

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФРАГМЕНТОВ ОБОЛОЧЕЧНОГО БЕЛКА ВИРУСА ЗИКА С АНТИТЕЛАМИ СЫВОРОТОК ЛЮДЕЙ, ПЕРЕБОЛЕВШИХ ФЛАВИВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Д.В. Шаньшин^{1,2}, А.Ю. Бакулина^{1,3}, Е.И. Казачинская¹, С.А. Пьянков¹,
А.А. Ильичев¹, Д.Н. Щербаков^{1,2}

¹ ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

² ФГБОУ ВО Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Россия

³ ФГБОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Возбудитель лихорадки Зика (ZIKV) принадлежит к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. Род флавивирусов включает в себя более 70 представителей. По структурной организации вириона и аминокислотному составу белков этот вирус сходен с другими флавивирусами, в том числе с вирусами денге (DENV), желтой лихорадки и Западного Нила (WNV), представляющими опасность для здоровья человека. ZIKV является арбовирусом и может переноситься различными видами комаров рода *Aedes*. Считается, что основные переносчики также способны переносить вирус денге, желтой лихорадки и другие флавивирусные инфекции. Впервые ZIKV был выделен в 1947 г. из образцов крови от макаки-резуса в лесу Зика (Уганда). Долгое время вирус не рассматривался как патоген опасный для человека, так как лихорадка Зика протекает в большинстве случаев бессимптомно. Однако анализ протекания лихорадки Зика во время беременности выявил связь этого заболевания с тяжелыми врожденными патологиями нервной системы, включая микроцефалию, после чего эта инфекция стала рассматриваться как опасная. Стремительное распространение вируса обозначило ряд проблем, с которыми столкнулись врачи. Одна из основных — отсутствие методов специфической диагностики этой инфекции. ZIKV обладает значительным антигенным сходством с другими флавивирусами. Большинство моноклональных антител к вирусу денге связываются с вирусом Зика. Это закономерно, если учитывать высокую степень сходства аминокислотных последовательностей полипротеина флавивирусов. Для исследования возможности дифференциальной диагностики флавивирусов, основанной на выявлении специфических антител, в работе было сконструировано несколько антигенов, содержащих фрагменты поверхностного белка E ZIKV. Для наработки рекомбинантных антигенов в клетках *E. coli* был выбран вектор рЕТ32. После получения конструкций, кодирующих белки ZEa187 и ZEa40, проводили наработку химерных белков в количествах, необходимых для проведения ИФА с сыворотками крови. Подготовка препаратов белков включала выделение белка из бактериальной биомассы путем лизиса с последующей хроматографической очисткой. Для изучения иммунохимических свойств химерных белков были использованы сыворотки крови

Адрес для переписки:

Шаньшин Даниил Васильевич
630559, Россия, Новосибирская область, р.п. Кольцово,
ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор».
Тел.: 8 903 939-74-79 (моб.).
E-mail: shanshin dv@vector.nsc.ru

Contacts:

Daniil V. Shanshin
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltsovo,
State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector».
Phone: +7 903 939-74-79 (mobile).
E-mail: shanshin dv@vector.nsc.ru

Библиографическое описание:

Шаньшин Д.В., Бакулина А.Ю., Казачинская Е.И., Пьянков С.А., Ильичев А.А., Щербаков Д.Н. Взаимодействие фрагментов оболочечного белка вируса зика с антителами сывороток людей, переболевших флавивирусными инфекциями // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 73–82. doi: 10.15789/2220-7619-AIO-805

Citation:

Shanshin D.V., Bakulina A.Yu., Kazachinskaja E.I., Pyankov S.A., Ilyichev A.A., Scherbakov D.N. An interaction of Zika virus envelope fragments with serum antibodies derived from subjects after flavivirus infections // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 73–82. doi: 10.15789/2220-7619-AIO-805

© Шаньшин Д.В. и соавт., 2020

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AIO-805>

людей, переболевших лихорадками Зика, денге и Западного Нила. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки людей, не содержащие антител к флавивирусным инфекциям. При взаимодействии иммуноглобулинов класса М из сывороток больных флавивирусными инфекциями с ZЕa187 и ZЕa40 наблюдается высокий уровень перекрестного взаимодействия. При этом, несмотря на рост среднего сигнала специфического взаимодействия полученных белков с IgG сывороток ZIKV, наблюдается значительное перекрестное взаимодействие с IgG сывороток WNV и DENV. Таким образом, можно с определенной долей уверенности утверждать, что использование природных аминокислотных последовательностей поверхностного белка вируса Зика, выбранных для проведения данного исследования в качестве антигенов, в иммунохимических тестах не позволяет добиться высокой специфичности выявления антител.

Ключевые слова: вирус Зика, вирус денге, вирус Западного Нила, иммуноферментный анализ, перекрестное взаимодействие, рекомбинантные антигены.

AN INTERACTION OF ZIKA VIRUS ENVELOPE FRAGMENTS WITH SERUM ANTIBODIES DERIVED FROM SUBJECTS AFTER FLAVIVIRUS INFECTIONS

Shanshin D.V.^{a,b}, Bakulina A.Yu.^{a,c}, Kazachinskaja E.I.^a, Pyankov S.A.^a, Ilyichev A.A.^a, Scherbakov D.N.^{a,b}

