозе $0,3 \pm 0,11 \lg$ ИД₅₀ на клетку. Далее исследовали динамику репродукции вируса бешенства в условиях *in vitro* путем сбора клеток через 24, 48 и 72 ч культивирования. В качестве контроля использовали интактную клеточную культуру. В следующем эксперименте к клеткам добавляли десятикратные разведения исследуемой вирусосодержащей жидкости в пределах от 10^{-1} до 10^{-8} . Накопление вируса в клетках оценивали через 48 ч после инфицирования клеточной культуры.

Фиксацию и пермебиализацию клеток проводили с помощью набора Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, USA) по методу, разработанному Vengate-

san D. et al. [14] для детекции вируса бешенства с помощью ПЦ в ИК мышинной нейробластомы. Иммунофлуоресцентное окрашивание антигена в клеточной цитоплазме осуществляли конъюгированным с ФИТЦ диагностическим антирабическим иммуноглобулином. Для исследований методом ПЦ использовали рабочее разведение указанного диагностического препарата, аналогичное используемому разведению в экспериментах с применением люминесцентной микроскопии и соответствующее рекомендациям производителя.

Образцы анализировали со скоростью около 500 клеток в секунду на ПЦ CyAn ADP DakoCytomation с аргоновым лазером мощностью 20 mW при длине волны эмиссии 488 нм. При создании протокола анализа с использованием программного обеспечения Summit 4.3 Built 2445 настройки устанавливали таким образом, чтобы на цитограммах по параметрам интенсивности прямого (FS) и бокового (SS) светорассеяния неповреждённые живые клетки Vero отличались от клеточного дебриса и погибших клеток с характерными изменениями клеточного размера и внутриклеточной структуры [5]. Область интенсивности флуоресценции, соответствующую ИК, идентифицировали в окне Dot Plot SS/FITC FL [14] путём повышения высоковольтного напряжения на фотодетекторе до величины 340 В. Значения интенсивности флуоресценции в данной области составили более 10 условных единиц (каналов). Долю ИК определяли как процентное отношение числа клеток, зарегистрированных в этой области, к общему числу исследованных клеточных элементов. Более того, из частотных распределений отдельных клеток по интенсивности их специфической иммунофлуоресценции оценивали в области, соответствующей ИК, среднюю внутриклеточную вирусную нагрузку (Mean) в используемых условных единицах измерения и определяли коэффициент вариации (CV, в %), отражающий степень неоднородности фракции ИК по данному параметру [7, 10].

Статистический анализ результатов проводили общепринятыми методами [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 в виде цитограммы представлено характерное распределение отдельных клеток Vero по объёму (прямое светорассеяние, Forward Scatter (FS) и по степени внутриклеточной гранулярности (боковое светорассеяние, Side Scatter (SS) в инфицированной вирусом культуре. Результат анализа получен через 72 ч инкубации, когда инфицированные культуры были максимально неоднородны по исследуемым клеточным показателям. На цитограмме выделены три характерные

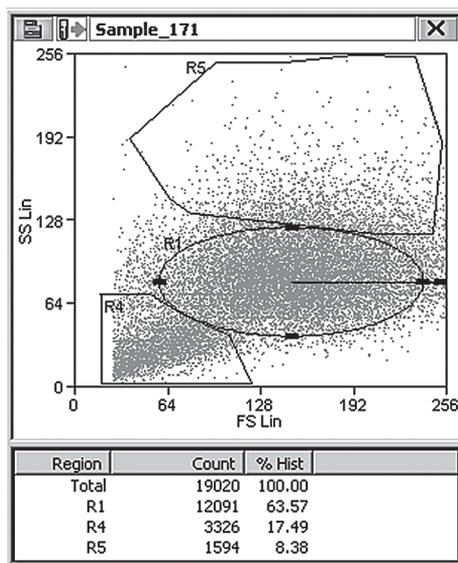


Рис. 1. Пример Dot Plot FS/SS цитограммы, иллюстрирующей распределение отдельных клеток линии Vero по объёму (FS) и степени внутриклеточной гранулярности (SS) через 72 ч после инфицирования культуры фиксированным вирусом бешенства.

R1 — область, в которой локализуется по параметрам светорассеяния около 90% клеток в контроле; R4 — погибшие и повреждённые клетки; R5 — клетки с повышенной степенью внутриклеточной гранулярности. Под цитограммой доля клеток в каждом из регионов указана в % по отношению к общему числу (Total) исследованных клеток.