^a State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

^b Altai State University, Barnaul, Russian Federation

^c Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The causative agent of Zika fever (ZIKV) belongs to the genus *Flavivirus* of the family *Flaviviridae*. The flavivirus genus consists of more than 70 members. Based on virion structural organization and amino acid composition of proteins, this virus resembles other flaviviruses such as dengue (DENV), yellow fever and West Nile (WNV) posing a threat to human health. ZIKV is an arbovirus and may be transmitted by diverse mosquito species of the genus *Aedes*. It is believed that the main carriers are also able to transmit dengue virus, yellow fever virus as well as other flavivirus infections. In 1947, ZIKV was isolated for the first time from blood samples obtained from rhesus macaques inhabiting the Zika Forest (Uganda). Long time this virus was not considered as a dangerous to human pathogen, as Zika fever mostly occurs asymptotically. However, analysis of Zika fever course in pregnant women unveiled a link between this disease and severe congenital disorders of the nervous system, including microcephaly, that allowed to deal with it as a dangerous infection thereafter. Rapid ZIKV spread outlined a number of problems faced by medical doctors, among which the main issue was the lack of assays for its virus-specific diagnostics. ZIKV displays a marked antigenic similarity with other flaviviruses. The majority of dengue-specific monoclonal antibodies binds to Zika virus. It is expected given the high degree of amino acid sequence similarity found for flavivirus polyprotein. Several antigens bearing ZIKV E surface protein fragments were constructed to assess an opportunity for conducting differential diagnostics for distinct flaviviruses based on detection of virus-specific antibodies. Vector plasmid pET32 was selected for producing recombinant antigens in *E. coli* cells. After creating constructs encoding the ZЕa187 and ZЕa40 proteins, the chimeric proteins were produced in amount necessary for performing ELISA with blood serum samples. Protein samples were prepared by isolating them from bacterial biomass via lysis followed by chromatographic purification. Blood sera obtained from human subjects recovered after Zika, Dengue and West Nile fevers were used to examine immunochemical properties of chimeric proteins. Human sera containing no antibodies against flavivirus types were used as a negative control. It was found that serum IgM class antibodies derived from patients with flavivirus infections demonstrated a high level of cross-reactivity by interacting with ZЕa187 and ZЕa40. Upon that, despite increment of mean specific interaction signal observed for such proteins and IgG of ZIKV sera, a marked cross-reactivity with the IgG of WNV and DENV sera was found. Thus, with some certainty it may be concluded that in immunochemical assays use of natural amino acid sequence specific to Zika virus surface protein as antigenic material does not allow to achieve high specificity for antibody detection.

Key words: Zika virus, virus dengue, West Nile virus, ELISA, cross-reactivity, recombinant antigens.

Введение

Возбудитель лихорадки Зика (ZIKV) принадлежит к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* [30]. Род флавивирусов включает в себя более 70 представителей [3]. По структурной организации вириона и аминокислотному составу белков этот вирус сходен с другими флавивирусами, в том числе с вирусами денге (DENV),

желтой лихорадки (YFV) и Западного Нила (WNV), представляющими опасность для здоровья человека [10, 21]. ZIKV является арбовирусом и может переноситься различными видами комаров рода *Aedes*. В настоящее время считается, что его основными переносчиками являются комары вида *Aedes aegypti*, способные также переносить вирусы денге и желтой лихорадки [28].

Геном ZIKV состоит из одноцепочечной молекулы РНК длиной примерно 10 тыс. пар нуклеотидов, кодирующей полипротеин, который расщепляется на 3 структурных белка (капсидный — С, предшественник мембранного белка — рgM, оболочечный — Е) и 7 неструктурных белков [16].

Впервые ZIKV был выделен в 1947 г. из образцов крови от макаки-резуса в лесу Зика (Уганда). Долгое время вирус не рассматривался как патоген, опасный для человека [9, 20]. Лихорадка Зика протекает в большинстве случаев бессимптомно. Среди наиболее частых симптомов отмечаются макулопапулезные высыпания, лихорадка, миалгии и артралгии, головные боли и др. [8], и ее симптомы схожи с неосложненной лихорадкой денге. До недавнего времени случаи заболевания лихорадкой Зика регистрировались в основном в Африке и Юго-Восточной Азии. Однако в последние годы крупные вспышки этой болезни были зарегистрированы на территории Федеративных Штатов Микронезии на острове Яп в западной части Тихого океана в 2007 г., в 2015 г. в Бразилии, после чего вирус быстро распространился на другие южноамериканские страны [9, 20]. Анализ клинического течения лихорадки Зика во время беременности выявил связь этого заболевания с тяжелыми врожденными патологиями нервной системы, включая микроцефалию, после чего эта инфекция стала рассматриваться как опасная [12, 16, 29].

Стремительное распространение вируса обозначило ряд проблем, с которыми столкнулись врачи. Одна из основных — отсутствие методов специфической диагностики этой инфекции. Несмотря на существование высокоточных и высокоспецифичных методов обнаружения генетического материала вируса на основе ПЦР, исчерпывающая диагностика требует использования серологических методов обнаружения вирусных белков или вирусспецифичных антител.

ZIKV обладает значительным антигенным сходством с другими флавивирусами [1, 4]. Большинство моноклональных антител к вирусу денге связываются с вирусом Зика [19]. Это закономерно, если учитывать высокую степень сходства аминокислотных последовательностей полипротеина флавивирусов [26]. Если все флавивирусы имеют одну структурную организацию вирионов [14, 22, 24], и при этом наблюдается высокая степень гомологии аминокислотного состава [14], возможно ли, основываясь только на анализе антител сыворотки крови больного, дифференциально выявить инфекцию, вызванную вирусом Зика? Для ответа на этот вопрос в качестве объекта нашего исследования мы выбрали поверхностный белок Е вируса, выступающий первой мишенью для быстропротекающей лихорадки Зика.

Белок Е имеет молекулярную массу около 53 kDa и является основным поверхностным белком, который участвует во взаимодействии с клеточной мембраной [16]. Внеклеточная часть оболочечного белка ZIKV включает в себя три структурных домена (домены I, II и III). Все эти домены упакованы в вытянутую стержнеобразную структуру [25, 27]. Домен I имеет β -бочкообразную структуру и расположен в центре мономера. Домен II образован вытянутой палочкообразной структурой, отвечающей за процесс слияния мембран клетки-хозяина и вируса. Петля слияния во II домене является высококонсервативным участком в структуре поверхностного белка всех родственных флавивирусов. Домен III, отвечающий за начальное взаимодействие с клеточными рецепторами, менее консервативен по сравнению с доменами I и II [4].

Целью нашей работы было получение химерных белков, содержащих фрагменты белка Е ZIKV, и изучение их взаимодействия с антителами сывороток крови пациентов, перенесших лихорадку Западного Нила, денге, Зика.

Материалы и методы

Выравнивание аминокислотных последовательностей. Для выравнивания аминокислотных последовательностей белков Е различных флавивирусов и расчета идентичности использовалась программа BioEdit [17].

Получение рекомбинантных плазмид pET32a-ZEa187 и pET32a-ZEa40. Синтез гена, кодирующего полноразмерный оболочечный белок вируса Зика штамма ZIKV/H. sapiens/Brazil/PE243/2015 [GenBank: KX197192.1], осуществлялся в ООО «ДНК-Синтез» (Россия). Последовательности gZEa187 и gZEa40, кодирующие аминокислотные фрагменты белка Е ZIKV, получали при помощи ПЦР с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров. Нуклеотидную последовательность gZEa187 клонировали в составе экспрессионной плазмиды pET32a по сайтам рестрикции NcoI и XhoI, а последовательность gZEa40 — по сайтам XbaI и XhoI. Рекомбинантными плазмидами pET32a-ZEa187 и pET32a-ZEa40 трансформировали клетки *E. coli* штамма Stb13 (Thermo Fisher Scientific, США) методом химической трансформации [5]. Клетки *E. coli* высевали на селективную среду, содержащую LB-агар и 100 мкг/мл ампициллина. Полученные колонии *E. coli* использовали для наработки плазмидной ДНК. Целостность рамки считывания проверяли с помощью рестрикционного анализа, ПЦР и секвенированием.

Индукция синтеза химерных белков ZEa187 и ZEa40. Для экспрессии генов, кодирующих

химерные белки ZЕa187 и ZЕa40, использовали клетки *E. coli* штамма KRX (Promega, США). Трансформацию компетентных клеток плазмидами рЕТ32а-ZЕa187 и рЕТ32а-ZЕa40 проводили химическим методом [5]. Индукцию проводили с помощью 0,1% L-рамнозы несколькими способами: 1) с добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) в концентрации 1 мМ; 2) без добавления ИПТГ, 3) с добавлением ИПТГ в концентрации 1 мМ и в присутствии 0,4% глюкозы или без нее. Индукция по первым двум методам происходила следующим образом: свежую LB-среду инокулировали штаммами-продуцентами рЕТ32а-ZЕa187 и рЕТ32а-ZЕa40 в соотношении 1:100 и инкубировали в термостатируемом шейкере роторного типа при 180 об./мин при +24°C до достижения оптической плотности 0,6–0,8 о.е. при длине волны 600 нм. После этого для индукции экспрессии рекомбинантных генов добавляли L-рамнозу до конечной концентрации 0,1% с добавлением или в отсутствии ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ. Инкубирование проводилось в течение 16 ч с последующим концентрированием клеток при помощи центрифугирования.

Индукцию синтеза ZЕa187 и ZЕa40 по третьему способу проводили следующим образом: в LB-агар добавлялись ампициллин и глюкоза в конечной концентрации 100 мкг/мл и 0,4% соответственно, с последующим высеванием на него штаммов-продуцентов рЕТ32а-ZЕa187 и рЕТ32а-ZЕa40. Инокулировали единичную колонию штамма-продуцента в свежую LB-среду с последующим культивированием при +24°C в течении 16 ч в термостатируемом шейкере роторного типа при 180 об./мин. По достижению оптической плотности 0,6–0,8 о.е. добавляли L-рамнозу и ИПТГ до конечной концентрации 0,1% и 1 мМ, соответственно, и инкубировали в течение 16 ч.

Аликвоты для анализа отбирали перед добавлением индуктора, через 1 ч, 2 ч и 4 ч после добавления индуктора. Контроль синтеза белка проводили при помощи электрофоретического разделения белков *E. coli* в денатурирующих условиях в 15% полиакриламидном геле по методу Лэмбли [23].

Сыворотки. В качестве контрольной панели сывороток, специфически взаимодействующих с антигенами ZIKV, использовали серию сывороток от пациента, переболевшего лихорадкой Зика в 2016 г., собранных в интервале от 8 до 20 дней от начала заболевания. Диагноз лихорадки Зика у пациента был подтвержден вирусологически (изоляция вируса) и при помощи секвенирования части генома с последующим депонированием последовательности (номер депонирования в GenBank, NCBI участка генома PНК: KU872850

от 07.03.2016 г.) [7]. В качестве контрольной панели, содержащей антитела к вирусу денге, использовали 7 сывороток переболевших лихорадкой денге, собранных с 7 по 15 день после проявления первых симптомов. Контрольная панель, содержащая антитела к ВЗН, содержала 26 сывороток от переболевших лихорадкой Западного Нила, собранных с 5 по 18 день. Сыворотки больных лихорадками Зика и денге были предоставлены ЦНИИ эпидемиологии, сыворотки больных лихорадкой Западного Нила — Волгоградским противочумным институтом. Постановка диагноза была проведена на основе методов ПЦР и ИФА диагностики. В качестве отрицательного контроля использовалась донорская неинфекционная плазма, предоставленная Новосибирской службой крови.

Получение природного антигена. Для получения природного инактивированного антигена ZIKV проводили наработку вируса в клетках Vero. Вирус из культуральной вирусосодержащей жидкости получали осаждением на низкоскоростной центрифуге после добавления полиэтиленгликоля с последующей очисткой ресуспендированного осадка ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Инактивация β-пропиолактоном заключалась в прогревании смеси антигена и 0,1% (v/v) β-пропиолактона в течение 2 ч при 37°C и постоянном перемешивании.

Очистка химерных белков. Очистку химерных белков ZЕa187 и ZЕa40 проводили с использованием металл-хелатной аффинной хроматографии с использованием сорбента Ni-IMAC сефарозы (GE Healthcare, США). Для получения клеточных лизатов биомассу осаждали при помощи центрифугирования при 6000g в течение 10 мин при +4°C, с последующим ресуспендированием в лизирующем буфере (30 мМ NaH₂PO₄, 20 мМ имидазола, 500 мМ NaCl, 8 М мочевины, 0,1% Triton X100, pH 7,4), дезинтегрировали при помощи ультразвука в течение 10 циклов по 90 с с перерывом 3 мин на льду. Клеточный лизат очищался от дебриса при помощи центрифугирования при 15 000g в течение 25 мин при +4°C. Связывание химерных белков с колонкой происходило при скорости 1,5 мл/мин. Далее следовала промывка колонки от несвязавшихся белков пятью объемами колонки при скорости потока промывочного буфера (30 мМ NaH₂PO₄, 40 мМ имидазола, 500 мМ NaCl, 8 М мочевины, pH 7,4) 2 мл/мин. Белки элюировали при помощи трех объемов колонки при скорости потока элюирующего буфера (30 мМ NaH₂PO₄, 500 мМ имидазола, 500 мМ NaCl, 8 М мочевины, pH 7,4) 1 мл/мин. Фракции собирали по 5 мл, концентрацию проверяли при помощи NanoPhotometer NP80 (Implen, Германия).