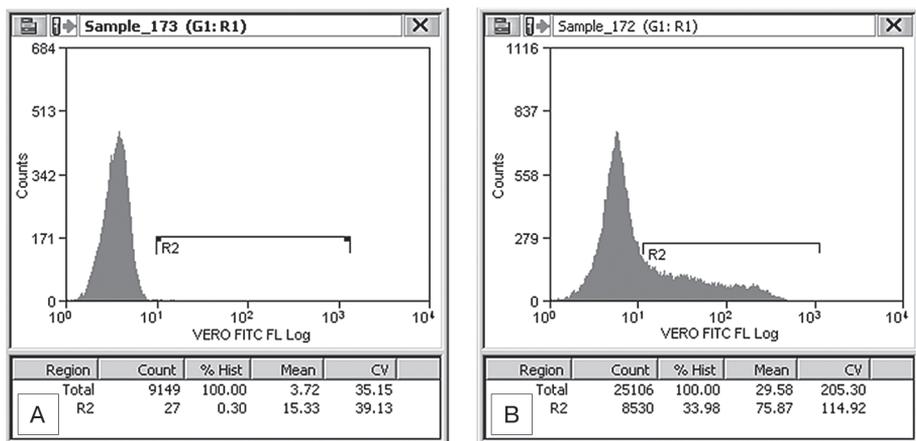


Рис. 2. Дифференцирование инфицированных и неинфицированных клеток линии Vero по интенсивности иммунофлуоресценции.

По оси абсцисс — интенсивность иммунофлуоресценции клеток Vero, окрашенных флуоресцирующим диагностическим антирабическим иммуноглобулином, в усл. кол. ед. (каналах цитометра) от 0 до 10^4 ; по оси ординат — количество зарегистрированных клеток на единицу измерения. R2 — область интенсивности специфической иммунофлуоресценции, соответствующая инфицированным клеткам. Представленные гистограммы соответствуют исходному контролю (A) и инфицированной культуре через 24 ч культивирования (B). Под каждой гистограммой доля клеток в области R2 в % вместе со значениями показателей Mean и CV.

области: эллипсоидная область R1, соответствующая нормальным клеткам с исходными морфологическими параметрами; область регистрации погибших клеток с признаками апоптоза и некроза (R4); область, где по значению параметра SS учитывались клетки с повышенной степенью внутриклеточной гранулярности (R5). Статистический анализ цитограмм показал, что к 72 ч развития инфекции в условиях *in vitro* штамм фиксированного вируса бешенства повреждал не более 20% клеток Vero ($18,6 \pm 0,6\%$, при значении показателя в контроле $2,9 \pm 0,3\%$, $P < 0,001$, при $n=3$). Еще слабее повреждающий эффект вируса в культурах клеток линии Vero был через 48 ч ($7,8 \pm 1,2\%$, $P < 0,05$) и отсутствовал на ранней стадии инфицирования, поскольку к 24 ч достоверных различий с контролем по числу погибших клеток не было зарегистрировано. Число клеток с повышенной степенью гранулярности в инфицированных вирусом культурах увеличивалось к 72 ч инкубации до $10,3 \pm 1,1\%$ относительно исходного показателя $3,7 \pm 0,9\%$ ($P < 0,05$) в контроле.

Иммунофлуоресцентный анализ больших статистических выборок отдельных клеток Vero в инфицированных вирусом культурах проводили в условиях автоматического гейтирования гистограмм по области R1 (G1:R1). То есть, детекцию вируса бешенства мы проводили только в живых, ещё неповреждённых клетках линии Vero, попадающих по параметрам светорассеяния в эллипсоидную область R1. Гистограмма, представленная на рис. 2 B, иллюстрирует факт присутствия в культуре как инфицированных клеток в количестве 33,98% (в области R2), так и не инфицированных вирусом бешенства клеточных элементов. При исследовании контрольных проб, не содержащих инфицированные вирусом клетки Vero, характерный пик ИК в области R2 отсутствовал (рис. 2 A).

Для всех контрольных образцов в наших исследованиях был характерен стабильно очень низкий уровень подсчёта фоновых сигналов флуоресценции в области R2 не более 2% ($1,1 \pm 0,45\%$, при $n=10$). Аналогичные значения дан-

ного показателя ($0,9 \pm 0,27\%$, $P > 0,05$) имели место при анализе чистых проб с физиологическим раствором или деионизованной водой, когда из проточной системы прибора потоком жидкости в небольшом количестве смывались ранее адсорбированные в ней окрашенные клетки.