Использование химерных белков ZEa187 и ZEa40 в твердофазном иммуноферментном анализе. В качестве антигенов для сенсибилизации твердой фазы использовали очищенные химерные белки ZEa187 и ZEa40. Сенсибилизацию ячеек планшетов очищенными препаратами химерных белков с концентрацией 3 мг/мл выполняли в 0,15 М NaCl, с добавлением 0,02 М Трис HCl pH 7,4 (ТСБ, Трис солевой буфер) при +22°C в течение 18 ч. После трехкратной отмывки ТСБ с добавлением 0,05% твин-20 (ТСБ-Т) планшеты обрабатывали 1% раствором казеина в ТСБ-Т и инкубировали в течение 1 ч при +37°C. Затем раствор казеина удаляли и вносили в лунки планшета по 50 мкл тестируемых сывороток крови здоровых доноров и лиц, инфицированных ZIKV, DENV или WNV. Сыворотки инкубировали в течение 1 ч при +37°C. После трехкратной отмывки лунок ТСБ-Т в них добавляли пероксидазный конъюгат козьих антител Anti-Human IgG (полноразмерная молекула) (Anti-Human IgG (whole molecule)–Peroxidase antibody produced in goat, Sigma-Aldrich, США) и инкубировали в течение 1 ч при +37°C. После трехкратной отмывки лунок ТСБ-Т в них добавляли раствор субстрата, содержащий 0,1 мг/мл ТМБ (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, Sigma-Aldrich, США), и буфер, содержащий 0,02% H₂O₂, для окисления субстрата. Планшет (стрипы) инкубировали в защищенном от света месте в течение 15–20 мин при комнатной температуре. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 1 М HCl и через 2–4 мин измеряли оптическую плотность на спектрофотометре «Uniscan» (Финляндия) при длине волны 450 нм.

Статистический анализ. Сравнение значений оптической плотности в разных группах проводилось с использованием непараметрического статистического критерия Манна–Уитни с помощью пакета R [6].

Результаты

Проведен отбор трех последовательностей, кодирующих фрагменты оболочечного белка E ZIKV (ZEa187 и ZEa40). Компьютерный анализ конструкций в программе SnapGene v3.2.1 показал, что химерные белки ZEa187 и ZEa40 имеют размер 355 а.о. и 194 а.о. с молекулярной массой 56,6, 38,6 и 21,0 kDa соответственно (рис. 1).

Получены рекомбинантные плазмиды pET32a-ZEa187 и pET32a-ZEa40, содержащие в своем составе нуклеотидные последовательности, кодирующие фрагменты оболочечного белка ZIKV.

Были получены штаммы-продуценты на основе клеток *E. coli* штамма KRX, трансформированные векторами pET32a-ZEa187 и pET32a-ZEa40. Экспрессию генов gZEa187 и gZEa40 изучили в *E. coli* KRX при использовании в качестве индуктора 20%-го раствора L-рамнозы. Оптимальный режим для индукции экспрессии gZEa187 и gZEa40 составил 24°C в течение 18 ч.

Высокоочищенные химерные белки ZEa187 и ZEa40 получали с помощью хроматографии на Ni-IMAC сефарозе. Конечный выход продукта составил не менее 35 мг с 1 л культуры. Анализ очищенных белков проводился с помощью электрофореза в 15% SDS PAGE геле. Степень чистоты достигала 95–98%.

Изучено перекрестное взаимодействие антител сывороток крови, собранных во время острой и постинфекционной стадий лихорадки Зика, Западного Нила и денге, с антигенами ZEa187 и ZEa40 при помощи твердофазного ИФА. Полученные результаты представлены на рисунке 2.

Среднее значение ОП взаимодействия IgG сыворотки переболевшего лихорадкой Зика с белком ZEa187 составило 1,79, с белком ZEa40 — 0,72. Для фракции IgM аналогичные

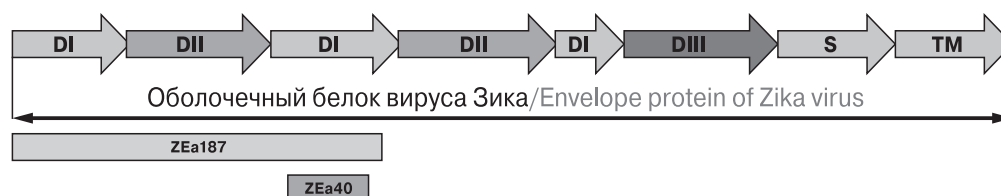


Рисунок 1. Схема строения оболочечного белка вируса Зика и его фрагменты, вошедшие в состав химерных белков

Figure 1. Diagram of the structure of the envelope protein of Zika virus and its fragments included in the chimeric proteins

DI — домен I, D II — домен II, D III — домен III, S — «ножка», TM — трансмембранный регион, ZEa187 — фрагмент химерного белка длиной 187 а.о., ZEa40 — фрагмент химерного белка длиной 40 а.о.

DI — domain I, D II — domain II, D III — domain III, S — “leg”, TM — transmembrane region, ZEa187 — chimeric protein fragment a length of 187 a.a., ZEa40 — chimeric protein fragment a length of 40 a.a.

значения составили 0,32 и 0,2 соответственно. Среднее значение ОП взаимодействия IgG сывороток больных ЛЗН с ZЕa187 составило 0,78 и 0,32 при взаимодействии с ZЕa40. Для фракции IgM аналогичные значения составили 0,83 и 0,25 соответственно. Среднее значение ОП взаимодействия IgG сывороток от больных лихорадкой денге с ZЕa187 составило 0,30, с ZЕa40 — 0,24. Для фракции IgM аналогичные значения составили 0,45 и 1,39 соответственно. Для антител сывороток условно здоровых доноров сигнал ОП не превышал значения 0,17.

Обсуждение

Быстрое распространение лихорадки Зика в 2015–2016 гг. стало причиной напряженной эпидемической ситуации. Вспышки лихорад-

ки в течение нескольких месяцев были зарегистрированы на территории стран Южной и Северной Америки и на островах Карибского бассейна, для которых она ранее не являлась эндемичной [32]. Были зафиксированы завозные случаи лихорадки Зика в Европе [10]. Несмотря на спад интереса к этой болезни, остается ряд вопросов, которые возникли в связи с этими вспышками. Одним из самых острых вопросов, возникших в момент массовой регистрации случаев лихорадки Зика, был вопрос корректной постановки диагноза. Это связано с тем, что симптомы лихорадки Зика сходны или даже идентичны симптомам, характерным для других флавивирусных лихорадок (денге, Западного Нила). Учитывая то, что распространение лихорадки Зика происходило на территориях, для которых лихорадки Западного Нила

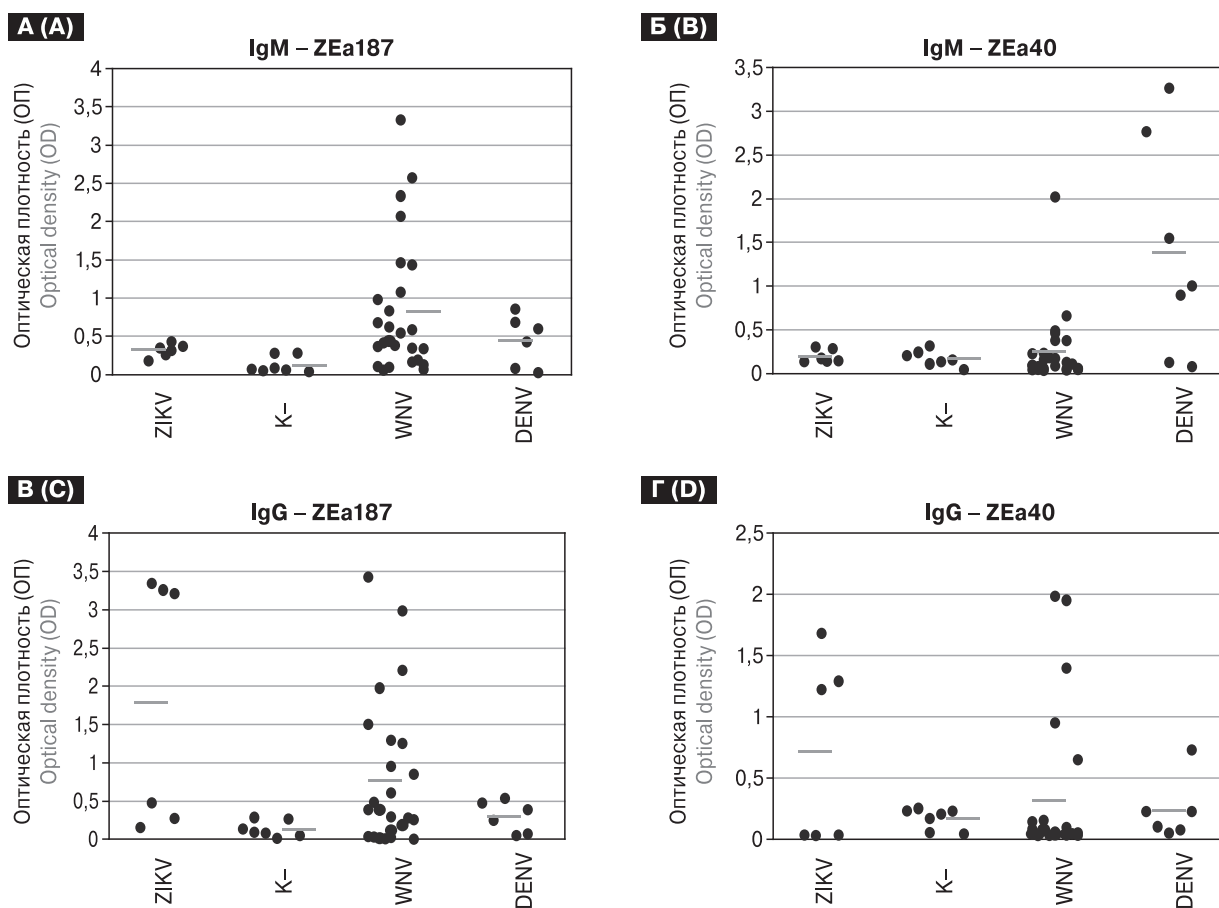


Рисунок 2. График распределения величины взаимодействия (ОП) химерных антигенов с антителами сывороток пациентов с диагнозом лихорадки Зика, Западного Нила и денге, а также с антителами сывороток, не содержащих антитела к флавивирусным инфекциям

Figure 2. Graph of the distribution of interaction (OD) values of chimeric antigens with serum antibodies of patients diagnosed with Zika fever, West Nile and dengue, as well as with serum antibodies that do not contain antibodies to flavivirus infections

A — ОП взаимодействия ZЕa187 с IgM; Б — ОП взаимодействия ZЕa40 с IgM; В — ОП взаимодействия ZЕa187 с IgG; Г — ОП взаимодействия ZЕa40 с IgG; ● — значение оптической плотности, — — среднее значение оптической плотности.
 A — OD interaction ZЕa187 with IgM; Б — OD interaction of ZЕa40 with IgM; В — OD of interaction of ZЕa187 with IgG; Д — OD interaction ZЕa40 with IgG; ● — the value of optical density, — — the average value of optical density.

и денге являются эндемичными [1, 4], становятся понятными сложности, возникшие при диагностике этого заболевания. Для острой стадии инфекции, когда генетический материал возбудителя находится в организме, основным методом обнаружения является ПЦР, использование которой, действительно, позволяет идентифицировать возбудитель с высокой точностью. Однако этот метод становится бесполезным при элиминации возбудителя из организма. В этом случае основным способом зафиксировать факт перенесенной инфекции является использование иммунохимических методов [2].

Иммуноферментный анализ является одним из наиболее часто используемых методов клинической диагностики, что связано с его быстротой и низкой себестоимостью анализа. Однако перекрестная реакция антител с близкородственными флавивирусами ограничивает использование данного метода для дифференциальной диагностики этой группы вирусов [18]. Решением этой проблемы может быть поиск небольших фрагментов вирусного полипротеина гетерологичных по аминокислотному составу для разных видов флавивирусов, но гомологичных внутри вида.

Для исследования возможности дифференциальной диагностики флавивирусов, основанной на выявлении специфических антител, в работе было сконструировано несколько антигенов, содержащих фрагменты поверхностного белка E ZIKV. Делая такой выбор, мы основывались на следующих соображениях. Лихорадка Зика характеризуется быстрым течением [7, 11]. Логично ожидать, что за короткий период основной мишенью иммунной системы станут именно поверхностные белки, в то время как смещение иммунного ответа в сторону

внутренних белков требует длительной персистенции возбудителя в организме.

Исследования специфичности поликлональных антител, нарабатываемых в ответ на вирус денге у мышей, показали, что доминантной мишенью гуморального ответа является область домена III белка E (рис. 1) [13]. В то же время у человека основной мишенью выступает регион шарнирной области, который располагается в доменах I и II [15]. Учитывая высокую степень гомологии белков ZIKV и DENV, мы в своей работе сконцентрировали внимание на аминокислотной последовательности, включающей фрагменты доменов I и II белка E ZIKV. Последовательность ZЕa187 включает N-концевой регион, в том числе участки доменов I и II, а ZЕa40 фрагмент домена I, отличающийся, согласно данным биоинформатического анализа, в максимальной степени по аминокислотной последовательности от аналогичных поверхностных белков других флавивирусов (рис. 3). Необходимо отметить, что этот район не является однородным для самого ZIKV. Так, у некоторых штаммов подгруппы Zika 2 отсутствуют четыре аминокислоты (рис. 3).