Через 24, 48 и 72 ч в инфицированных культурах регистрировали выраженные достоверные различия по относительному содержанию ИК: соответственно $29,5 \pm 1,7\%$, $70,4 \pm 2,0\%$ и $88,3 \pm 1,3\%$ ($P < 0,001$, $n=3$). Хотя к 24 ч инкубации доля ИК была минимальна, именно в этот срок мы регистрировали самую высокую среднюю (Mean) вирусную нагрузку на ИК ($73,5 \pm 1,3$ усл. ед. интенсивности специфической иммунофлуоресценции), а также максимальные значения коэффициента вариации (CV) по данному параметру, равные $115,6 \pm 0,8\%$. Для двухсуточных культур данные показатели были в 1,5 раза ниже — соответственно $51,4 \pm 1,6$ усл. ед. и $72,3 \pm 0,5\%$ ($P < 0,001$). К 72 ч снова отмечали увеличение вирусной нагрузки на ИК до $66,2 \pm 0,8$ усл. ед., а также значений CV до $86,1 \pm 1,4\%$ ($P < 0,05$). Факт присутствия специфического антигена в ИК подтверждали результаты люминесцентной микроскопии через 24, 48 и 72 ч (данные не представлены). Однако традиционный вариант МФА не позволял определять процентное содержание ИК в популяции. С его помощью проведение количественного мониторинга указанного показателя в процессе культивирования не представляется возможным.

Детекцию вируса бешенства в клетках линии Vero ПЦ анализ обеспечивал в наших исследованиях при 1000-кратном снижении исходной инфицирующей дозы. Доля ИК была в этом случае $6,9 \pm 0,21\%$ ($P < 0,001$ при $n=3$). При повышенных исходных вирусных нагрузках 1/100 и 1/10 относительное количество ИК в двухсуточных культурах увеличивалось соответственно до $38,5 \pm 1,5$ и $67,2 \pm 0,8\%$. При дальнейших десятикратных снижениях исходной инфицирующей дозы метод ПЦ уже не выявлял вирус бешенства в клетках линии Vero через 48 ч инкубации. Чувствительность классического варианта постановки МФА также позволяла детектировать вирус в клетках Vero при 1000-кратном снижении исходной инфицирующей дозы. Однако в полях зрения люминесцентного микроскопа можно было наблюдать в этом случае только единичные специфически флуоресцирующие клетки.

ОБСУЖДЕНИЕ

Автоматизация и стандартизация МФА на базе ПЦ технологии [13] позволяет повысить эффективность диагностики инфекционных болезней человека и животных [4,6], что уже убедительно доказано в зарубежных исследованиях на примерах детекции различных вирусов, в том числе и вируса бешенства [7,10, 12, 14]. В настоящей работе впервые на модели клеток линии Vero и штамма фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» в России получены результаты, подтверждающие высокую эффективность использования ПЦ как инструмента для мониторинга изменений относительного количества инфицированных вирусами клеток в клеточных культурах, а также установлен характер этих изменений в зависимости от исходной вирусной нагрузки и срока инкубации.

Накопление вируса бешенства при его культивировании *in vitro* зависит от выбора клеточной культуры [11]. С помощью ПЦ установлены различия при исследовании репродукции вируса в культурах клеток MNA и ВНК-21. Инфицирование вирусом бешенства более 70% клеток ВНК-21 имело место только после 72 ч [7], в то время как в культурах MNA доля ИК резко увели-

чивалась до 75% уже к 48 ч инкубации [14]. Результаты наших исследований свидетельствуют, что в клетках линии Vero вирус бешенства размножается также быстро, как и в клетках МНА. Поэтому с точки зрения чувствительности детекции вируса в клеточных культурах и, как следствие, диагностики бешенства использование клеток Vero представляется не менее эффективным, чем клеток мышинной нейробластомы.

Наиболее интенсивное образование новых вирусных частиц в ИК линии Vero регистрировали с помощью ПЦ через 24 ч, при этом изменения значений показателей Mean и CV носили циклический характер. Увеличение числа повреждённых и структурно изменённых клеток с аномальными морфологическими характеристиками к 72 ч инкубации указывает, вероятно, на усиление в этот срок процесса выхода вируса во внеклеточное пространство. Атенуированный вирус бешенства оказывал на клетки Vero слабый цитопатический эффект, что согласуется с литературными данными [14, 15].