Для наработки белков в клетках *E. coli* был выбран вектор pET32, что позволяло получать интересные химерные белки с N-концевым «довеском», представленным последовательностью тиоредоксина. Включение последовательности тиоредоксина в ряде случаев позволяет увеличить растворимость химерного белка, а также его выход [31]. После получения конструкций, кодирующих белки ZЕa187 и ZЕa40, проводили наработку химерных белков в количествах, необходимых для проведения ИФА с сыворотками крови. Подготовка препаратов белков включала очистку из бактериальной биомассы путем ли-

	130	140	150	160	170	180	190	195
Zika 1	I Q P E N L E Y	R I M L S V H - G S Q H S G M I	V N D T G H E T D E N R A K V E I T P N S P R A E	A T L G G F G S L G L D C E P R T				
Zika 2	I Q P E N L E Y	R I M L S V H - G S Q H S G M I	----	G Y E T D E D R A K V E V T P N S P R A E	A T L G G F G S L G L D C E P R T			
Dengue I	V Q Y E N L K Y S V I V T V H T G D Q H	-----	Q V G N E T T E H G T T A T I T P Q A P T S E I Q L T D Y G A L T L D C S P R T					
Dengue II	V Q P E N L E Y T I V I T P H S G E E H	-----	A V G N D T G K H G K E I K I T P Q S S I T E A E L T G Y G T V T M E C S P R T					
Dengue III	V Q Y E N L K Y T V I I T V H T G D Q H	-----	Q V G N E T -- Q G V T A E I T P Q A S T T E A I L P E Y G T L G L E C S P R T					
Dengue IV	V Q I E N L E Y T V V V T V H N G D T H	-----	A V G N D T S N H G V T A M I T P R S P S V E V K L P D Y G E L T L D C E P R S					
West Nile	I Q K E N I K Y E V A I F V H G P T T V	-----	E S H G K I G A T Q A G R F S I T P S A P S Y T L K L G E Y G E V T V D C E P R S					

Рисунок 3. Выравнивание фрагментов аминокислотных последовательностей домена I оболочечных белков флавивирусов

Figure 3. Alignment of the amino acid sequence fragments of the domain I of the flavivirus envelope proteins

Zika 1 — фрагмент оболочечного белка ZIKV, первой подгруппы штаммов; Zika 2 — фрагмент оболочечного белка ZIKV, второй подгруппы штаммов; Dengue I, II, III и IV — фрагмент оболочечных белков DENV четырех разных серотипов; West Nile — фрагмент оболочечного белка WNV. Жирным выделена аминокислотная последовательность, включенная в состав ZЕa40.

Zika 1 is a fragment of the ZIKV envelope protein, the first subgroup of strains; Zika 2 is a fragment of the ZIKV envelope protein, the second subgroup of strains; Dengue I, II, III and IV is a fragment of the DENV envelope proteins of four different serotypes; West Nile is a fragment of the WNV envelope protein. Bold highlighted amino acid sequence included in the composition of ZЕa40.

зиса и последующей металл-хелатной аффинной хроматографии, как это описано в разделе «Материалы и методы».

В первой серии экспериментов изучали взаимодействие иммуноглобулинов класса М сывороток крови больных с диагностированными лихорадками Зика, Западного Нила и денге с химерными белками ZEa187 и ZEa40. Как видно на рисунках 2а и 2б, ни в одной из сывороток больного лихорадкой Зика не наблюдается заметного уровня IgM против этих фрагментов. При этом для сывороток больных лихорадкой Западного Нила ОП при взаимодействии с ZEa187 в среднем достоверно выше, чем для отрицательного контроля ($p = 0,00069$). При сравнении результатов взаимодействия IgM сывороток с белками ZEa187 и ZEa40 можно отметить, что для белка размером 40 а.о. наблюдается уменьшение среднего уровня сигнала ОП для сывороток WNV ($p = 0,000086$), что, возможно, связано с уменьшением размера белка с 187 а.о. до 40 а.о. Для сывороток больных лихорадкой денге средний уровень сигнала ОП выше, чем средний уровень контроля, но эти результаты статистически не значимы ($p > 0,05$).

Следующим этапом исследования было изучение взаимодействия IgG сывороток крови с ZEa187 и ZEa40. Результаты проиллюстрированы на рисунках 2в и 2г. Видно, что в обоих случаях сыворотки больного лихорадкой Зика разделились на 2 группы: значения ОП в одной из групп близко к отрицательному контролю, в другой — больше, чем контроль ($p = 0,01667$). Для сывороток больных лихорадкой Западного Нила наблюдается та же картина, что и при исследовании IgM: ОП при взаимодействии с ZEa187 оказалась выше, чем для отрицательного контроля ($p = 0,03846$), и ОП при взаимодействии с ZEa40 ниже, чем с ZEa187 ($p = 0,04604$). Следует отметить, что в среднем для лихорадки денге не было значимого превышения ОП по сравнению с контролем ($p > 0,05$).

Заключение

В результате работы были получены хроматографически очищенные химерные белки, содержащие фрагменты оболочечного белка E ZIKV. Проведено исследование взаимодействия полученных белков и антител сывороток больных лихорадкой Зика, лихорадкой Западного Нила и лихорадкой денге. При взаимодействии иммуноглобулинов класса М из сывороток больных флавивирусными инфекциями с ZEa187 и ZEa40 наблюдается высокий уровень перекрестного взаимодействия. При этом, несмотря на рост среднего сигнала специфического взаимодействия полученных белков с IgG сывороток ZIKV, наблюдается значительное перекрестное взаимодействие с IgG сывороток WNV и DENV. Таким образом, можно с определенной долей уверенности утверждать, что использование природных аминокислотных последовательностей поверхностного белка вируса Зика, выбранных для проведения данного исследования в качестве антигена в иммунохимических тестах, не позволяет добиться высокой специфичности выявления антител. Выходом из сложившейся ситуации может быть поиск новых антигенных детерминант вируса Зика с помощью биоинформатических методов. Такой поиск может привести к выявлению высококонсервативных и высокоспецифичных участков полипротеина, которые можно будет использовать для детекции взаимодействия с противовирусными антителами. Несомненно, свою роль могут сыграть методы комбинаторной биологии, например технология фагового дисплея, позволяющая тонко настроить используемые антигены на выявление антител только к вирусу Зика и отсекают взаимодействие с антителами родственных флавивирусов.

Работа поддержана ГЗ-10/18 «Разработка рекомбинантных видоспецифических антигенов опасных вирусов 2018–2020 гг.».

Список литературы/References

1. Иванов Д.О., Малиновская В.В., Тимченко В.Н., Каплина Т.А., Хакизимана Ж.К. Глобальные и педиатрические аспекты лихорадки Зика // Педиатр. 2016. Т. 7, № 1. С. 129–134. [Ivanov D.O., Malinovskaya V.V., Timchenko V.N., Kaplina T.A., Hakizimana J.-C. Global and pediatric aspects of Zika virus infection. *Pediatr = Pediatrician*, 2016, vol. 7, no. 1, pp. 129–134. doi: 10.17816/PED71129-134 (In Russ.)]
2. Калинина Е.И., Куличенко Т.В. Лихорадка Зика: основные факты об инфекции // Вопросы современной педиатрии. 2016. Т. 15, № 3. С. 257–262. [Kalinina E.I., Kulichenko T.V. Zika fever: basic facts about the infection. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2016, vol. 15, no. 3, pp. 257–262. doi: 10.15690/vsp.v15i3.1562 (In Russ.)]
3. Локтев В.Б. Флавивирусы, генетическое разнообразие и распространение в современном мире. В кн.: Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе. Новосибирск: Издательство «Ареал», 2016. С. 84–87. [Loktev V.B. Flaviviruses, genetic diversity and distribution in the modern world. In: *Diagnosis and prevention of infectious diseases at the present stage*. Novosibirsk: Areal, 2016, pp. 84–87. (In Russ.)]
4. Малхазова С.М., Миронова В.А. Проблема новых и возвращающихся инфекции: задачи медико-географического изучения // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: География. Геоэкология. 2017. № 1. С. 21–31. [Malkhazova S.M., Mironova V.A. The problem of new and returning infections: the task of medical-geographical study. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Geografiya. Geoekologiya. = Proceedings of Voronezh State University. Series: Geography. Geoecology*, 2017, no. 1, pp. 21–31. (In Russ.)]

5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 240–241. [Maniatis T., Fritch E., Sambbruk G. Methods of genetic engineering. Molecular cloning. Moscow: Mir, 1984, pp. 240–241. (In Russ.)]
6. Мастицкий С.Э., Шитиков В.К. Статистический анализ и визуализация данных с помощью R. М.: ДМК Пресс, 2015. 496 с. [Mastitsky S.E., Shitikov V.K. Statistical analysis and data visualization using R. Moscow: DMK Press, 2015. 496 p. (In Russ.)]
7. Покровский В.И., Малеев В.В., Краснова С.В., Сметанина С.В., Вдовина Е.Т., Котив С.И., Карань Л.С., Федорова М.В., Григорьева Я.Е., Валдохина А.В., Карганова Г.Г., Шипулин Г.А. Первый случай лихорадки Зика в России // Инфекционные болезни. 2016. Т. 14, № 1. С. 90–95. [Pokrovskiy V.I., Maleev V.V., Krasnova S.V., Smetanina S.V., Vdovina E.T., Kotiv S.I., Karan L.S., Fedorova M.V., Grigor'eva Ya.E., Valdokhina A.V., Karganova G.G., Shipulin G.A. The first case of Zika fever in Russia. *Infektsionnye bolezni = Clinical Observation*, 2016, vol. 14, no. 1, pp. 90–95. doi: 10.20953/1729-9225-2016-1-90-95 (In Russ.)]
8. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Топорков А.В., Викторов Д.В., Смелянский В.П., Жуков К.В., Бородай Н.В., Шпак И.М., Куличенко А.Н., Михеев В.Н., Малеев В.В., Шипулин Г.А. Лихорадка Зика: состояние проблемы на современном этапе // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. № 1. С. 5–12. [Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Toporkov A.V., Viktorov D.V., Smelyansky V.P., Zhukov K.V., Boroday N.V., Shpak I.M., Kulichenko A.N., Mikheev V.N., Maleev V.V., Shipulin A.G. Zika fever: the current state of the issue. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2016, no. 1, pp. 5–12. doi: 10.21055/0370-1069-2016-1-5-12 (In Russ.)]
9. Рябинина Л.А., Кнышова Л.П. Лихорадка Зика — глобальная угроза здоровью нации // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2016. № 4–5. С. 92–93. [Ryabina L.A., Knyshova L.P. Zika fever — a global threat to the health of the nation. *Aktual'nye problemy gumanitarnykh i estestvennykh nauk = Actual Problems of the Humanities and Natural Sciences*, 2016, no. 4–5, pp. 92–93. (In Russ.)]
10. Хасанова Г.М., Исхаков Э.Р., Хасанова А.Н. Аналитический обзор распространения заболевания, вызываемого вирусом Зика // Международный академический вестник. 2016. № 4. С. 29–31. [Khasanova G.M., Iskhakov J.R., Khasanova A.N. Dissemination of virus Zika disease (analytic review). *Mezhdunarodnyy akademicheskyy vestnik = International Academic Bulletin*, 2016, no. 4, pp. 29–31. (In Russ.)]
11. Шестакова И.В. Болезнь, вызванная вирусом зика: новый взгляд на известную болезнь // Журнал инфектологии. 2016. Т. 8, № 1. С. 5–18. [Shestakova I.V. Zika virus disease: a new look at a well-known disease. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2016, vol. 8, no. 1, pp. 5–18. (In Russ.)]
12. Calvet G., Aguiar R.S., Melo A.S., Sampaio S.A., De Filippis I., Fabri A., Araujo E.S.M., de Sequeira P.C., de Mendonça M.C.L., Oliveira L., Tschoeke D.A., Schrago C.G., Thompson F.L., Brasil P., dos Santos F.B., Nogueira R.M.R., Tanuri A., de Filippis A.M.B. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases*, 2016, vol. 16, no. 6, pp. 653–660. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00095-5
13. Campos J.L.S., Poggianella M., Marchese S., Mossenta M., Rana J., Arnoldi F., Bestagno M., Burrone O.R. DNA-immunisation with dengue virus E protein domains I/II, but not domain III, enhances Zika, West Nile and Yellow Fever virus infection. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 7: e0181734. doi: 10.1371/journal.pone.0181734
14. Chambers T.J., Hahn C.S., Galler R., Rice C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1990, vol. 44, no. 1, pp. 649–688. doi: 10.1146/annurev.mi.44.100190.003245
15. Chaudhury S., Gromowski G.D., Ripoll D.R., Khavrutskii I.V., Desai V., Wallqvist, A. Dengue virus antibody database: Systematically linking serotype-specificity with epitope mapping in dengue virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2017, vol. 11, no. 2: e0005395. doi: 10.1371/journal.pntd.0005395
16. Faye O., Freire C.C., Iamarino A., Faye O., de Oliveira J.V.C., Diallo M., Zannotto P.M. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2014, vol. 8, no. 1: e2636. doi: 10.1371/journal.pntd.0002636
17. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, vol. 41, no. 41, pp. 95–98.
18. Houghton-Triviño N., Montaña D., Castellanos J. Dengue-yellow fever sera cross-reactivity; challenges for diagnosis. *Revista de Salud Publica*, 2008, vol. 10, no. 2, pp. 299–307.
19. Kam Y.W., Lee C.Y.P., Teo T.H., Howland S.W., Amrun S.N., Lum F.M., See P., Kng N.Q.R., Huber R.G., Xu M.H., Tan H.L., Choo A., Maurer-Stroh S., Ginhoux F., Fink K., Wang C.I., Ng L.F.P., Rénia L. Cross-reactive dengue human monoclonal antibody prevents severe pathologies and death from Zika virus infections. *JCI Insight*, 2017, vol. 2, no. 8. doi: 10.1172/jci.insight.92428
20. Koenig K.L. Quarantine for Zika Virus? Where is the Science? *Disaster Med. Public Health Prep.*, 2016, vol. 10, no. 5, pp. 704–706. doi: 10.1017/dmp.2016.56
21. Kostyuchenko V.A., Lim E.X.Y., Zhang S., Fibriansah G., Ng T.S., Ooi J.S.G., Shi J., Lok S.M. Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature*, 2016, vol. 533, no. 7603, p. 425. doi:10.1038/nature17994
22. Kuhn R.J., Zhang W., Rossmann M.G., Pletnev S.V., Corver J., Lenches E., Jones C.T., Mukhopadhyay R., Chipman S.P., Strauss E.G., Baker T.S., Strauss J.H. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 2002, vol. 108, no. 5, pp. 717–725. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00660-8
23. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685.
24. Li L., Lok S.M., Yu I.M., Zhang Y., Kuhn R.J., Chen J., Rossmann M.G. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science*, 2008, vol. 319, no. 5871, pp. 1830–1834. doi: 10.1126/science.1153263
25. Mossenta M., Marchese S., Poggianella M., Campos J.S., Burrone O.R. Role of N-glycosylation on Zika virus E protein secretion, viral assembly and infectivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2017, vol. 492, no. 4, pp. 579–586. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.022
26. Priyamvada L., Quicke K.M., Hudson W.H., Onlamoon N., Sewatanon J., Edupuganti S., Pattanapanyasat K., Choekphaibulkit K., Mulligan M.J., Wilson P.C., Ahmed R., Suthar M.S., Wrarmert J. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2016, vol. 113, no. 28, pp. 7852–7857. doi: 10.1073/pnas.1607931113