На наш взгляд, определение методом ПЦ относительного содержания клеток, инфицированных вирусом бешенства, позволит повысить точность и эффективность анализов при определении активности вируса и уровня нейтрализующих антирабических антител в сыворотках крови людей и животных, что откроет новые возможности в совершенствовании диагностики бешенства. Препарат диагностического антирабического флуоресцирующего иммуноглобулина, созданный в России для классического варианта МФА с использованием люминесцентной микроскопии, обладает по нашим данным достаточной активностью для его эффективного применения в автоматическом (импульсном) режиме количественного измерения интенсивности клеточной иммунофлуоресценции. Получение точной информации об особенностях культивирования вируса, основанной на результатах количества ИК в культуре, в дальнейшем позволит использовать ПЦ на этапах производства и контроля разрабатываемых и выпускаемых в России антирабических препаратов [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П., Воробьёв А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л., 1962.
2. ГОСТ 26075-2013 Животные. Методы лабораторной диагностики бешенства. М., Стандартинформ, 2014.
3. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Лобовикова О.А., Свищов Р.А., Комиссаров А.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Культуральный антиген в технологии получения антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади. Проблемы особо опасных инфекций. 2012, 4 (114): 65-68.
4. Кравцов А.Л. Совершенствование диагностики инфекционных болезней, связанное с использованием технологии импульсной проточной цитометрии. Биотехнология. 2013, 3: 8-23.
5. Сибиряк С.В., Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Оценка апоптоза в иммунологических исследованиях. В: Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение. Челябинск, 2008.
6. Alvarez-Barrientos A., Arroyo J., Canon A.R. et al. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. Clin. Microbiol. Rev. 2000, 13 (2): 167-195.
7. Bordignon J., Ferreira S., Caporale G. et al. Flow cytometry assay for intracellular rabies virus detection. J. Virol. Methods. 2002, 105 (1): 181-186.
8. Halfmann P., Kim J. H., Eblhara H. et al. Generation of biologically contained Ebola viruses. PNAS. 2008, 105 (4): 1129-1133.
9. Hanners N.W., Eitson J.L., Usui N. Western Zika virus in human fetal neural progenitors persists long term with partial cytopathic and limited immunogenic effects. Cell Reports. 2016, 15 (11): 2315-2374.

10. McSharry J.J. Detection and quantitation of human immunodeficiency virus-infected peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry. *J. Clin. Microbiol.* 1990, 28: 724-733.
11. Rudd R. J., Trimarchi C.V. Comparison of sensitivity of BHK21 cells and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus. *J. Clin. Microbiol.* 1987, 25: 1456-1458.
12. Sydow F., Santiago M.A., Neves-Souza P.C. et al. Comparison of Dengue infection in human mononuclear leukocytes with mosquito C6/36 and mammalian Vero cells using flow cytometry to detect virus antigen. *Memento Instituto Oswaldo Cruz.* 2000, 5:483-489.
13. Steen H.B., Boye E., Starsted K. et al. Applications of flow cytometry on bacteria: Cell cycle kinetics, drug effects and antibody binding. *Cytometry*, 1982, 2 (4): 249-256.
14. Vengatesan D., Raj G.D., Raja A. et al. Detection of rabies virus antigen or antibody using flow cytometry. *Cytometry*. 2006, 70B (5): 335-343.
15. Woldehewet Z. Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus. *Clin. Chem. Acta.* 2005, 351: 49-63.

Поступила 31.10.17

Контактная информация: Кравцов Александр Леонидович, д.б.н.,
410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (8452)26-21-31

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*А.М.Кудряшова¹, А.Г.Галстян¹, Е.Б.Файзулов¹,
А.Ю.Оленин², Г.В.Лисичкин², В.В.Зверев¹, О.В.Борисова¹*

ВЫЯВЛЕНИЕ АДЕНОВИРУСНОГО АНТИГЕНА МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА С ГКР-ДЕТЕКЦИЕЙ СИГНАЛА

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва; ²Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

Цель. Изучение возможности выявления антигена аденовируса с детекцией спектров гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) окисленной формы 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ⁺) как продукта иммуноферментной реакции. *Материалы и методы.* В работе использовали клинические фекальные образцы, содержащие аденовирусы, ротавирусы группы А, норовирусы и образцы здоровых детей, а также лабораторные штаммы аденовирусов с титром 5 — 6 lg ТЦД₅₀/мл. Иммуноферментный анализ проводился в сэндвич-формате, при проведении ГКР-детекции после стадии окисления ТМБ в реакционную смесь вносили наночастицы серебра и проводили измерение спектров на рамановском анализаторе при длине волны лазера 532 нм. *Результаты.* Была получена сходимость результатов при определении аденовируса в сравнении с иммуноферментным методом с фотометрической детекцией и ПЦР. *Заключение.* Показана возможность использования ТМБ⁺ в качестве ГКР-репортера и серебряных наночастиц в качестве ГКР-субстрата для выявления антигена аденовируса в сложных биологических образцах.

Журн. микробиол., 2018, №. 3, С. 25—31

Ключевые слова: аденовирус, твердофазный ИФА, гигантское комбинационное рассеяние, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, наночастицы серебра

*А.М.Кудряшова¹, А.Г.Галстян¹, Е.Б.Файзулов¹,
А.Ю.Оленин², Г.В.Лисичкин², В.В.Зверев¹, О.В.Борисова¹*

DETECTION OF ADENOVIRUS ANTIGEN BY A SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; ²Lomonosov Moscow State University, Russia