27. Rai R., Dubey S., Santosh K.V., Biswas, A., Mehrotra, V., Rao D.N. Design and synthesis of multiple antigenic peptides and their application for dengue diagnosis. *Biologicals*, 2017, vol. 49, pp. 81–85. doi: 10.1016/j.biologicals.2017.08.005
28. Roth A., Mercier A., Lepers C., Hoy D., Duituturaga S., Benyon E., Guillaumot L., Souares Y. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections — an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Eurosurveill.*, 2014, vol. 19, no. 41, pp. 20929.
29. Ventura C.V. Maia M., Bravo-Filho V., Góis A.L., Belfort R. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *The Lancet*, 2016, vol. 387, no. 10015, p. 228. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00006-4
30. Weber D.S., Alroy K.A., Scheiner S.M. Phylogenetic Insight into Zika and emerging viruses for a perspective on potential hosts. *EcoHealth*, 2017, vol. 14, no. 2, pp. 214–218. doi: 10.1007/s10393-017-1237-x
31. Wong S.H. Cloning of flavin reductase into pET32a (+) expression vector lacking the thioredoxin A tag to study solubility of EDTA monooxygenase A in overexpression systems. *J. Exp. Microbiol. Immunol.*, 2005, vol. 8, pp. 59–66.
32. World Health Organization et al. Zika virus, microcephaly and Guillain-Barré syndrome situation report. 2016.

Авторы:

Шаньшин Д.В., младший научный сотрудник ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия; младший научный сотрудник Российско-Американского противоракового центра ФГБОУ ВО Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Россия;

Бакулина А.Ю., к.б.н. старший научный сотрудник ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия; зав. лабораторией, факультет естественных наук ФГБОУ УВПО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск, Россия;

Казачинская Е.И., д.б.н., ведущий научный сотрудник, зав. сектором гибридных технологий ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Пьянков С.А., зав. лаборатории производства средств иммунодиагностики ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Ильичев А.А., д.б.н., профессор, начальник отдела биоинженерии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Щербakov Д.Н., к.б.н., зав. лабораторией иммунохимии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия; ведущий научный сотрудник Российско-Американского противоракового центра ФГБОУ ВО Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Россия.

Authors:

Shanshin D.V., Junior Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotretnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation; Junior Researcher, Russian-American Anti-Cancer Center, Altai State University, Barnaul, Russian Federation;

Bakulina A.Yu., PhD (Biology), Senior Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotretnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation; Head of the Laboratory, Faculty of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation;

Kazachinskaja E.I., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Hybridoma Sector Manager, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotretnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Pjankov S.A., Head of the Laboratory for the Production of Immunodiagnosics, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotretnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Ilyichev A.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head of Bioengineering Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotretnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

Scherbakov D.N., PhD (Biology), Head of Immunochemistry Laboratory, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotretnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation; Leading Researcher, Russian-American Anti-Cancer Center, Altai State University, Barnaul, Russian Federation.

Поступила в редакцию 12.09.2019
Отправлена на доработку 27.09.2019
Принята к печати 26.11.2019

Received 12.09.2019
Revision received 27.09.2019
Accepted 26.11.2019